

## تغییرات اسموتیکی پلاسمای خون طی مراحل تکوینی اووسیت ماهی سفید دریای خزر

*Rutilus frisii kutum*بهروز حیدری\*<sup>۱</sup>، نادر شعبانی پور<sup>۱</sup> و احمد سواری<sup>۲</sup><sup>۱</sup> رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی<sup>۲</sup> خرمشهر، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، گروه بیولوژی دریا

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱۵

تاریخ پذیرش: ۸۸/۴/۳۱

## چکیده

در پژوهش حاضر روند تغییرات اسموتیکی پلاسما براساس تغییرات یونهای سدیم، پتاسیم، کلسیم، اسمولاریته و پروتئین تام پلاسمای خون طی مراحل مختلف تکوین اووسیت ماهی سفید به انضمام تغییرات قطر اووسیت مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور نمونه برداری ماهانه و خونگیری از ماهی سفید در طول دوره تولیدمثلی از مهرماه ۱۳۸۶ تا اردیبهشت ۱۳۸۷ در حوضه جنوبی دریای خزر (انزلی، استان گیلان) و رودخانه های آن (به دلیل آنادروموس بودن ماهی) انجام گرفت. خونگیری بلافاصله از عروق دمی در محل صورت گرفت. برای اندازه گیری یونهای سدیم و پتاسیم از دستگاه شعله سنج، کلسیم از دستگاه مولتی آنالیزر و اسمولاریته از دستگاه اسمومتر استفاده گردید. پروتئین تام نیز با روش برادفورد اندازه گیری شد. براساس مشاهدات بافت شناسی، رشد اووسیتها به شش مرحله تقسیم شد: (۱) رشد اولیه اووسیت، (۲) دوره سنجی، (۳) آلونل کورتیکال، (۴) زرده سازی، (۵) رسیدگی و (۶) تخم ریخته. نتایج نشان داد که بیشترین تغییرات کاهش یونهای سدیم، پتاسیم و اسمولاریته در مرحله رسیدگی اووسیت ماهی همزمان با پدیده آنگیری رخ می دهد به طوری که کمترین میزان سدیم  $120 \pm 10/12$  میلی اکی والان در لیتر، پتاسیم  $0/45 \pm 0/08$  میلی اکی والان در لیتر) و اسمولاریته  $238/9 \pm 27/72$  میلی اسمول در لیتر) مقارن با مرحله رسیدگی اووسیت به دست آمد که اختلاف معنی داری را نیز با مراحل قبلی تکوین اووسیت نشان دادند ( $P < 0.05$ ). تغییرات یون کلسیم و پروتئین تام طی مراحل مختلف رشد تخمدان نشان دهنده همبستگی مثبت و قوی این دو فاکتور ( $R = 0.88$ ) می باشد به طوری که از مرحله آلونل کورتیکال تا مرحله رسیدگی ابتدایی تقریباً روند صعودی داشتند هر چند به لحاظ آماری اختلاف معنی داری در آنها دیده نشد ( $P > 0.05$ ) اما در مرحله رسیدگی نهایی و مرحله تخم ریخته روند نزولی معنی داری را درپیش گرفتند ( $P < 0.05$ ). بطور کلی، به دلیل حضور تخمهای بسترزی در ماهی سفید، پدیده آنگیری در مراحل رسیدگی به میزان کمتر رخ می دهد و فرایند زرده سازی عامل اصلی افزایش قطر اووسیت طی مراحل تکوینی اووسیت است. همچنین آنالیز داده ها نشان می دهد که در جریان آنگیری اووسیت ماهی سفید یون پتاسیم نقش اصلی و یون سدیم نقش فرعی را بازی می کنند.

واژه های کلیدی: ماهی سفید، تکوین اووسیت، آنگیری.

\* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۱۳۱-۳۲۴۳۶۳۰، پست الکترونیکی: bheidari@guilan.ac.ir

## مقدمه

یابند و گرانولهای زرده (ویتلوژنین) در اووسیتهای ماهیان استخوانی انباشته می شوند. به دنبال کامل شدن زرده سازی، اووسیتهای متوقف شده در مرحله پروفاز میوز یک تحت تأثیر فاکتورهای مناسب محیطی مانند دما که در واقع

در پاسخ به محرکات محیطی بخصوص دما و فتوپریود اووسیتهای واقع در مرحله ابتدایی تکوین (پیش از زرده سازی) به فاز زرده سازی وارد می شوند که در طی آن، اووسیتها بزرگ می شوند، لایه های فولیکولی توسعه می

حجیم شدن اووسیتها، پدیده آبگیری است. در واقع، رقیق شدن محتویات اووسیتها (آبگیری زیاد) در این گونه ها یک مکانیسم سازشی جهت صعود به سطوح بالایی لایه های آب، امکان تبادل گازها و پراکنده شدن به وسیله جریانهای آبی است تا درصد ماندگاری آنها بالا رود. حال آنکه در دیگر ماهیان که در رودخانه ها تخم ریزی می کنند و دارای تخمهای بسترزی هستند مسئول اصلی بزرگ شدن سلول زرده سازی می باشد همچنان که Ravaglia and Maggese (۲۰۰۲) زرده سازی را تا ۹۰ درصد مسئول افزایش چشمگیر در حجم اووسیت مارماهی مردابی *Synbranchus marmoratus* می دانند (۲۳).

یکی از فاکتورهای دخیل در فرآیند آبگیری اووسیتها پروتئینهای زرده می باشد به طوری که در گونه های بسترزی که آبگیری اووسیتها متوسط است، تجزیه محدودتری از پروتئینهای زرده که عمدتاً پروتئین ویتلوزنین می باشد، جهت ایجاد نیروی کششی آب به داخل اووسیت صورت می گیرد (۱۹). به همین خاطر است که نمای کاملاً شفاف از اووسیتهای رسیده ماهیان دریایی همچون کفال طلایی (۱) که در آنها تجزیه پروتئین کامل است، بوجود می آید در حالی که چنین شفافیتی در اووسیتهای رسیده ماهیان رودخانه ای دیده نمی شود (۱۷). بنظر می رسد که عوامل تأثیرگذار در فرآیند آبگیری، (۱) اسمولیتهای آلی که به شکل آمینواسیدهای آزاد که عمدتاً از تجزیه پروتئینهای زرده حاصل می شود (۱۳ و ۳۱) و (۲) یونهای غیر آلی (همچون سدیم، پتاسیم، کلر) که با توجه به گونه ماهی، نقش هر یک از آنها به نظر متفاوت می رسد (۱۷).

ماهی سفید، بومی دریای خزر بوده و به لحاظ شیلاتی یکی از مهمترین ماهیان اقتصادی حوزه جنوبی دریای خزر است که طی مهاجرت آنادرومیک از دریای خزر به رودخانه های حوزه جنوبی، تخم ریزی را در رودخانه ها انجام می دهد (۲۲). با توجه به اهمیت بالای این ماهی

اولین راه انداز جهت ترشح گنادوتروپینها هستند، میوز را از سر گرفته و وارد فاز رسیدگی می شوند (۶). فرآیند رسیدگی اووسیتها در ماهیان استخوانی مجموعه ای پیچیده از تغییرات سیتوپلاسمی و هسته ای است که از آن می توان به حوادث مورفولوژیکی مانند یکی شدن گرانولهای زرده و یکپارچگی قطرات چربی (در صورت وجود)، مهاجرت ژرمینال وزیکول (GVM)، شکسته شدن ژرمینال وزیکول (GVBD)، پارگی فولیکولها، خروج اووسیت از پوشش فولیکولی در زمان تخمک گذاری و شفاف شدن اووپلاسم قبل از تخم ریزی نام برد (۳۱). رسیدگی نهایی اووسیت در بسیاری از ماهیان استخوانی همراه با افزایش در حجم اووسیت و محتویات آب آن می باشد (فرایندی که بعنوان آبگیری اووسیت نامیده می شود) بهمین دلیل بیشترین تغییرات اسموتیکی پلاسما خون هنگام رشد تخمدان در مراحل رسیدگی تکوین اووسیت رخ می دهد (۳۱ و ۳۳).

