بررسی تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی در ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) با فولیکول‌های طبیعی و آترتیک

سبحان رعنای اخوان[۱]، امیر پرویز سلاطی[۱*]، بهرام فلاحتکار[۲]، سید امیرحسین جلالی[۳]

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران
۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
*مسئول مکاتبات: apsalati@kmsu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۶

چکیده

در راستای بهبود کیفیت و کارایی محصول خاویار در مزارع پرورشی ماهیان خاویاری ارزیابی درست و صحیح مرحله رسیدگی جنسی تخمدانی اجتناب ناپذیر است، همچنین برای نیل به این منظور باید از برداشت ماهیان ماده ای که فولیکول های تخمدانی در مرحله آترزی قرار دارند اجتناب شود. در این مطالعه تعیین فولیکول‌های تخمدانی در حال آترزی با استفاده از سطوح هورمون های جنسی و پارامترهای بیوشیمیایی پلاسما انجام گرفت. برای این منظور پس از سوندزنی، ۱۰ عدد ماهی که فولیکول‌های تخمدانی در حال جذب در آن‌ها مشاهده شده بود، مورد انتخاب قرار گرفتند. میزان غلظت تستوسترون و استرادیول در تاس‌ماهیان استرلیاد که در مرحله آترزی بودند به طرز معنی داری در مقایسه با ماهیانی که فولیکول‌های تخمدانی آن‌ها از وضعیت طبیعی برخوردار بودند پایین‌تر بود. در پارامترهای بیوشیمیایی پلاسما نیز تری گلیسرید، کلسترول و کلسیم کاهش معنی‌داری در ماهیان ماده دارای فولیکول‌های آترتیک در مقایسه با ماهیان دارای تخمدان طبیعی نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که بررسی تغییرات بیوشیمیایی و هورمونی ناشی از آترزی فولیکول می‌تواند به صورت موفقیت آمیزی در تفکیک فولیکول‌های تخمدانی آترتیک از فولیکول‌های طبیعی به عنوان جایگزینی برای شیوه تهاجمی بیوپسی در ماهی استرلیاد به کار رود.

کلمات کلیدی: استرلیاد، استروئید جنسی، پارامترهای بیوشیمیایی، آترزی.

مقدمه

امروزه، ذخایر ماهیان خاویاری خزر به دلایلی نظیر صید بی‌رویه، آلودگی‌های زیست محیطی و مسدود شدن مسیرهای منتهی به مناطق تولیدمثل طبیعی این ماهیان در حال کاهش بوده [۲]، به طوری که بسیاری از آن‌ها در فهرست ماهیان در معرض خطر سازمان IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources) قرار گرفته‌اند [۱۰]. لذا بسیاری از دولت‌ها و سازمان‌ها را به فکر حراست از گونه‌های مختلف از طریق بهینه سازی محیط زیست، کاهش صید، رفع آلودگی‌ها و از همه مهم‌تر تکثیر و پرورش این ماهیان واداشته است. ماهیان خاویاری به دلیل قدرت سازگاری اکولوژیک زیاد، توانایی همزیستی با ماهیان استخوانی و توانایی استفاده از بیوتوپ‌های گوناگون [٦]، رشد سریع، نیاز اکسیژنی پایین و قابلیت پرورش در سیستم‌های پرورشی مختلف [۱۸] مورد توجه آبزی پروران قرار گرفته اند. طبق آخرین آمارها، صنعت آبزی پروری این ماهیان رو به گسترش بوده، به طوری که میزان پرورش این ماهیان در محیط های مصنوعی در حال‌حاضر به بیش از ۲٥٦۸۳ تن

Archive of SID
www.SID.ir

طی سال های اخیر رسیده است [۷]. توسعه پایدار این صنعت نوپا، بی‌شک مستلزم تامین به هنگام مواد تناسلی با کیفیت و کمیت مطلوب است؛ لذا کنترل فرایندهای تولیدمثلی و تولید گله مولدین در شرایط پرورشی الزامی خواهد بود [۱٤].

