مطالعه هیستوشیمیایی وهیستولوژیک بافت تخمدان و کبد ماهی مولی ماده (*Pociliae sphenops*)، در سه گروه مولد، پیش مولد و نابالغ

شبنم فراهانی* و شهلا جمیلی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

تحقیق حاضر با هدف بررسی خصوصیات هیستوشیمیایی و هیستولوژیک تخمدان و کبد ماهی مولی ماده در سه گروه سنی مولد، پیش مولد و نابالغ در تاریخ بهمن ماه ۱۳۸۸ در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه علوم و تحقیقات واحد تهران انجام پذیرفت از هر گروه تعداد ۱۰ عدد ماهی مولی جهت انجام مراحل هیستوشیمیایی در تعیین عناصر لیپید و پروتئین کل بافت مورد بررسی قرار گرفتند. تخمدان ها وکبد های استحصال شده در ماهیان فوق الذکر در فریزری با دمای ۷۰- تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شدند. تعداد ۱۲ عدد مولی به منظور انجام مراحل بافت شناسی و مشاهدات کیفی توسط میکروسکوپ نوری(رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، رنگ آمیزی کلسیمVon- kossa ورنگ آمیزی لیپید Sudan- Black B) مورد بررسی قرار گرفتند.

با توجه به نتایج حاصل از آنالیز داده ها میزان لیپید و پروتئین تخمدان در هر سه گروه مولد(۴ ماهه)، پیش مولد(۳ ماهه) و نابالغ(۱/۵ تا ۲ ماهه) تفاوتهای معناداری($P<0.05$) از خود نشان دادند که در این میان تخمدان گروه نابالغ(۰/۲۴۲±۳/۵۳۲ a) و (a ۰/۰۰۴±۰/۱۱۹) ، پیش مولد(۰/۰۵±۰/۵۷۸ b) و (۰/۰۷±۰/۱۰۹ ab)و مولد(۰/۰۰۷ ±۰/۱۹۸ ab) و (۰,۰۰۰ ±۰/۰۰۹ b) به ترتیب بیشترین و کمترین میزان لیپید و پروتئین را به خود اختصاص دادند . در بافت کبد نیز اختلافات معنادار($P<0.05$) در میزان لیپید و پروتئین در هر سه گروه دیده شد. میزان پروتئین بافت کبد در گروه نابالغ(۰/۰۰۸± ۰/۰۷۴ a) از گروه پیش مولد(۰/۰۰۳ ±۰/۰۲۴ b) و مولد(۰/۰۰۲ ±۰/۰۱۹ ab) بالاتربود. اندازه گیری مقدار لیپید در بافت کبد ماهیان حاکی از بیشتر بودن این عنصردر گروه پیش مولد(۰/۳۲۰±۱/۷۴۶ ab) نسبت به گروه مولد(۰/۲۲۰ ±۱/۲۶۲b)و نابالغ(۰/۰۲۵±۰/۳۳۰ a)بود. رنگ آمیزی کلسیم در بافت های کبد و تخمدان نیز نشان دهنده افزایش تراکم این عنصر با نزدیک شدن به دوره بلوغ است.

واژه گان کلیدی: مولی ماده ، کبد، تخمدان، هیستوشیمی، هیستولوژی.