فرایند آبگیری ویژگی منحصر به فرد رسیدگی اووسیتها در بسیاری از ماهیان استخوانی می باشد. این تغییرات در محتویات آب اووسیت از نسبت کم در ماهیان آب شیرین و یوری هالین تا چندین برابر در گونه های دریایی دیده می شود. افزایش زیاد در حجم اووسیت (۳/۱ تا ۸/۴ برابر) به گونه های دریایی نسبت داده می شود که تخمهای پلاژیک را در آب رها می کنند در حالی که افزایش کمتر در حجم اووسیت (۱ تا ۳ برابر) در گونه هایی مشاهده می شود که تخمهای بسترزی و غیرشناور تولید می کنند. این گونه ها به ترتیب ستون زی (pelagophil) و بسترزی (benthophil) نامیده می شوند (۵).

سهم نسبی پروتئینهای زرده در مقایسه با پدیده آبگیری برای حجیم شدن اووسیت بستگی به اکولوژی گونه مورد نظر و استراتژی تولیدمثلی آن دارد (۳۱) به طوری که ماهیان دریایی مانند کفال طلایی و کفال خاکستری که دارای تخمهای شناور و پلاژیک هستند، مسئول اصلی

کاتیونها و پروتئین تام انجام گرفت که بدین منظور، بخشی از تخمدان در محلول بوئن فیکس شد. آماده سازی بافتی آن طبق روش Shabanipour and Heidari (۲۰۰۴) انجام گرفت (۲۷).

**اندازه گیری کاتیونها :** اندازه گیری یونهای سدیم و پتاسیم با روش شعله سنجی و با دستگاه Flame photometer 310C انجام و کلسیم به شیوه رنگ سنجی با استفاده از Technicon RA-1000 Analyzer و با کیت MAN اندازه گیری شد.

**اندازه گیری اسمولاریته و پروتئین تام:** اندازه گیری اسمولاریته پلاسمای خون توسط دستگاه اسمومتر (Osmometer, Automatic Roebing) در مراحل مختلف رشد تخمدان انجام گرفت. از روش Bradford (۱۹۷۶) برای بررسی و اندازه گیری غلظت پروتئین تام با استفاده از آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin(BSA) به عنوان محلول استاندارد در مراحل مختلف تکوین اووسیت استفاده شد (۴).

آنالیز داده ها و مقایسه آماری: برای اندازه گیری قطر متوسط اووسیتها توسط میکرومتر چشمی در زیر میکروسکوپ نوری در هر مرحله از تکوین اووسیت تعداد ۳۰ اووسیت مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات در قطر اووسیت، اسمولاریته و کاتیونهای پلاسمای خون به همراه پروتئین تام به وسیله تست یک طرفه ANOVA و آزمون Duncan با سطح اطمینان ۹۵ درصد ارزیابی شدند. همچنین رابطه بین فاکتورها از طریق همبستگی آنالیز شد. تمام آنالیزها از طریق نرم افزار SPSS و EXCEL در محیط ویندوز کامپیوتر انجام گرفت.

## نتایج

بر اساس مشاهدات بافت شناسی مراحل رشد تخمدان شامل سه فاز اصلی (۱) فاز رشد اولیه یا پیش زرده سازی که شامل دو مرحله رشد اولیه اووسیت و دوره‌ستکی می

برای ساکنین حوضه جنوبی دریای خزر شناخت هر چه بیشتر روند تولیدمثل این ماهی جهت ایجاد شرایط اکولوژیکی مشابه با محیط طبیعی به منظور تکثیر مصنوعی و حتی بازسازی ذخایر آن در دریای خزر امری ضروری به نظر می رسد. لذا هدف مطالعه حاضر بررسی تغییرات یونهای سدیم، پتاسیم، کلسیم، پروتئین تام و اسمولاریته پلاسمای خون و نقش آنها در ماهی سفید دریای خزر طی مراحل مختلف رشد تخمدانی در دو محیط اکولوژیکی لب شور (دریای خزر) و آب شیرین (رودخانه) می باشد.

## مواد و روشها

**نمونه برداری و خونگیری از ماهی:** نمونه برداری از ماهی سفید به صورت ماهانه از مهرماه ۱۳۸۶ لغایت اردیبهشت ۱۳۸۷ طی دوره تولیدمثل ماهی انجام گرفت. به دلیل آنادروموس بودن ماهی سفید بخشی از نمونه برداری تا قبل از مهاجرت این ماهی (از آبان تا ابتدای فروردین) در سواحل جنوبی دریای خزر (ساحل جعفرود شهرستان انزلی استان گیلان با مختصات جغرافیایی  $37^{\circ} 27' N, 49^{\circ} 33' E$ ) صورت گرفت. به دلیل ممنوعیت صید معمول این ماهی هنگام مهاجرت به رودخانه، نمونه های رودخانه ای این ماهی از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان شهید انصاری (رشت) تهیه شد. در هفته های آخر رسیدگی نهایی اووسیتها، تقریباً هر دو هفته یک بار نمونه برداری انجام می شد. به دلیل بارش شدید برف و نامساعد بودن شرایط جوی در استان گیلان امکان نمونه برداری در دی ماه میسر نبود. در مجموع ۶۶ نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت.

بلافاصله پس از صید، نمونه ها را با عصاره گل میخک (۰/۳۳ گرم در لیتر) بیهوش کرده و از رگ دمی ماهی خونگیری انجام می شود. سپس خون در آزمایشگاه سانتریفیوژ شده (دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) و پلاسمای آن در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد برای اندازه گیری کاتیونها، اسمولاریته و پروتئین تام نگهداری شد. تعیین مراحل تکوینی اووسیت به منظور بررسی بهتر تغییرات

اختلاف معنی داری ندارد ( $P>0.05$ ) و از مرحله نهایی رسیدگی روند نزولی را در پیش گرفته و به پایین ترین میزان خود در مرحله تخم ریخته می رسد ( $11/38 \pm 0/59$ ) میلی گرم در دسی لیتر ( $P<0.05$ ) (شکل ۲). حداکثر میزان کلسیم پلاسما  $13/73 \pm 0/55$  میلی گرم در دسی لیتر در نمونه برداری ۱۴ فروردین ثبت شده است.

بین غلظت پروتئین و کلسیم پلاسما ضریب همبستگی مثبت قوی ( $R=0.88$ ) وجود دارد که نشان دهنده ارتباط تنگاتنگ این دو فاکتور در مراحل مختلف تکوین اووسیتها می باشد.