ماهیان تحت شرایط پرورشی معمولا با ناهنجاری‌های تولیدمثلی مواجه می‌شوند. علاوه بر این محرک‌های تنش-زای غیرطبیعی نظیر حضور انسان و اصوات مکانیکی بروز ناهنجاری‌ها را تشدید می‌کنند. فراهم آمدن شرایط بهینه برای رسیدگی جنسی امری پیچیده می باشد که اگر مورد توجه قرار نگیرد، منجر به بروز پدیده آترزی در فولیکول های تخمدانی برخی از ماهیان به ویژه در مراحل پایانی اووژنز می‌شود. از عوامل مهم دخیل در این پدیده می‌توان به تغییرات دمایی، مدیریت استرس [۱] و تغذیه نامناسب [۳] اشاره نمود.

دستیابی به شیوه کمتر تهاجمی، با سرعت و دقت بالا برای تعیین بروز پدیده آترزی در فولیکول‌های تخمدانی می‌تواند برای صنعت خاویارسازی بسیار با ارزش باشد. استحصال خاویار حتی در مراحل ابتدایی آترزی می‌تواند سبب کاهش قوام، طعم، مزه و ماندگاری خاویار گردد و در برخی موارد سود کار را به کلی از بین ببرد. استفاده از شیوه فعلی بیوپسی و مشاهده حضور و یا عدم حضور فولیکول های تخمدانی در صنعت خاویار، یک شیوه تهاجمی به حساب می‌آید و قادر به شناسایی تغییرات کوریون در شروع پدیده آترزی نمی‌باشد. لذا در راستای به کارگیری شیوه جایگزین بیوپسی، این مطالعه به دنبال بررسی تغییرات بیوشیمیایی و هورمونی فولیکول‌های تخمدانی در حال آترزی می‌باشد. این مطالعه اطلاعات پایه‌ای ارزشمندی برای تجاری سازی شیوه با تهاجم پایین و دقت بالا در ارتباط با پدیده آترزی در فولیکول‌های تخمدانی در صنعت خاویار و برنامه بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری ارائه می‌دهد.

مواد و روش کار

ماهی و شرایط انجام آزمایش: در اردیبهشت ماه ۱۳۹٤ در حین تعیین مولدین مناسب نر و ماده از طریق سوند زنی و تعیین مرحله رسیدگی ۱۰ عدد ماهی که پس از سوندزنی فولیکول‌های تخمدانی در حال جذب در آنها مشاهده شده بود، مورد انتخاب قرار گرفتند. وزن متوسط تاس‌ماهیان استرلیاد پرورشی ماده دارای فولیکول‌های تخمدانی در مرحله آترزی در این مطالعه ۷۰۷/۷±۲۰۲/۷ گرم و متوسط طول ماهیان ٥۳/٤±٦/٤ سانتی‌متر بود. خون‌گیری از ساقه دمی، با استفاده از سرنگ هپارینه ۵ میلی‌لیتری انجام شد. برای جلوگیری از ورود آب و موکوس به نمونه خون، ساقه دمی ماهیان کاملا خشک گردید. برای جدا سازی پلاسما از سانتریفوژ (Hettich, Tuttlingen, Germany) با دور g ۱٦۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. سپس پلاسما جدا و تا زمان سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. هم‌چنین جهت مقایسه از ۱۰ عدد ماهی که فولیکول های تخمدانی در وضعیت سالمی برخوردار بودند نیز نمونه برداری انجام گرفت.

سنجش هورمون‌های استرویدی: سنجش هورمون‌های ۱۷- بتا استرادیول و تستوسترون پلاسما خون ماهیان این مطالعه به روش رادیوایمنواسی با استفاده از کیت Immunotech (Marseille, France) بادستگاه گاماکانتر (LKB، فنلاند) انجام گرفت. برای کالیبراسیون کنترل این تست از کالیبراتور و کنترل Immunotech استفاده گردید. گاماکانتر، پرتودهی اشعه گاما حاصل از واکنش رقابتی بین آنتی‌ژن موجود در نمونه و آنتی‌ژن نشان دار شده با I_{125}، در اتصال به آنتی‌بادی متصل به داخل تیوپ را پس از پردازش اندازه‌گیری می‌کند.