*مسئول مکاتبه: shabi.farahani@yahoo.com

مقدمه

هیستولوژی به مطالعه بافتی موجودات زنده از جمله آبزیان می پردازد. Nunomura در سال ۱۹۸۳ به روش ایمونوهیستوشیمیایی و هیستولوژی در سلول های کبدی ماهیان ماده بالغ و نابالغ ازخانواده سالمونیده شامل(*Oncorhynchus keta*، *Salmo gardineri*، *Salvelinus leucomaenis*) محل زرده سازی را تعیین نمود. Hara در سال ۱۹۸۴ به روش هیستوشیمی و هیستولوژی به مطالعه ویتلوژنین و مشتقات آن در کیسه زرده ماهی چار(*Salvelinus leucomaenis*)پرداخت. Parker در سال ۱۹۹۳ با ارزیابی خواص هیستوشیمیایی و بیوشیمیایی تومورهای هپاتیک(کبدی) ۵۰ عدد قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) و مطالعه تومورهای کبدی به تغییرات ساختاری کبد دست یافت.Gaspar در سال ۱۹۹۸ به روش هیستوشیمی و هیستولوژی به مطالعه غدد سلولی در تفریخ جنین قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) دست یافت.Sisekkoprucu و Koprucu در سال ۲۰۰۲ به روش ایمونوهیستوشیمی هورمون های پپتیدی در سلول های اندوکرین ارگان های روده ای – معدی ۱۵ نمونه ماهی نیل(*Oreachromis niloticus*) را تعیین کردند. Vandervan در سال ۲۰۰۳ به ارزیابی هیستوشیمی و ایمونوشیمی mRNA زبرای (*Deniorerio*) پرداخت. Ortiz در سال ۲۰۰۸ خصوصیات هیستوشیمیایی و ایمونوهیستوشیمی تخمک و زرده در ماهی دم شمشیری (*Xiphias gladius*) را مطالعه کردCirrascaff و Scussel در سال ۲۰۰۸ ساختارهیستوشیمیایی گربه ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*) را آنالیز نمودند.

از آنجا که در ماهیان استخوانی، رشد و ساختار پروتئینی کیسه زرده به طور عمده به سنتز هورمونی و جذب اگزوژینـوس پـروتئین هـا توسط تخمدان بستگی دارد که در نهایت این تغییرات سبب رشد و نمو جنین شده و مهم ترین منابع در تامین مواد مغـذی مـورد نیـاز تخم می باشد، لذا توسط بررسی هیستولوژی(مطالعات بافت شناسی) و هیستوشیمی کبد(به عنوان اندامی که نقـش بسـیار مهمـی در متابولیسم لیپید ها، جذب عناصر مختلف، اکسیداسیون، انجام تبادلات اسید هـای چـرب و تخمـدان مـاهی مـولی(Gymnovarian, Acynchoronous با چند مرحله تخمریزی در سال و تخمدان فاقد حفره) بالغ، پیش مولد و نابالغ (به عنوان یک ماهی در دسترس و ارزان قیمت اما در عین حال با اهمیت در ماهیان زینتی به سبب دوره تکثیر کوتاه مدت ۱ تا ۲ ماهه و ساز گار شدن با شرایط محیطی) می توان در مقیاسی کوچک با تهیه رژیم غذایی کارامد موجبات رشد بیشتر ماهیان را فراهم آورد. در نهایت می توان نتایج حاصل از این تحقیق را به ماهیان مولد و بزرگ اقتصادی که امکان استفاده از آنها در شرایط آزمایشگاهی به دلیل کمبـود فضـای مکفـی تقریبـا غیـر ممکن است تعمیم داد.

مواد و روش ها

ماهیان مولی ماده که در گروههای سنی مولد(۴ ماهه)،پیش مولد(۳ ماهه) و نابالغ(۱,۵ تا ۲ ماهه) به تعداد ۳۰ عدد (هر گروه۱۰ عدد ماهی مولی) جهت انجام بررسی های هیستوشیمیایی (اندازه گیری لیپید وپروتئین) و ۱۲ عدد ماهی مولی (هر گروه ۴ عدد جهت بررسی های هیستولوژی و تهیه لام و رنگ امیزی کلسیم ، هماتوکسیلین- ائوزین و لیپید) لحاظ گردید. دما ۲۳ درجه سانتی گراد،pH آب اکواریوم ۸ ، سختی ۳۷۰ ppm، حجم آبگیری آکواریومها ۶۱/۲ لیتر بود. مولی ها به نور مستقیم خورشید نیازی ندارند. هیچ ماده دارویی به آب آکواریوم ها افزوده نشد. درمرحله بعد ماهیان بیومتری و کالبد شکافی شدند و تخمدان ها و کبد ها جهت انجام مراحل هیستولوژی درفریزری با دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند(Liang *etal*. 2004). در ادامه پس از آماده سازی بافت ها به منظور مشاهده هسته و سیتوپلاسم سلول ها ، کلسیم و لیپید به ترتیب از روش های رنگ آمیزی هماتوکسیلین- هریس – ائوزین، von-kossa و Sudan blak B استفاده شد(پوستی و مرادی، ۱۳۸۵). در مرحله بعد اندازه گیری لیپید و پروتئین در بافت‌ها انجام پذیرفت. در محاسبه مقدار لیپید از اتردوپترول با نقطه جوش ۴۰-۶۰ درجه سانتی گراد استفاده شد که در اثر سرد شدن به صورت قطرات مایع داخل جداکننده بر گشته و چربی موجود در بافت را در خود حل می نماید. پس از اینکه حجم اتر در داخل جداکننده به مقدار معینی رسید ، از لوله های جداری دوباره داخل بالن می شود و این عمل ساعت ها ادامه یافت تا چربی بافت کاملا استخراج شود. در محاسبه مقدار پروتئین نیز از روش ماکروکلدال استفاده شد که در این مرحله بافت را در کاغذ صافی وزن کرده و در داخل بالن هضم انداخته، سپس کاتالیزور و اسید سولفوریک غلیظ را به آن اضافه نموده و حرارت داده شد تا زمانی که مایع زلال و بی رنگی حاصل شود پس از تمام شدن مرحله هضم و سرد شدن بالن در حدود ۲/۳ حجم آن آب مقطر و ۵۰ میلی لیتر اسید بوریک در داخل یک ارلن مایر ریخته و چند قطره معرف پروتئین قرمز رنگ به آن اضافه شد تا رنگ قرمز به رنگ فیروزه ای تبدیل شود سپس آنرا با اسید سولفوریک تیتر کرده تا رنگ پوست پیازی حاصل شود (AOAC. 1996).