سدیم پلاسما: تغییرات یون سدیم طی مراحل تکوین اووسیت تا قبل از مهاجرت ماهی به رودخانه تقریباً روند ثابتی داشت و اختلاف معنی داری بین نمونه برداریها دیده نشد ( $P>0.05$ ) اما با شروع مهاجرت و آغاز مرحله رسیدگی نهایی (نمونه برداری ۲۶ فروردین ماه) غلظت سدیم پلاسمای خون دچار افت شدید شده ( $142/50 \pm 2/60$ ) میلی اکی والان در لیتر در ۱۴ فروردین در مقایسه با  $120 \pm 10/12$  میلی اکی والان در لیتر ۲۶ فروردین) و اختلاف معنی داری با گروههای قبلی و بعدی پیدا کرد ( $P<0.05$ ) (شکل ۳).

پتاسیم پلاسما: غلظت یون پتاسیم پلاسما از مهرماه تا آغاز نمونه برداری ماه اسفند اختلاف معنی داری نداشت (از  $2/40 \pm 0/41$  تا  $2/19 \pm 0/29$  میلی اکی والان در لیتر) ( $P>0.05$ ). از این زمان به بعد روند نزولی را در پیش گرفته به طوری که در نمونه برداری فروردین ماه میزان این یون به حداقل خود می رسد ( $0/45 \pm 0/08$ ) میلی اکی والان در لیتر در ۱۴ فروردین) و اختلاف معنی داری با ماههای قبلی داشتند ( $P<0.05$ )، در حالی که بین نمونه های فروردین و اردیبهشت اختلاف معنی داری وجود نداشت ( $P>0.05$ ) (شکل ۴).

اسمولاریته: اسمولاریته خون طی مراحل تکوین اووسیت تا انتهای زرده سازی (از مهرماه تا اسفندماه) روند ثابتی

شود. اووپلاسم شدیداً بازوفیلیک و نسبت بالای هسته به سیتوپلاسم از ویژگیهای اصلی این فاز از رشد تخمدان می باشد. ۲) فاز زرده سازی که از دو مرحله آلوتل کورتیکال و زرده سازی تشکیل می شود. رشد سیتوپلاسمی اووسیت، بزرگ شدن سلول و حضور فراوان گرانولهای زرده و پیوستگی تدریجی آنها به یکدیگر در داخل اووسیت از ویژگیهای اختصاصی این فاز است. ۳) فاز رسیدگی اووسیت که رسیدگی ابتدایی و نهایی را دربر می گیرد. مهاجرت هسته به سمت قطب جانوری و شکسته شدن آن، شکل گیری توده یکپارچه زرده، آزاد شدن اووسیت از پوشش فولیکولی احاطه کننده و در نهایت تخم ریزی ماهی از ویژگیهای منحصر به فرد این فاز می باشد. به علاوه مطالعات بافت شناسی نشان می دهد که این ماهی تقریباً تا انتهای مرحله زرده سازی که اواخر اسفند ماه و اوایل فروردین ماه می باشد در دریا حاضر است و پس از آن با آغاز مرحله رسیدگی مهاجرت آنادرومیک ماهی به سمت رودخانه شروع شده و عمل تخم ریزی نیز در آنجا صورت می گیرد. همچنین در جدول ۱ میانگین فاکتورهای ارزیابی شده آورده شده است.

پروتئین تام پلاسما: همانطور که در شکل ۱ دیده می شود میزان غلظت پروتئین تام پلاسمای خون از اواخر مرحله آلوتل کورتیکال تا ابتدای رسیدگی نهایی نسبت به بقیه مراحل رشد تخمدان بیشتر بوده و اختلاف معنی داری با دیگر ماههای نمونه برداری داشتند ( $P<0.05$ ) در حالی که بین نمونه های آذر، بهمن، اسفند و ۱۴ فروردین (که بیشترین مقدار پروتئین پلاسمایی یعنی  $6/69 \pm 1/17$  گرم در دسی لیتر در ۱۴ فروردین اندازه گیری شد) اختلاف معنی داری مشاهده نگردید ( $P>0.05$ ).

کلسیم پلاسما: یون کلسیم در پلاسمای خون دچار تغییرات زیادی نمی شود. به لحاظ آماری، غلظت یون کلسیم تا رسیدگی ابتدایی اووسیت (۱۴ فروردین) همانند میزان پروتئین روند تقریباً ثابت و مشابهی را طی می کند و

قطر اووسیت به واسطه فرآیند زرده سازی دیده می شود. از مرحله زرده سازی به مرحله رسیدگی نهایی افزایش ۱/۰۹ برابری در قطر اووسیت به واسطه آبیگری دیده می شود (از ۱۳۱۴/۳ به ۱۴۳۵/۹ میکرومتر).

### بحث

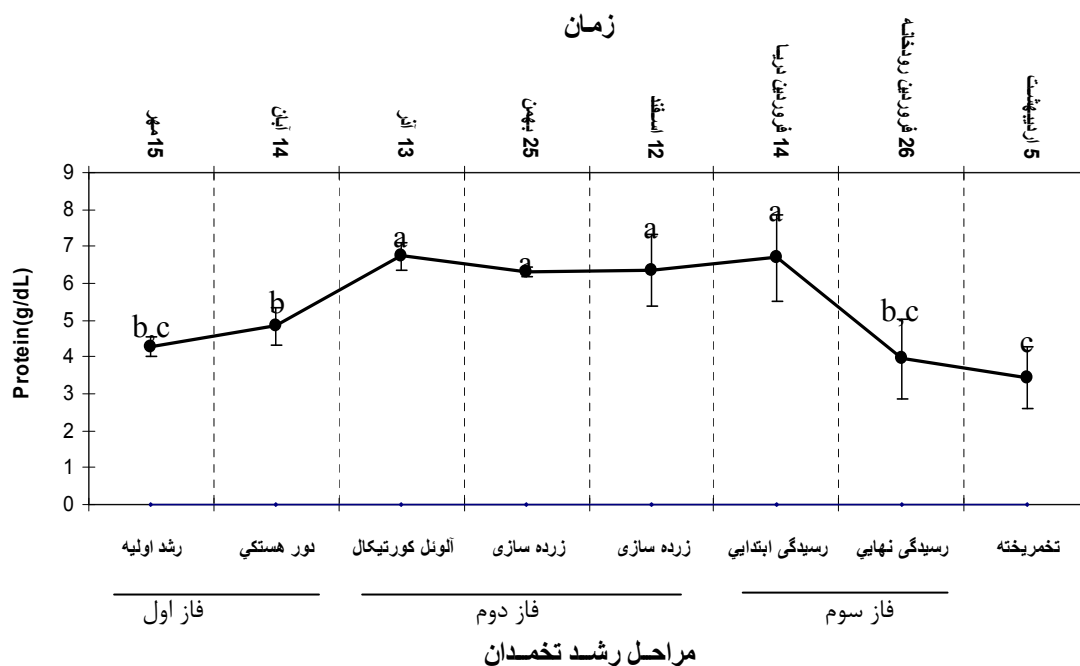
در مطالعه حاضر تغییرات اسموتیکی پلاسمای خون ماهی سفید در مراحل مختلف تکوین اووسیت همراه با تغییرات قطر اووسیت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می دهند این تغییرات بیشتر در مرحله رسیدگی اووسیت که مقارن با آبیگری سلول است رخ می دهد.

افزایش حجم اووسیت که طی مرحله زرده سازی در ماهیان استخوانی اتفاق می افتد ناشی از انباشته شدن وسیع گلبولهای زرده با منشاء خارجی می باشد (۲) همچنان که در ماهی سفید جهش بلند در افزایش قطر اووسیت (افزایش ۲/۲۸ برابری در قطر) از مرحله آلوتل کورتیکال تا انتهای مرحله زرده سازی به واسطه فرآیند زرده سازی است به طوری که با شروع زرده سازی مقدار پروتئین تام پلاسما نیز افزایش می یابد (شکل ۱).