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی: برای تعیین پارامترهای بیوشیمیایی پلاسمای خون از دستگاه Auto analyzer (Mindray, China) استفاده گردید. مقادیر تری‌گلیسرید،

www.SID.ir

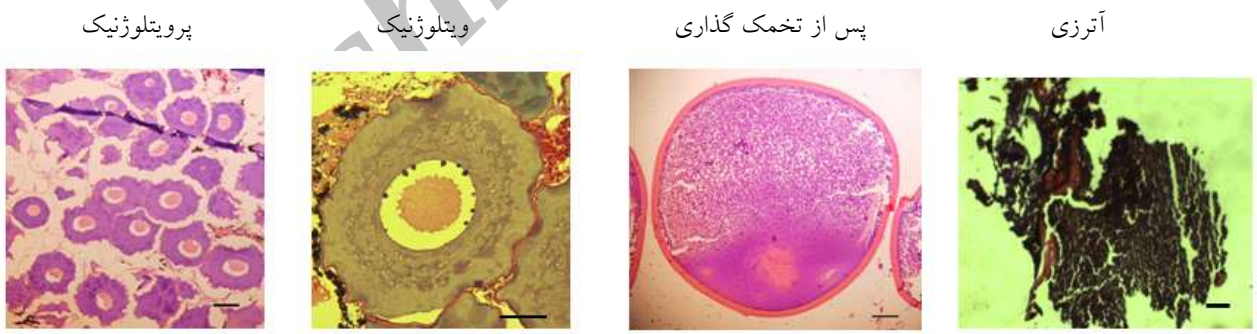
کلسترول و پروتئین کل در نمونه‌های پلاسما با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) مورد محاسبه قرار گرفت. برای تعیین مقدار کلسیم نمونه‌ها از کیت‌های شرکت من (تهران، ایران) استفاده شد. مقدار کلسیم در طول موج ٦١٢ نانومتر با استفاده ازدستگاه Auto analyzer اندازه گیری شد [۵]. مقدار فسفر نمونه‌ها با استفاده از کیت‌های شرکت من (تهران، ایران) و دستگاه Auto analyzer در طول موج ۳٤۰ نانومتر محاسبه شد.

آنالیز آماری: داده‌های آماری ثبت شده، به صورت میانگین ± انحراف معیار در متن ارائه گردیده است. مقایسه پارامترهای مورد سنجش در این مطالعه با استفاده از t-test در سطح اطمینان ۹۵ درصد و توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ (Chicago, IL, USA) انجام پذیرفت.

نتایج

نتایج بررسی‌های هورمونی ۱۷بتا- استرادیول و تستوسترون در تاس‌ماهیان استرلیاد در مرحله آترزی در جدول شماره ۱ ارایه شده است. فولیکول‌های طبیعی و آترتیک بر اساس بافت‌شناسی تعیین گردد (شکل ۱). همان‌طور که مشاهده می‌شود اختلاف معنی‌داری بین استروئیدهای جنسی استرادیول و تستوسترون در ماهیان ماده با تخمک طبیعی نسبت به ماهیان ماده با تخمک در حال بازجذب وجود دارد ($p <$ ۰/۰۵)، به طوریکه کاهش قابل توجهی در میزان این هورمون‌ها در ماده‌های با تخمک آترتیک مشاهده شد.

نتایج پارامترهای بیوشیمیایی در تاس‌ماهیان استرلیاد در مرحله آترزی در جدول ۲ ارائه شده است. در مورد پارامتر های بیوشیمیایی روند تغییرات به گونه‌ای بود که در پلاسمای تاس‌ماهیان استرلیاد در مرحله آترزی میزان تری گلیسرید، کلسیم و کلسترول به صورت معنی‌داری پایین‌تر از ماهیان با تخمک‌های طبیعی بود، مقادیر فسفر و پروتئین کل پلاسما در ماهیان با اووسیت طبیعی و آترتیک اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p <$ ۰/۰۵).