$$\text{درصدلیپید} = \frac{\text{وزن بالن خالی- وزن بالن چربی}}{\text{گرم وزن بافت}} \times 100$$

$$\text{درصد پروتئین بافت} = \%N \times 6/2 \qquad \text{و} \qquad \text{درصد نیتروژن بافت} = \frac{V \times N \times 14}{S_D \times 1000} \times 100$$

لازم به ذکر است که گروه بندی ماهیان به سه دسته مولد، پیش مولد و نابالغ بر اساس سن، طول و وزن بدن، پهنـای شـکم و در آخـر رسیدگی تخمدان ها انجام شد.

جهت مطالعه وبررسی اقلام آماری (میانگین و انحراف معیار وزن کبد و تخمدان ماهیان در هر سه گروه) و بررسی تفاوت های معنادار در میزان عناصر موجود در هر دو بافت مذکور از نرم افزار Excel و spss(نسخه ۱۱,۵)، آزمون One Way ANOVA و تست تـوکی استفاده گردید.

نتایج

مراحل انجام آزمایشات تحقیق حاضر به دو قسمت هیستوشیمیایی(اندازه گیری عناصر در بافت) و بافت شناسی تقسـیم شـد. نخسـت نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های مرحله اول در قالب اندازه گیری لیپید و پروتئین انجام پذیرفت و بر اساس آن نمودارهای مربوطـه

رسم گردید. در مرحله دوم، به منظور مشاهدات کیفی توسط میکروسکوپ نوری رنگ آمیزی‌های Sudan Black B (مشاهده لیپید)و Von- kossa(مشاهده کلسیم) و هماتوکسیلین- ائوزین(مشاهده هسته و سیتوپلاسم) انجام شد.

نتایج بررسی درصد لیپید و پروتئین بافت تخمدان و کبد در هر سه گروه حاکی از وجود اختلاف معنادار (P<0.000) میان آنها است که بر این اساس گروه نابالغ(۰/۲۴۲a ± ۳/۵۳۲درصد)از گروه پیش مولد b(۰/۰۵±۰/۵۷۸. درصد) و مولد ab (۰/۰۰۷±۰/۱۹۸ درصد) مقدار بالاتر لیپید در تخمدان را نشان دادند. بررسی درصد پروتئین تخمدان نشان داد که گروه نابالغa(۰/۰۰۴±۰/۱۱۹ درصد) از گروه پیش مولد ab(۰/۰۰۷±۰/۱۰۹ درصد) و مولد b(۰,۰±۰/۰۰۹ درصد) پروتئین بالاتری داشتند. محاسبه درصد لیپید بافت کبد نشان داد که گروه پیش مولدab(۰,۳۲۰±۱/۷۴۶ درصد) از گروه مولدb(۰/۲۲۰±۱/۲۶۲ درصد) و نابالغa(۰/۰۲۵±۰/۳۳۰٪)درصد لیپید بالاتری دارند. برآورد درصد پروتئین کبد نیز بیان کرد که گروه نابالغa(۰/۰۰۸±۰/۰۷۴ درصد) از گروه پیش مولدb(۰/۰۰۳±۰/۰۲۴ درصد) و مولد ab(۰/۰۰۲ ± ۰/۰۱۹ درصد) مقدار بالاتر پروتئین را داشتند.