داشت و اختلاف معنی داری دیده نشد ( $P>0.05$ ) اما با شروع مرحله رسیدگی و پس از ورود به رودخانه، غلظت اسمولاریته خون دچار افت شدید شده و اختلاف معنی داری با نمونه های قبلی پیدا کرد ( $P<0.05$ ). حداقل میزان اسمولاریته ( $238/90 \pm 27/72$  میلی اسمول در لیتر) در نمونه برداری ۲۶ فروردین ماه اندازه گیری شد (شکل ۵).

بین اسمولاریته و یون سدیم پلاسما ضریب همبستگی مثبت ( $R=0.84$ ) و همچنین بین اسمولاریته و یون پتاسیم پلاسمای خون ضریب همبستگی مثبت قوی ( $R=0.89$ ) وجود داشت در حالی که این همبستگی مثبت برای یون کلسیم و اسمولاریته کمتر بود ( $R=0.55$ ).

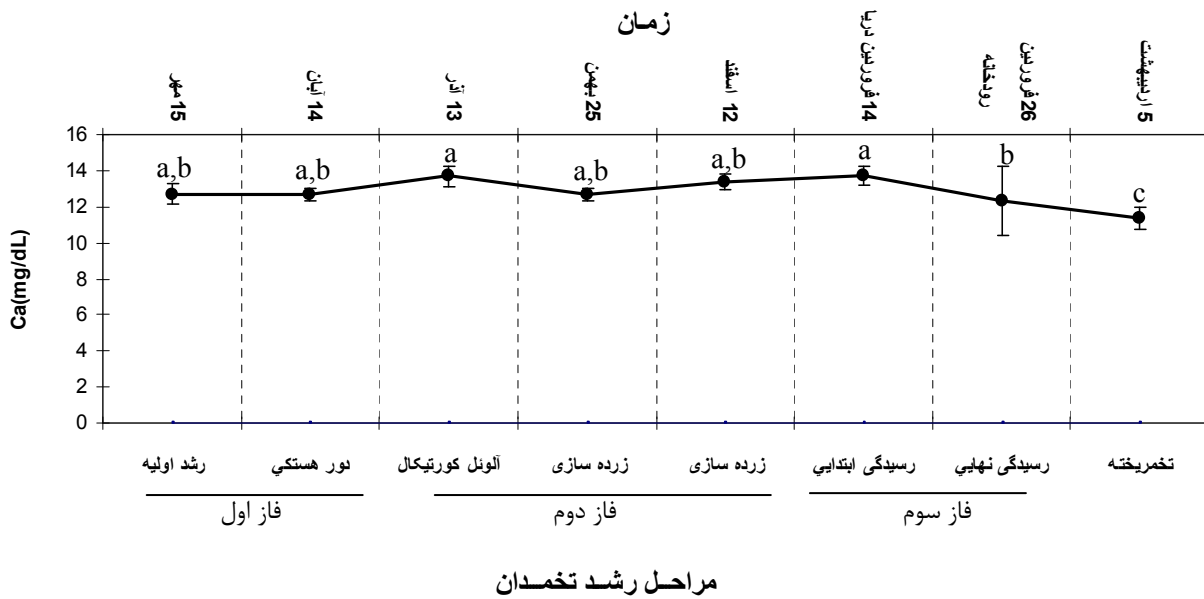
**قطر اووسیت:** شکل ۶ نشان دهنده تغییرات قطر اووسیت است به طوری که در نمونه های ماه فروردین (رودخانه) که اوج رسیدگی اووسیت می باشد بیشترین قطر ( $40/3 \pm$  میکرومتر) را به دست می آورد که اختلاف معنی داری نیز با نمونه های قبلی داشت ( $P<0.05$ ). همچنین بیشترین جهش به لحاظ افزایش قطر اووسیت با شروع زرده سازی یعنی در اواخر آذرماه دیده شد که قطر اووسیت از  $38.3 \pm 575.5$  به  $96.1 \pm 1244.4$  میکرومتر می رسد که در انتهای زرده سازی افزایش ۲/۲۸ برابر در



شکل ۱- تغییرات پروتئین طی مراحل رشد تخمدان در ماههای گوناگون.

جدول ۱- میانگین فاکتورهای ارزیابی شده در پلاسمای خون ماهی سفید طی دوره مطالعه.

مراحل رشد	اسمولاریته (mOsm/L)	Ca (mg/dL)	K (mEq/L)	Na (mEq/L)	Protein (g/dL)	GSI	قطر اووسیت (میکرومتر)	تعداد نمونه	زمان
تخمندان									
رشد اولیه	۳۸۵.۵۰±۱۲.۹۳	۱۲.۶۹±۰.۵۷	۲.۴۰±۰.۴۱	۱۴۰.۶۳±۲.۸۸	۴.۲۹±۰.۲۶	۷±۰.۰۱	۱۶۲.۳±۱۸	۸	۱۵ مهر
دوره‌سنجی	۳۸۶.۱۳±۹.۴۳	۱۲.۷۱±۰.۳۵	۲.۳۵±۰.۲۷	۱۴۱.۲۵±۲.۵۲	۴.۸۱±۰.۵۰	۷±۰.۰۰۹	۲۶۷/۱±۲۰/۱	۸	۱۴ آبان
آئول کورتیکال	۳۸۳.۵۷±۸.۸۰	۱۳.۶۹±۰.۵۴	۲.۱۱±۰.۲۵	۱۴۰.۶۳±۲.۵۰	۶.۷۴±۰.۳۷	۷±۰.۰۳	۵۷۵.۵±۳۸.۳	۸	۱۳ آذر
زرده سازی	۳۹۰.۱۴±۱۱.۰۳	۱۲.۶۷±۰.۳۳	۲.۱۹±۰.۳۹	۱۴۱.۷۱±۲.۳۱	۶.۳۰±۰.۱۳	۱۲±۲۹.۵۸	۱۲۴۴.۳±۹۶.۱	۸	۲۵ بهمن
زرده سازی	۳۹۷.۴۳±۹.۱۰	۱۳.۳۶±۰.۲۳	۱.۹۶±۰.۰۹	۱۲۵.۵۷±۲.۱۴	۶.۳۶±۰.۹۸	۱۸±۰.۰۱	۱۳۱۴.۳±۸۷.۳	۸	۱۲ اسفند
رسیدگی ابتدایی	۳۲۳.۶۳±۹.۰۹	۱۳.۷۳±۰.۵۵	۰.۲۵±۰.۰۸	۱۲۴.۵۰±۲.۶۰	۶.۶۹±۱.۱۷	۱۸±۰.۰۲	۱۳۲۱.۷±۳۴.۳	۸	۱۴ فروردین دریا
رسیدگی نهایی	۲۳۸.۹۰±۲۷.۷۲	۱۲.۳۶±۱.۹۳	۰.۵۳±۰.۱۷	۱۲۰.±۱.۱۲	۳.۹۵±۱.۰۸	۲۰±۰.۰۰۹	۱۴۳۵.۹±۴۰.۳	۱۰	۲۶ فروردین رودخانه
تخم‌ریخته	۲۶۶.۶۳±۱۶.۱۳	۱۱.۳۸±۰.۵۹	۰.۷۱±۰.۰۹	۱۳۵±۲.۸۴	۳.۴۴±۰.۸۳	۲±۰.۰۰۵	-	۸	۵ اردیبهشت



شکل ۲- تغییرات یون کلسیم پلاسما طی مراحل رشد تخمدان در ماههای گوناگون.