شکل ۱- تصویر بافت‌شناسی تخمدان ماهی استرلیاد در مراحل مختلف تکامل گنادی

www.SID.ir

جدول ۱- نتایج تغییرات پارامترهای هورمونی در تاس‌ماهیان استرلیاد در مرحله آترزی

	Testosterone (ng ml^{-1})	Etradiol(ng ml^{-1})
ماهیان با اووسیت آترتیک	۱۰/٤±۰/۳	۱۱/۷±۰/٤
ماهیان با اووسیت طبیعی	۲۸/۵±٤/۵*	۱۹/۲±٤/۳*

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.*نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در بین تاس ماهیان استرلیاد در وضعیت نرمال و در حال آترزی می باشد.

جدول ۲- نتایج تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی در تاس‌ماهیان استرلیاد در مرحله آترزی

	Phosphorous (mg dl^{-1})	Total protein (g dl^{-1})	Cholesterol (mg dl^{-1})	Calcium (mg dl^{-1})	Triacylglyceride (mg dl^{-1})
ماهیان با اووسیت آترتیک	۱۱/٤۳±۱/۳۵	۲/٦±۰/۳۹	۵۲/۳۳±۳/۲	۷/۲±۱/۰٤	۱۰۱/۵±۱۹/۱
ماهیان با اووسیت نرمال	۱۲/۷±۵/۷	۲/٦±۰/۷۹	۸۳/۳±۵/۹ *	۹/۱۲ ± ۳/۲۷ *	۱۵۹/۱۱± ۱۵/۳*

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. .*نشان دهنده اختلاف معنی دار در بین تاس‌ماهیان استرلیاد در وضعیت نرمال و در حال آترزی می‌باشد.

بحث

استفاده از استروئیدهای جنسی شیوه قابل اطمینانی برای جداسازی ماهیان ماده با تخمک سالم و طبیعی از ماهیان با تخمدان در حال آترزی است. توانایی جداسازی بین ابتدا و میانه آترزی برای آبزی‌پروران از اهمیت کمی برخوردار است، اما بروز یا عدم بروز پدیده آترزی بسیار برای پرورش دهندگان حائز اهمیت است. احتمال بروز تشخیص اشتباه تخمدان سالم از تخمدان آترزی را بسیار کاهش می‌دهد. به طوری که ماهیان ماده با تخمک سالم که به‌عنوان آترزی تعیین شده را می‌توان برای استحصال خاویار در سال بعد مورد استفاده قرار داد، این در حالی است که ماهیانی که به اشتباه در حال آترزی طبقه بندی شده‌اند، خاویار پایین‌تر از استاندارد تولید می‌نمایند و یا اینکه اصلا خاویار تولید نمی نمایند. غلظت تستوسترون معمولا در انتهای زرده سازی در ماهیان خاویاری در مقایسه با استرادیول بالاتر است [۱٦، ۱۷]. اگرچه نقش اصلی استرادیول توسعه رسیدگی در ماهیان است، اما تستوسترون نیز در فعالیت‌های دیگر مانند فیدبک‌های مثبت و منفی کنترل‌کننده محور هیپوتالاموس – هیپوفیز – گناد و رفتارهای مهاجرت در ماهیان نقش ایفا می نماید [۱]. تستوسترون نقش بسیار مهمی در مرحله پس از زرده سازی تا پایان و تکمیل پروسه رسیدگی نقش ایفا می‌نماید [۱۱]. کاهش معنی‌دار در میزان تستوسترون در انتهای مرحله زرده‌سازی می‌تواند منعکس‌کننده ساخته شدن استرادیول از تستوسترون باشد. کاهش در تولید استرادیول می‌تواند باعث باقی ماندن فولیکول تخمدانی در مرحله پس از زرده سازی گردد و می‌تواند منجر به بروز پدیده آترزی در فولیکول‌های تخمدانی گردد. کاهش در تولید استرادیول و تستوسترون در مطالعه حاضر همزمان با بروز پدیده آترزی در تاس‌ماهیان استرلیاد بود. به طوری که میزان هورمون استرادیول از۱۹/۲±٤/۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر در ماهیان استرلیاد مرحله زرده‌سازی به ۱۱/۷±۰/٤ در تاس-ماهیان با فولیکول‌های آترتیک رسید. این میزان برای هورمون تستوسترون تغییری از ۲۸/۵±٤/۵ در مرحله زرده سازی به ۱۰/٤±۰/۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر در تاس‌ماهیان با فولیکول‌های آترتیک رسید. این امر در مطالعه Talbott و