جدول۱: داده های حاصل از وزن و طول بدن و کبد و تخمدان گروه مولد، پیش مولد و نابالغ

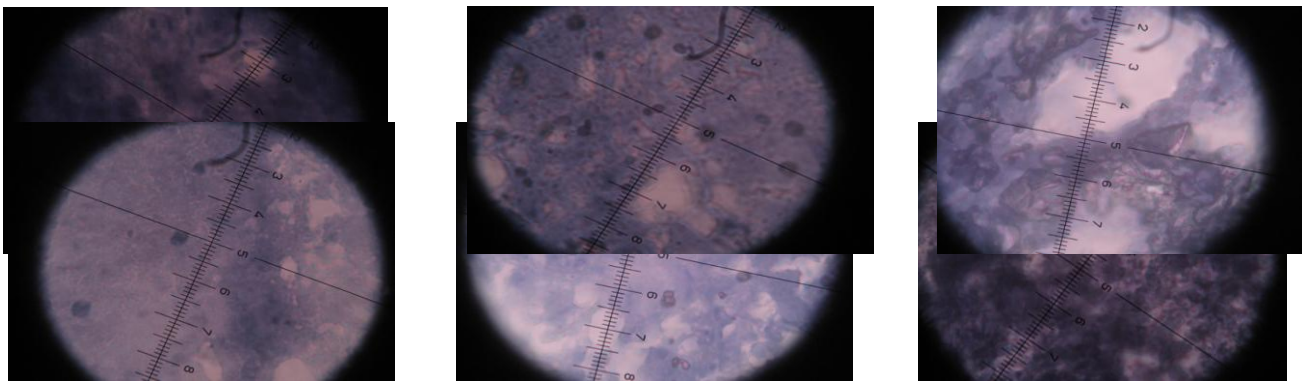
گروه های سنی	وزن کل بدن(gr)	طول کل بدن(cm)	وزن کبد(gr)	وزن تخمدان(gr)
مولد	۳/۹۴۸± ۱/۱۲	۵/۷۰۳ ±۰/۴۱	۰/۰۷۴ ±۰/۰۳۹	۰/۳۸۴ ±۰/۱۳۷
پیش مولد	۲/۶۹۶±۰/۸۳۱	۵/۲۱۳±۰/۵۷۵	۰/۰۷۴±۰/۰۸۸	۰/۰۸۹ ±۰۰/۰۵۷
نابالغ	۲/۴۶۱±۰/۳۹۵	۵/۲۳۴±۰/۲۹۳	۰/۰۴۸±۰/۰۱۲	۰/۰۱۳ ±۰/۰۴

جدول ۲- درصد لیپید و پروتئین موجود در بافت کبد و تخمدان گروه های مولد، پیش مولد و نابالغ

گروه های سنی	درصد لیپیدکبد P<۰/۰۳	درصد لیپید تخمدان P<۰/۰۰۰	درصد پروتئین کبد P< ۰/۰۰۰	درصد پروتئین تخمدان P<۰/۰۰۰
مولد	b ۱/۲۶۲±۰/۲۲۰	ab۰/۱۹۸ ±۰/۰۰۷	ab۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰۲	b۰/۰۰۹ ±۰/۰۰۰
پیش مولد	ab ۱/۷۴۶±۰/۳۲۰	b ۰/۵۷۸±۰/۰۵	b ۰/۰۲۴±۰/۰۰۳	ab ۰/۱۰۹±۰/۰۷
نابالغ	a ۰/۳۳۰±۰/۰۲۵	a ۳/۵۳۲±۰/۲۴۲	a ۰/۰۷۴±۰/۰۰۸	a۰/۱۱۹ ±۰/۰۰۴

نتایج حاصل از رنگ آمیزی سودان بلک B در بافت کبد مولی های ماده نشان می دهد که تجمعات لیپیدی در بافت به رنگ قهوه ای مایل به سیاه هستند و بر اساس مطالعات کمی و کیفی در گروه پیش مولد مقادیر بالاتری لیپید نسبت به دو گروه مولد و نابالغ وجود دارد(شکل ۱).