به عبارتی دیگر اسمولاریته کمتر خون نسبت به داخل سلول ایجاد می شود (۹).

رقیق شدن محتوای سلول در ماهی سفید در مرحله رسیدگی، پس از مهاجرت این ماهی از دریا به رودخانه یعنی با پایان زرده سازی اتفاق می افتد. مطابق انتظار، روند تغییرات یونهای سدیم، پتاسیم و کلسیم در پلاسما خون در مراحل مختلف تکوین اووسیت نشان می دهد که یون سدیم و کلسیم تا رسیدگی ابتدایی متحمل تغییرات زیادی نشده و فقط در مرحله رسیدگی نهایی سطح آنها کم شده و اختلاف معنی داری با گروههای قبلی پیدا کردند ( $P < 0.05$ ) (شکل ۲ و ۳) در حالی که پتاسیم این روند نزولی را از اوایل فرودین ماه و با شروع مرحله رسیدگی آغاز کرده و دچار افت شدید در مرحله رسیدگی می شود (شکل ۴). اسمولاریته پلاسما که بیشتر متأثر از غلظت یونهای سدیم و پتاسیم است روندی مشابه با پتاسیم را طی می کند (شکل ۵).

تغییرات یونهای غیرآلی در پلاسما ماهی سفید می تواند بیانگر این نکته باشد که یون اصلی دخیل در فرایند آبگیری اووسیتها یون پتاسیم است به طوری که کاهش تقریباً ۴/۳

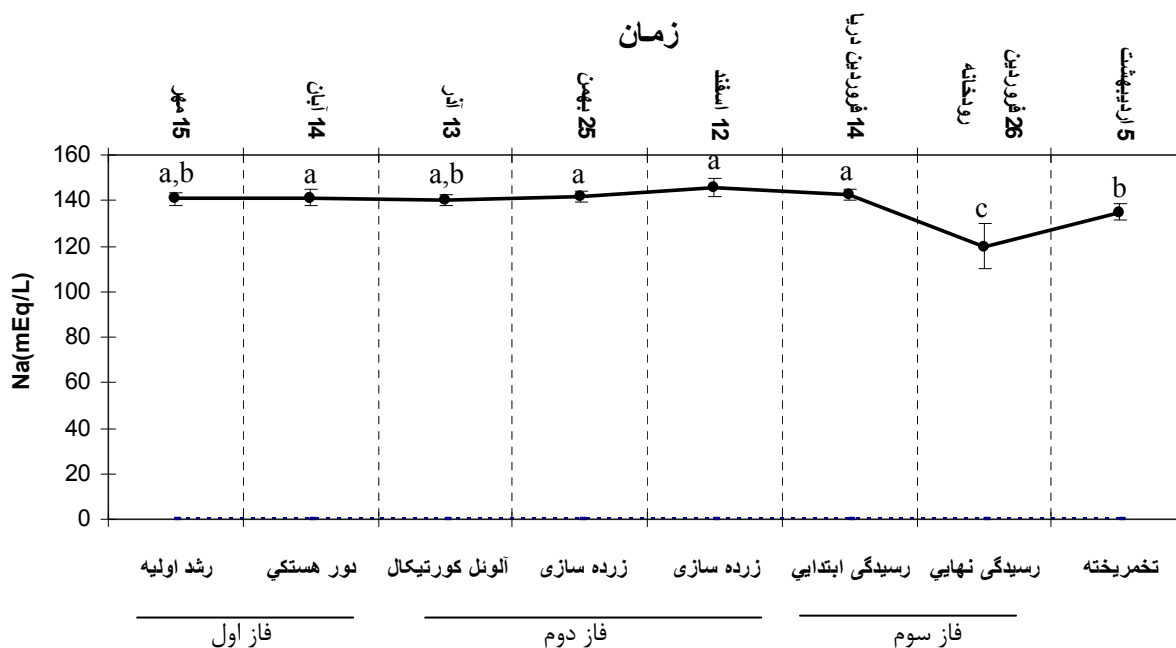
چنین افزایشی در پروتئین پلاسما ماهی قنات سرچربی (Fathead minnow) طی رشد تخمدان در اثر القای ویتلوژنین نیز دیده شده است (۱۱). در ماهی سفید نیز زرده سازی باعث افزایش ۲/۲۸ برابری حجم اووسیت شده و مسئول اصلی حجیم شدن اووسیت عامل زرده سازی است (قطر اووسیت از ۵۷۵/۵ به ۱۳۱۴/۳ میکرون رسیده بود).

پدیده آبگیری توسط اووسیت در مرحله رسیدگی باعث بزرگ شدن آنها می شود. آبگیری در اووسیتهای پلاژیک نسبت به اووسیتهای بسترزی بسیار بیشتر اتفاق می افتد. این اتفاق در اووسیتهای پلاژیک حتی به بیش از ۹۰ درصد هم می رسد در حالیکه در اووسیتهای بسترزی این مقدار خیلی کمتر است (۹، ۱۰، ۱۶، ۲۰، ۲۴ و ۲۵).

آبگیری در اووسیت ماهی سفید تنها موجب افزایش ۱/۰۹ درصدی قطر اووسیت از انتهای زرده سازی تا انتهای مرحله رسیدگی می شود. نیروی کششی جهت جذب آب به وسیله اووسیتها واقع در مرحله رسیدگی در اثر هایپراسمولاریتی داخل سلول نسبت به پلاسما خون و یا

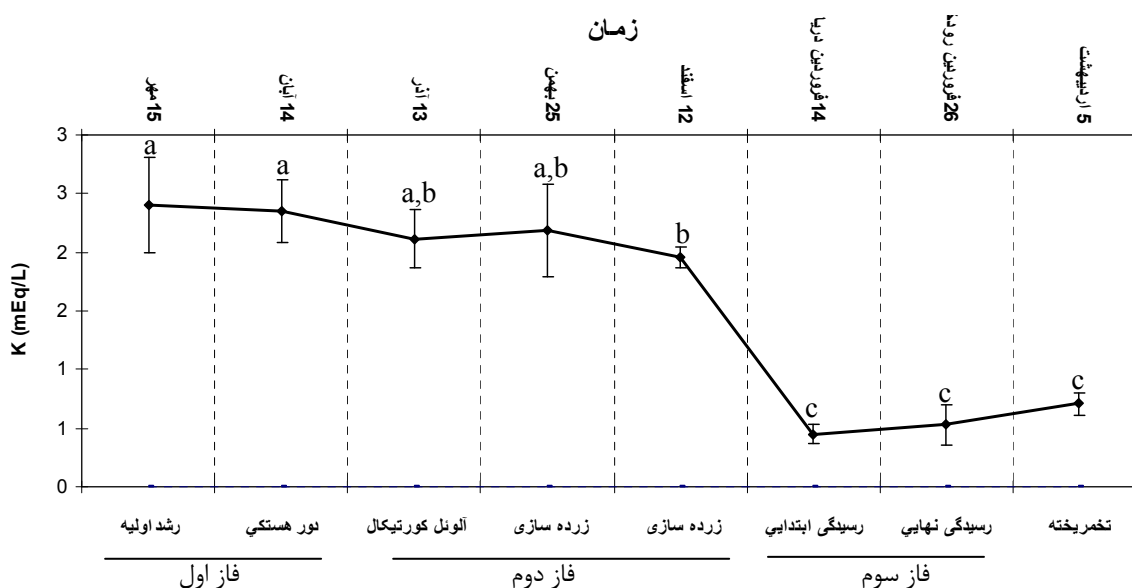
ضعیف کلسیم و اسمولاریته ( $R=0.55$ ) نشان دهنده این موضوع می باشد. پس پتاسیم و سدیم به ترتیب به عنوان اسمولیت‌های اصلی و فرعی در آبگیری اووسیت‌های ماهی سفید ایفای نقش می کنند.