Archive of SID

www.SID.ir

همکاران در سال ۲۰۱۱ در تاس‌ماهیان سفید *Acipenser transmontanus* نیز گزارش شده بود [۱۳]. آن‌ها از تستوسترون به عنوان بهترین شاخص برای جداسازی تاس-ماهیان سفید با سیکل تخمدانی طبیعی از ماهیان در حال بروز آترزی یاد نمودند. همچنین سطوح تستوسترون و استرادیول در مطالعه‌ای به زیر ۱ و ۰/۵ نانوگرم بر میلی لیتر پس از بروز علائم آترزی گزارش شد (۱۱). همچنین بیان داشتند که کاهش سریع در سطوح استروئیدهای جنسی پلاسما در شروع پدیده آترزی همزمان با هایپرتروفی سلول-های گرانولوزا و هضم کوریون است. در مطالعه دیگر، کاهش در سطوح استروئیدهای جنسی پلاسما پنج هفته پیش از بروز پدیده آترزی در تاس‌ماهیان سفید پرورشی گزارش شد [۱۷].

از این رو مطالعه غلظت استروئیدهای جنسی پیش و پس از بروز پدیده آترزی می‌تواند اطلاعات سودمندی پیرامون علل این پدیده در اختیار قرار دهد. استفاده از تکنیک‌های تشخیصی بر پایه متابولیت‌های پلاسما، می‌تواند شیوه مناسبی برای مدیریت پرورش مولدین خاویاری پرورشی برای بحث تکثیر و تولید خاویار باشد. استفاده از کلسیم و متابولیت‌های در ارتباط با ویتلوژنین (تری‌گلیسرید، کلسترول، کلسیم و فسفر پلاسما) به عنوان جایگزین اندازه-گیری میزان ویتلوژنین در چرخه تولید مثلی ماهیان خاویاری مانند سایر ماهیان گزارش شده است [۱۲].

ویتلوژنین یک لیپوفسفوپروتئین غنی از کلسیم می‌باشد، از اینرو در زمان سنتز آن مقادیر زیادی از کلسیم به درون پروتئین انتقال می‌یابد [۹]. این کلسیم‌های باند شده به ویتلوژنین به منظور افزایش حلالیت این پروتئین بزرگ در خون می‌باشند [۸].

پیش از این در چندین بررسی افزایش همزمان کلسیم و غلظت ویتلوژنین پلاسما به دنبال تحریک استروژنی نشان داده شده بود [٤]. کلسیم به گروه‌های فسفات مولکول ویتلوژنین متصل می‌باشد [۱۵]، از این‌رو انتظار می‌رفت همراه با افزایش غلظتALP، سطوح کلسیم نیز در پلاسما افزایش یابد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تغییرات بیوشیمیایی و هورمونی در ارتباط با پدیده آترزی می‌تواند به صورت موفقیت‌آمیزی در تشخیص بروز فولیکول‌های تخمدانی آترزی نسبت به فولیکول‌های طبیعی به کار رود و جایگزینی برای شیوه تهاجمی بیوپسی با جمع‌آوری مقدار ناچیزی نمونه خون از ماهیان می‌باشد و این مطالعه ضرورت انجام مطالعات آینده در ارتباط با مدل‌سازی و بررسی تغییرات رگرسیونی پارامترهای ذکر شده در این مطالعه را برای ایجاد دستورالعمل کاربردی در پرورش و تولید خاویار این ماهیان به اثبات می‌رساند.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله برخود لازم می‌دانند از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی جهت در اختیار قرار دادن ماهیان این مطالعه به ویژه آقایان عباسعلی‌زاده، علیزاده و حصیرباف که در انجام این تحقیق نهایت همکاری را داشتند، تقدیر و تشکر به عمل آورند.