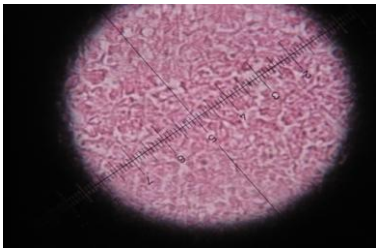
بافت تخمدان نابالغ ۱۰۰۰× بافت تخمدان پیش مولد ۱۰۰۰× بافت تخمدان مولد ۱۰۰۰×



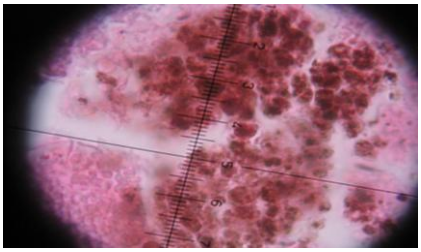
شکل ۲- بافت تخمدان مولی و تجمع لیپیدی در سه گروه مولد ،پیش مولد و نا بالغ

نتایج حاصل از رنگ آمیزی سودان بلک B در بافت تخمدان مولی های ماده نشان می دهد که تجمعات لیپیدی در بافت به رنگ قهوه ای مایل به سیاه هستند و بر اساس مطالعات کمی و کیفی در گروه نابالغ مقادیر بالاتری لیپید نسبت به دو گروه پیش مولد و مولد وجود دارد(شکل ۲).

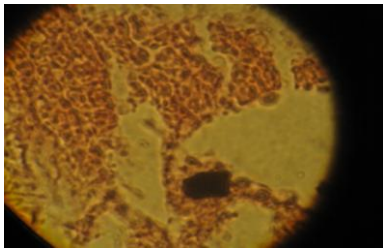
نتایج حاصل از رنگ آمیزی Von-kossaدر بافت کبد مولی های ماده نشان می دهد که ذخایر کلسیمی در بافت به رنگ قهوه ای تیره و هسته و سایر مواد ساختمانی سلول به رنگ قرمز کم رنگ هستند وبر اساس مشاهدات بافت شناسی، کلسیم در بافت ماهیان مولد و پیش‌مولد از گروه نابالغ بیشتر است(شکل ۳).



بافت کبد نابالغ ٤٠٠×



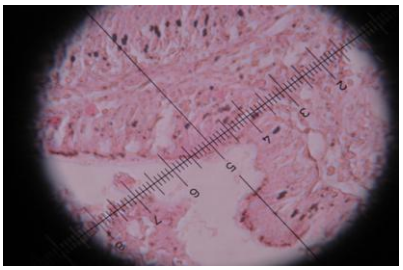
بافت کبد پیش مولد٤٠٠×



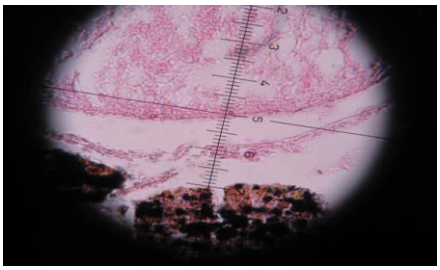
بافت کبد مولد ٤٠٠×

شکل ۳- بافت کبد مولی ماده وذخایر کلسیمی در سه گروه مولد ،پیش مولد و کبد

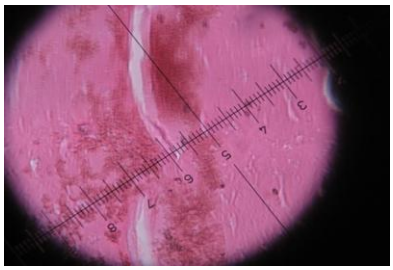
نتایج حاصل از رنگ آمیزی Von-kossaدر بافت تخمدان مولی های ماده نشان می دهد که ذخایر کلسیمی در بافت به رنگ قهوه ای تیره و هسته و سایر مواد ساختمانی سلول به رنگ قرمز کم رنگ هستند وبر اساس مشاهدات بافت شناسی، کلسیم در بافت ماهیان مولد و پیش‌مولد از گروه نابالغ بیشتر است (شکل ۴).