برابری این یون در برابر کاهش تقریباً ۱/۲ یون سدیم نقش مهم تر را اسمولیت پتاسیم در آبگیری اووسیت ایفاء می کند. همچنین همبستگی مثبت بیشتر پتاسیم و اسمولاریته ( $R=0.89$ ) نسبت به سدیم و اسمولاریته ( $R=0.84$ ) این مطلب را نیز تأیید می کند. کلسیم نقش کمتری در آبگیری سلول به عهده دارد که همبستگی مثبت



### مراحل رشد تخمدان

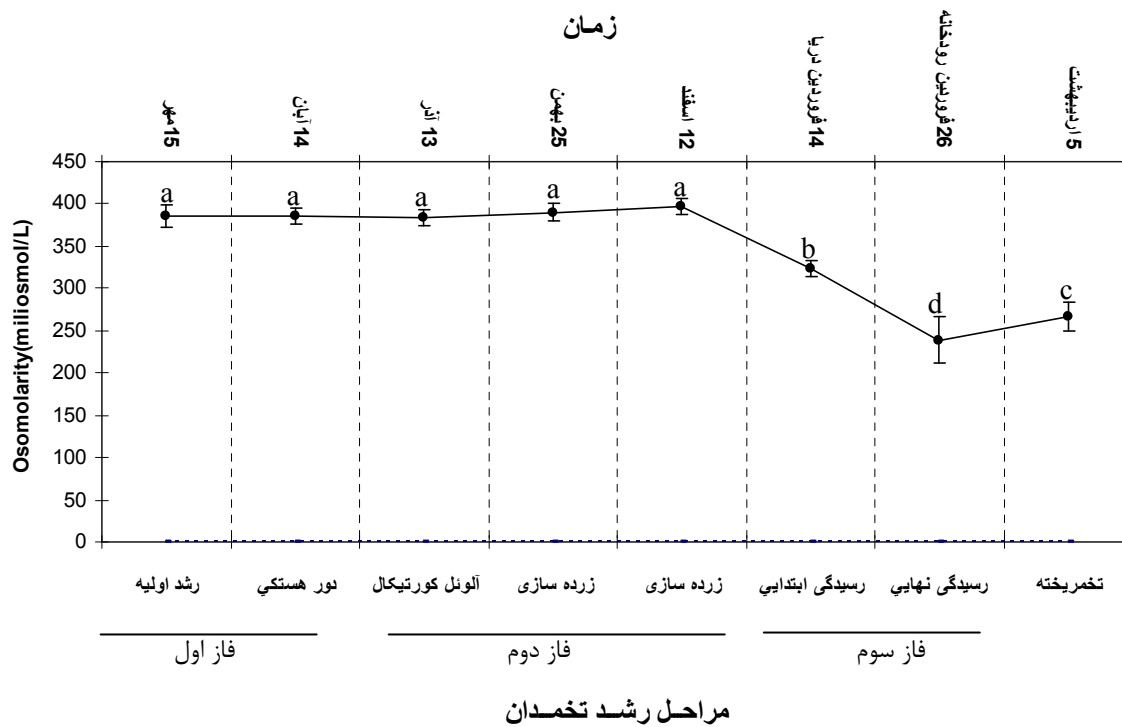
شکل ۳- تغییرات یون سدیم پلاسما طی مراحل رشد تخمدان در ماههای مختلف.



### مراحل رشد تخمدان

شکل ۴- تغییرات یون پتاسیم پلاسما طی مراحل رشد تخمدان در ماههای مختلف.



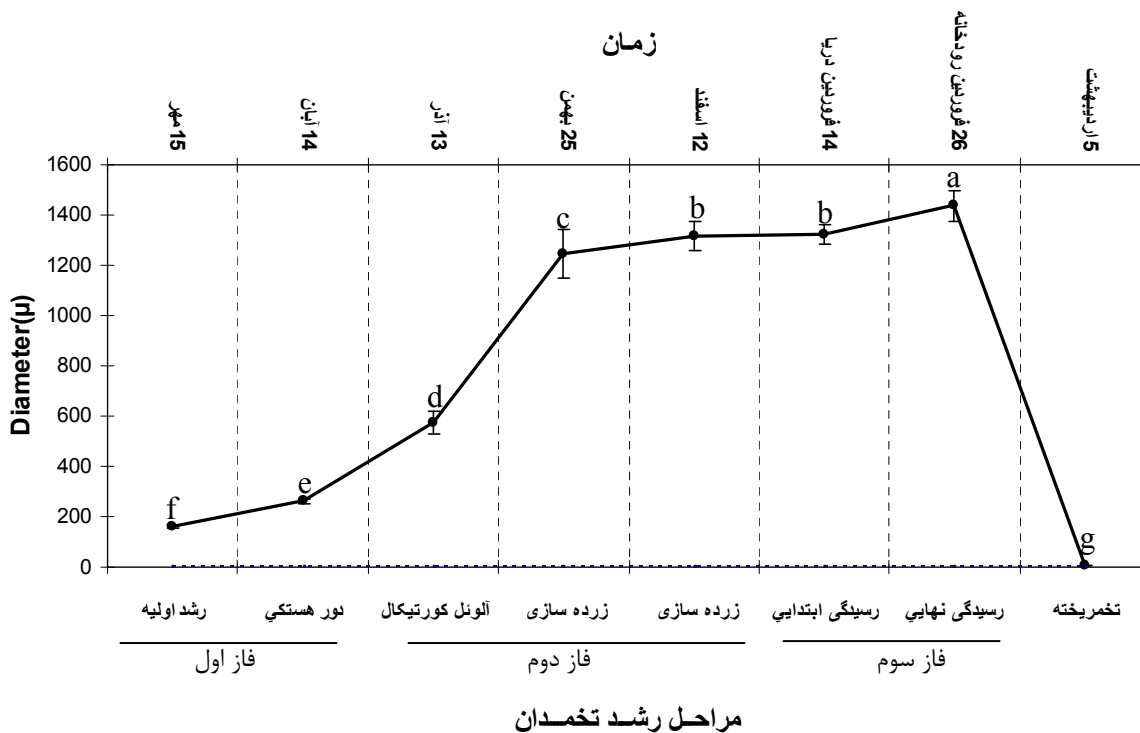


شکل ۵- تغییرات اسمولاریته پلاسما طی مراحل رشد تخمدان در ماههای مختلف سال.

ماهی کاد آتلانتیک *Gadus morhua* (۲۹) نقش اسموتیک کلر در آبگیری اووسیت نسبت به پتاسیم بیشتر بوده است. همچنین غلظت یون سدیم در کفال خاکستری بسیار زیاد بوده هر چند که مقدار آن طی آبگیری اووسیت تغییر نمی یابد (۳۳). به نظر می رسد که شرکت یونهای سدیم و پتاسیم به عنوان یک و یا دو اسمولیت غالب در اووسیت ماهیان هنگام آبگیری، تا حدودی به تفاوت در شوری مکانهای تخم ریزی انتخاب شده توسط ماهیان استخوانی برگردد (۶).