منابع

1- Bayunova L., Barannikova I., Semenkova T. (2002), Sturgeon stress reaction in aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 397-404.

2- Birstein V.J. (1993), Sturgeon and paddlefishes: threatened fishes in need of conservation. *Conservation Biology*, 7: 773-787.

3- Bromley P.J., Ravier C., Witthames P.R. (2000), The influence of feeding regime on sexual maturation, fecundity and atresia in first-time spawning turbot. *Journal of Fish Biology*, 56: 264-278.

Archive of SID
www.SID.ir

4- Carragher J.F., Sumpter J.P. (1991), The mobilization of calcium from calcified tissues of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) induced to synthesize vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99A: 169-172.

5- Casenave J.L., Kroll K.J., Van Eenennaam J.P., Doroshov S.I. (2003), Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon. *Aquaculture*, 221: 645-656.

6- Chebanov M.S., Galich E.V. (2013), Sturgeon hatchery manual. FAO Fisheries *and* Aquaculture Technical Paper. No. 558. *Ankara*, FAO. 297 pp.

7- FAO (2010), http://www.fao.org/cultured aquatic species information programmers *Huso huso*.

8- Follett B. K., Redshaw M. R. (1974), The physiology of vitellogenesis. In: Lofts, B. (ed) Physiology of the amphibia, vol 2. Academic Press, 308p.

9- Gillespie D.K., Peyster A.D. (2004), Plasma calcium as a surrogate measure for vitellogenin in fathead minnows (*Pimephales promelas). Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58: 90-95.

10- IUCN (2012), IUCN red list of threatened species. www.iucnredlist.org.

11- Kime D. (1993), Classical and non-classical reproductive steroids in fish. *Revista in Fish Biology*, 3: 160-180.

12- Linares-Casenave J., Van Eenennaam J.P., Doroshov S.I. (2002), Ultrastructural andhistological observations on temperature-induced follicular ovarian atresia in thewhite sturgeon. *Journal Applied Ichthyology*, 18: 382-390.

13- Linares-Casenave J., Kroll K.J., Van Eenennaam J.P., Doroshov S.I. (2003), Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon. *Aquaculture*, 221: 645-656.

14- Mananos E., Duncan N., Mylonas C.C. (2009), Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. In: Cabrita,E., Robles,V., Herraez, P. (eds.), methods in reproductive aquaculture, marine and freshwater species, CRC press pp: 3-81.

15- Monteverdi G.H., Di Giulio R.T. (1999), An enzyme-linked immunosorbent assay for estrogenicity using primary hepatocytes cultures from the channel catfish (*Octalurus punctatus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37: 355-375.

16- Webb M.A.H., Van Eenennaam J.P., Feist G.W., Linares-Casenave J., Fitzpatrick M.S., Schreck C.B., Doroshov S.I. (2001), Effects of thermal regime on ovarian maturationand plasma sex steroids in farmed white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*, 201: 137-151.

17- Webb M.A.H., Feist G.W., Schreck C.B., Foster E.P., Fitzpatrick M.S. (2002), Potential classification of sex and stage of gonadal maturity of wild white sturgeon using blood plasma indicators. *Transection in American Fisheries Society*, 131: 132-142.

18- Williot P., Bronzi P., Arlati G. (1993), A very brief survey of sturgeons and prospects of freshwater sturgeon farming in Europe (EEC). In: Kestemont P., Billard R. (eds.), Aquaculture of freshwater species except salmonids. *European Aquaculture Society*, pp: 32-36.

Archive of SID

www.SID.ir