تخمدان نا بالغ ۱۰۰۰×



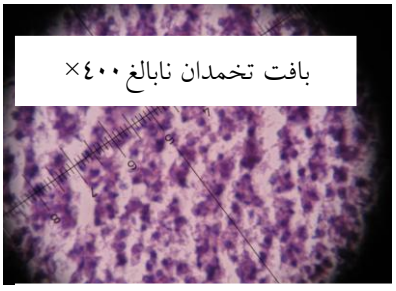
تخمدان پیش مولد۱۰۰۰×



تخمدان مولد ۱۰۰۰×

شکل ۴- بافت تخمدان ماهی مولی و ذخایر کلسیمی در سه گروه مولد ،پیش مولد ونا بالغ

نتایج حاصل از رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین در بافت کبد مولی های ماده نشان می دهد که هسته در بافت ، آبی رنگ و سیتوپلاسم و سایر سلول ها صورتی رنگ هستند(شکل ۵).



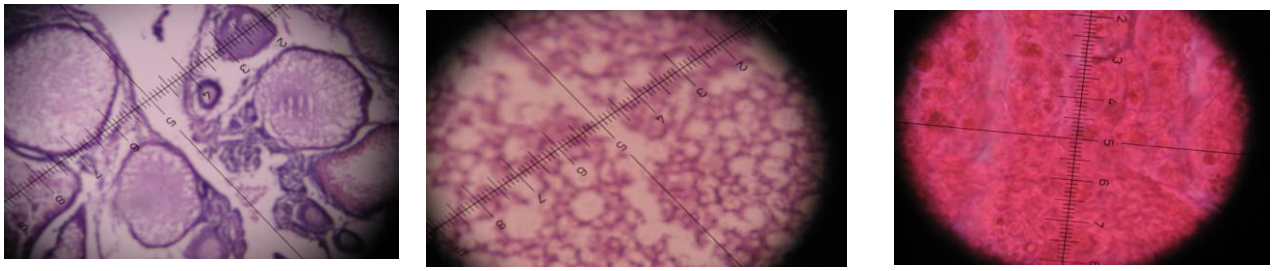
بافت کبد نابالغ٤٠٠×

باقت کبد پیش مولد٤٠٠×

بافت کبد مولد٤٠٠×

شکل ۵-بافت کبد ماهی مولی ماده در رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین

نتایج حاصل از رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین در بافت تخمدان مولی های ماده نشان گر دورائر بزرگ (اووسیت بالغ)، فضای خالی(بافت استروما) و سلول های نابالغ در تخمدان(اووگونی ها) هستند(شکل ۶).



بافت تخمدان نا بالغ۴۰۰× بافت تخمدان پیش مولد ۴۰۰× بافت تخمدان مولد ۴۰۰×

شکل ۶- بافت تخمدان ماهی مولی در رنگ آمیزی هما توکسیلین-ائوزین

بحث و نتیجه گیری

بررسی نتایج حاصل از آنالیز آماری لیپید در این تحقیق در بافت کبد بر اساس روش سوکسله نشان داد که اختلاف معنـاداری(۰/۰۳ P<) میان درصد لیپید کل سه گروه مولد، پیش مولد و نابالغ وجود دارد . در این میان گروه پیش مولد با محتوای لیپید ۳۲۰ /۰ ± ۱/ ۷۴۶ درصد، گروه بالغ با محتوای لیپید ۲۲۰ /۰ ± ۱/ ۲۶۲ درصد و گروه نابالغ با محتوای لیپید ۲۵ /۰ ± ۳۳۰ /۰ درصـد بـه ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر لیپید را در این بررسی به خود اختصاص دادنددر بافت تخمدان نیز اختلاف معنـادار (P< ۰/۰۰۰)در بین هر سه گروه دیده شد و گروه نابالغ با محتوای لیپید ۰/۲۴۲ ± ۳/۵۳۲ درصد ، گروه پـیش مولـد بـا لیپیـد ۰/۰۵±۰/۵۷۸b و گروه مولد با ۰/۰۰۷ ± ۰/۱۹۸ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین میزان لیپید در تخمدان را به خود اختصاص می دهند.