پایین آمدن غلظت یونهای سدیم و پتاسیم و حتی کلسیم و به تبع آنها وقوع هیپواسمولاریتی در پلاسمای خون ماهی سفید ممکن است بیانگر افزایش آنها در داخل سلول اووسیت و اووپلاسم آن باشد که این اتفاق موجب اسموز اجباری آب از محیط بیرون به سمت داخل سلول و در نتیجه آبگیری آن می شود یا به عبارت دیگر هیپراسمولاریتی در داخل سلول رخ می دهد.

افزایش دو برابری غلظت یون پتاسیم نسبت به سدیم در داخل اووسیت در هنگام رسیدگی ماهی کیلی فیش *Fundulus heteroclitus* موجب شده که اسمولیت پتاسیم عامل اصلی و تأثیرگذار در آبگیری اووسیت باشد (۱۲) و (۳۲) در حالی که در ماهی شیرین (Sweetfish (ayu) *Plecoglossus altivelis* که یک ماهی آمفی دروموس نیز هست، یون سدیم، اسمولیت غالب کاتیونی می باشد (۶). در برخی گونه های پلاژیک همچون کفشک ماهی *Pleuronectes platessa* (۷)، *Microstomus kitt* (۲۸)، کروکر آتلانتیک *Micropogonias undulates* (۱۸)، قزل آلای دریایی خالدار *Cynoscion nebulosus* (۱۸)، باس سیاه دریایی *Centopristis striata* (۲۶) و سیم دریایی سرطلابی (Gilthead seabream) *Sparus aurata* (۸) یون پتاسیم نقش اصلی اسموتیکی را در آبگیری اووسیت بازی می کند. در دیگر گونه های پلاژیک مانند کفال خاکستری *Mugil cephalus* (۳۳)،



شکل ۶- تغییرات قطر اووسیت طی مراحل رشد تخمدان در ماههای گوناگون.

مولکول ویتلوژنین به لحاظ ساختاری یک پروتئین غنی شده با فسفولیپید و کلسیم است. وقتی که سنتز ویتلوژنین به واسطه هورمونهای استروئیدی القاء شود مقادیر زیادی از یون کلسیم در این پروتئین شرکت می کند و به گروههای منفی فسفات این مولکول پیوند می خورد (۲۱). در ماهی قزل آلابی رنگین کمان گزارش شده بود که افزایش کلسیم تام پلازما طی زرده سازی مربوط به اتصال آن به ویتلوژنین است به طوری که میزان کلسیم آزاد (free) در این مرحله تغییری پیدا نکرده بود (۳). در ماهی طلایی *Carassius aurata* میزان کلسیم ویتلوژنین تقریباً ۱۵/۴ میکروگرم در میلی گرم ویتلوژنین یا ۲٪ درصد از وزن آن می باشد (۱۵). پس تغییرات یون کلسیم در پلازما ماهی سفید تا قبل از مرحله رسیدگی به حضور پیش ساز زرده بر می گردد.

از طرف دیگر، یون کلسیم یک یون حیاتی در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی رسیدگی نهایی اووسیت بسیاری

روند افزایشی یونهای غیر آلی سدیم و پتاسیم در داخل اووسیت در ماهی هرینگ آتلانتیک *Clupea harengus* (۱۷) و یونهای پتاسیم و کلرید برای هالیوت آتلانتیک *Hippoglossus hippoglossus* (۹) که موجب اسمووز آب به داخل سلول می شود، دیده شد. همچنین *Chen et al.* (۲۰۰۳) به بالاتر بودن میزان اسمولاریته درون اووسیتهای ماهی شیرین *Plecoglossus altivelis* نسبت به اسمولاریته پلازما در همه مراحل تکوین اووسیت اشاره کرده بودند به طوری که میزان پتاسیم اووسیت ۲۵/۵ تا ۳۴/۲ برابر از پتاسیم پلازما این گونه بیشتر بود.

همزمان با تغییرات رخ داده در پروتئین تام پلازما، یون کلسیم نیز در پلازما ماهی سفید تقریباً چنین روندی را طی کرد (شکل ۲). روند تغییرات یون کلسیم و میزان پروتئین در پلازما ماهی سفید نشان دهنده ارتباط تنگاتنگ آنها می باشد ( $R=0.88$ ) که احتمالاً ناشی از حضور پیش ساز زرده یعنی ویتلوژنین در پلازما است.

یون از طریق کانالهای یونی به داخل سلول و شرکت آن در رسیدگی نهایی اووسیت است.

به طور کلی، به دلیل حضور تخمهای بستری در ماهی سفید، پدیده آبگیری تخمدان درمقایسه با اووسیت ماهیان دریایی به میزان کمتر رخ می دهد و فرآیند زرده سازی عامل اصلی افزایش قطر اووسیت طی مراحل تکوینی اووسیت است. همچنین می توان اظهار داشت که جهت رسیدگی سریع تر تخمدان ماهی سفید در محیطهای مصنوعی و آزمایشگاهی شاید بتوان از کاتیونهای همچون پتاسیم و سدیم با توجه به نقش مهم آنها در پدیده آبگیری (که یکی از فرایندهای اصلی جهت رسیدگی اووسیت می باشد) استفاده نمود.

از جانوران است. کنترل رسیدگی اووسیت دربرگیرنده فعل و انفعالات پیچیده ای بین اووسیت و محیط خارج سلولی و همچنین مشارکت مسیرهای فراوان متابولیکی است. پیغام کلسیمی و حضور این یون یکی از این مسیرهای متابولیکی مهم جهت اتفاقات رخ داده از جمله از سرگیری تقسیم میوز، آبگیری سلول، یکپارچه شدن زرده و GVBD در مرحله رسیدگی می باشد (۱۴ و ۳۰).

افزایش غلظت یون کلسیم در سلول به وسیله دو مکانیسم اصلی در مرحله رسیدگی نهایی صورت می گیرد: ۱) شبکه گسترده اندوپلاسمیک درون اووسیت و ۲) ورود از پلاسمای خون به داخل طریق کانالهای یونی حاضر در غشای پلاسمای (۳۰). کاهش میزان کلسیم پلاسمای ماهی سفید در مرحله رسیدگی نهایی احتمالاً به دلیل ورود این

## منابع

- حیدری ب. ۱۳۸۳. بررسی مراحل تکاملی تخمدان قبل از تخم‌ریزی و امکان تکثیر مصنوعی ماهی کفال دریای خزر (گونه اوراتوس). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه گیلان. ۶۶ ص.
- Begovac, P.C., Wallace, R.A., 1988, Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. J. Morph. 197, 353-369.
- Bjornsson, B.J., Haux, C., 1985. Distribution of calcium, magnesium and inorganic phosphate of estradiol-17b treated rainbowtrout. J. Comp. Physiol(B). 155, 347-352.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Cerda, J., Fabra, M., Raldua, D., 2007. Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration. In: Babin, P.J., Cerdà, J., Lubzens, E. (Eds.), THE FISH OOCYTE, From Basic Studies to Biotechnological Applications. Springer, Dordrecht, pp. 350-387.
- Chen, Y.N., Hsieh, S.L., Kuo, C.M., 2003. Changes in oocyte and blood plasma osmotic components of ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck & Schlegel during oocyte maturation. Aquac. Res. 34, 859-867.
- Craik, J.C.A., Harvey, S.M., 1984. Biochemical changes occurring during final maturation of eggs of some marine and freshwater teleosts. J Fish Biol 24, 599-610.
- Fabra, M., Raldu'a, D., Bozzo, M.G., Deen, P.M.T., Lubzens, E., Cerdà, J., 2006. Yolk proteolysis and aquaporin-10 play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption. Dev. Biol. 295, 250-262.
- Finn, R.N., Østby, G.C., Norberg, B., Fyhn, H.J., 2002. In vivo oocyte hydration in *Atlantic halibut* (*Hippoglossus hippoglossus*); proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx. J. Exp. Biol. 205, 211-224.
- Finn, R.N., 2007. The maturational disassembly and differential proteolysis of paralogous vitellogenins in a marine pelagophil teleost: A conserved mechanism of oocyte hydration. Biol. Reprod. 76, 936-948.
- Gillespie, D.K., de Peyster, A., 2004. Plasma calcium as a surrogate measure for vitellogenin in fathead minnows (*Pimephales promelas*). Ecotoxicology and Environmental Safety 58 90-95.
- Greeley, M.S., Calder, D.R., Wallace, R.A., 1991. Changes in size, hydration and low

- molecular weight osmotic effectors during meiotic maturation of *Fundulus* oocytes in vivo. *Comp. Biochem. Physiol(A)*. 100, 639-674.
13. Greeley, M.S., Calder, D.R., Wallace, R.A., 1986. Changes in teleost yolk proteins during oocyte maturation: correlation of yolk proteolysis with oocyte hydration. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 84, 1-9.
  14. Hart, N.H., 1990. Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *Int. Rev. Cytol.* 121, 1-66.
  15. Hori, S.H., Kodama, T., Tanahasi, K., 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 37, 306-320.
  16. Kolarevic, J., Nerland, A., Nilsen, F., Finn, R.N., 2008. Goldsinny wrasse (*Ctenolabrus rupestris*) is an extreme vtgAa-type pelagophil teleost. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1011-1020.
  17. Kristoffersen, A.B., Finn, R.N., 2008. Major osmolyte changes during oocyte hydration of a clupeocephalan marine benthophil: Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Mar. Biol.* 154, 683-692.
  18. LaFleur, G.J., Thomas, P., 1991. Evidence for a role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase in the hydration of Atlantic croaker and spotted seatrout oocytes during final maturation. *J. Exp. Zool.* 258, 126-136.
  19. LaFleur, G.J.J., Raldu'a, D., Fabra, M., Carnevali, O., Denslow, N., Wallace, R.A., Cerda, J., 2005. Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.* 73, 815-824.
  20. Matsubara, T., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C.V., Hara, A., 1999. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev. Biol.* 213, 18-32.
  21. Mommsen, T.P., Walsh, P.J., 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. XI, The Physiology of Developing Fish, Part A. Academic Press, New York, pp. 347-405.
  22. Paykan Heyrati, F., Mostafavi, H., Toloee, H., Dorafshan, S., 2007. Induced spawning of kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii, 1901) using (D-Ala6, Pro9-NEt) GnRH $\alpha$  combined with domperidone. *Aquaculture* 265, 288-293.
  23. Ravaglia, M.A., Maggese, M.C., 2002. Oogenesis in the swamp eel *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1975) (Teleostei: Synbranchidae). Ovarian anatomy, stages of oocyte development and micropyle structure. *Biocell* 26, 325-337.
  24. Reith, M., Munholland, J., Kelly, J., Finn, R.N., Fyhn, H.J., 2001. Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *J. Exp. Zool.* 291, 58-67.
  25. Sawaguchi, S., Kagawa, H., Ohkubo, N., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., Matsubara, T., 2006. Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 719-736.
  26. Selman, K., Wallace, R.A., Cerda, J., 2001. Bafilomycin A1 inhibits proteolytic cleavage and hydration but not yolk crystal disassembly or meiosis during maturation of sea bass oocytes. *J. Exp. Zool.* 290, 265-278.
  27. Shab nipour, N., Heidari, B., 2004. A histological study of the zona radiata during late oocyte developmental stages in the Caspian Sea Mugilid, *Liza aurata* (RISSO 1810). *Braz. J. Morpho. Scie.* 21, 191-195.
  28. Thorsen, A., Fyhn, H.J., 1991. Osmotic effectors during preovulatory swelling of marine fish eggs. In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (Eds.), *Proceedings of the fourth international symposium on the reproductive physiology of fish*, Sheffield, pp. 312-314.
  29. Thorsen, A., Kjesbu, O.S., Fyhn, H.J., Solemdal, P., 1996. Physiological mechanisms of buoyancy in eggs from brackish water cod. *J. Fish Biol.* 48, 457-477.
  30. Tosti, E., 2006. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 1-9.
  31. Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21, 325-343.
  32. Wallace, R.A., Greeley, M.S., McPherson, R., 1992. Analytical and experimental studies on the relationship between Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and water uptake during volume increases associated with *Fundulus* oocyte maturation in vitro. *J. Comp.*

- Physiol(B). 162, 241-248.
33. Watanabe, W.O., Kuo, C.-M., 1986. Water and ion balance in hydrating oocytes of the grey

mullet , *Mugil cephalus* L., during hormone induced final maturation. J. Fish. Bio. 28, 425-437.

## Plasma osmotic variations during developmental stages of the Caspian Kutum oocyte (*Rutilus frisii kutum*)

Heidari B.<sup>1</sup>, Shabanipour N.<sup>1</sup> and Savari A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biology Dept., Faculty of Science, The University of Guilan, Rasht, I.R. of IRAN

<sup>2</sup>Marine Biology Dept., Faculty of Marine Science and Oceanography, University of Marine Science and Technology, Khorramshahr I.R. of IRAN

### Abstract

In the present study, plasma osmotic variations including Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> ions, osmolarity and total protein were analyzed during developmental stages of oocyte in kutum (*Rutilus frisii kutum*). Also, changes of oocyte diameter was investigated during these stages. Sampling of kutum was performed monthly from catches along southern Caspian Sea (Anzali coast) and rivers ending to the sea (because of anadromic migration of the fish) during reproductive period during October 2007 to May 2008. Blood samples were immediately collected from caudal vessel. The Flame photometer, Multi analyzer, and Osmometer sets were used to measure Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ions, Ca<sup>++</sup> and osmolarity respectively. Total protein was measured by Bradford method. Based on histological observations, the oocyte development divided into six stages: 1) primary oocyte growth, 2) perinucleolar, 3) cortical alveolus, 4) vitellogenesis, 5) maturation, 6) spent. The results indicated that the most decreasing changes of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and osmolarity occurred concurrent with hydration process in maturation stage. The minimum value of Na<sup>+</sup> (12±10.12 mEq/l), K<sup>+</sup> (0.45±0.08 mEq/l) and osmolarity (238.9±27.72 milliosmol/l) corresponding with maturation stage were measured in which showed significant difference comparing with earlier stages of oocyte development. The changes of total protein and calcium showed high positive correlation (R=0.88) in which there was an ascending trend although without a significant difference (P>0.05) from cortical alveolus until primary maturation stage. In final maturation (15 April sampling) and spent stages the changes of total protein and calcium were significantly dominated by a descending trend (P<0.05). In general, due to presence of demersal eggs (benthophil) in Kutum, hydration process occurred at lower than marine teleost possessing pelagic eggs (pelagophil) in maturation stage. The vitellogenesis function was responsible for main increment of oocyte diameter during ovarian growth. In addition, analysis of data showed K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> played a major and minor role respectively during hydration.

**Keywords:** Kutum, Oocyte development, Hydration.