Segner and Witt در سال ۱۹۹۰ دریافتند که افزایش لیپید در کبد(*Turbot (Scophthalmus maximus*) در ماهیانی کـه بـا جیره ۱۷ درصد و ۲۲ درصد تغذیه شدند از ماهیانی که با جیره ۱۵ درصد لیپید تغذیه شدند، پس از شروع نوزادی ممکن است به دلیل تغییرات غذایی و مقاومت نسبت به سندرومهای پاتولوژیک باشد. در تحقیق حاضر نیـز محتـوای لیپیـد کبـد پـس از دوره نابـالغ رو بـه افزایش نهاد. Kauslik در سال ۱۹۹۷ با مطالعه بر روی ماهیان دریایی دریافت که مقادیر بالای لیپید در کبد به منظور آداپتاسیون بـا شرایط محیطی جدید در آب هایی با دمای پایین (با غنای غذایی بالا) ذخیره و نگهداری می شود بنابراین تغییرات در جیره غذایی مـی تواند در رشد بافت هایی از قبیل کبد ، پوست ، کلیه و تخمدان تاثیر گذار باشد و در جیره با ۲۲ درصد لیپید میزان رشد و مقدار لیپید در بافت ها افزایش و با ۲۷ درصد لیپید میزان رشد و مقدار آن کاهش یافت.در تحقیق حاضررشد گنادها مورد بررسی قـرار نگرفـت امـا مقدار لیپید درتخمدان گروه نابالغ، بیشترین و در گروه مولد کمترین مقدار را داشت.

مطالعاتی که Rainuzzo و همکاران در سال ۱۹۹۸ بر روی اهمیت لیپیدها در لارو ماهیان دریایی انجام دادند حـاکی از آن اسـت کـه حضور لیپیدها در دوره های لاروی در تخمدان سبب افزایش کیفیت تخم ریزی ، سرعت بخشیدن به لقاح و هـچ خواهـد شـد . در ایـن تحقیق نیز حضور بیشتر لیپید ها در تخمدان گروه نابالغ با مطلب فوق مطابقت دارد. Caballero و همکاران در سال ۱۹۹۹ با بررسی اثرات ترکیبی سطوح لیپید در جیره غذایی و تاثیر آن بر بافت کبد ۱۱۴۰ عدد ماهی Seabream(*Sparu aurata*) بـا وزن متوسـط ۷۰ gr و تغذیه آنها با ۲ گروه غذایی ۱۵ درصد و ۲۲ درصد تا ۲۷ درصد لیپید به این نتایج دست یافتند که کبد ماهیانی کـه بـا لیپیـد کمتری تغذیه شده باشند لیپید کمتری ذخیره خواهد شد و در نهایت رشد و انرژی کمتری خواهند داشت . از اینرو نیازمند اسـتفاده از پروتئین بیشتر جهت تامین انرژی خود را دارند. میتوان بیان کرد که پاسخهای فیزیولوژیک کبد نسبت به دسترسی به چربی هـا سـبب می شود که این اندام به عنوان یک انبار ذخیره انرژی تلقی گردد.در تحقیق حاضر بافت کبد گروه پیش مولـد بیشـترین و گـروه نابـالغ کمترین مقدار لیپید را در خود نشان دادند. بر طبق مطالعات Shirai و همکاران در سال ۲۰۰۰ بر روی محتـوای عناصـر بافـت کبـد و تخمدان ماهیCat fish (*Silurus asotus*) مشخص شد که میزان لیپید تخمدان در ماهیان بـالغ کـم(۱/۶±۷/۳ درصـد)و در دوره post- spawning(۱/۱±۲/۳) افزایش می یابد. در کبد نیز میزان لیپید مولـدین از۰/۹ ±۵/۳ بـه ۰/۶±۳/۲ درصـد در دوره post-spawning رسید. درتحقیق حاضر نیز تخمدان گروه نابالغ از گروه پیش مولد و مولد لیپید بیشتری را در خود نشان داد امـا در کبـد گروه پیش مولد، مولد و نابالغ به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر لیپید مشاهده شد.

بر اساس تحقیقات Min lee در سال ۲۰۰۰ که بر روی غذادهی با پلت مرطوب یـا خشـک بـر روی(*Sebastes schlegeli*) Rock fish هایی با وزن ۵/۷ gr انجام داد به این نتایج رسید که با افزایش دفعات غذادهی میزان لیپید در کبد و ماهیچه ها به طور معنـاداری

افزایش می یابد. در بررسی حاضر بر روی کبد مولی های ماده گروه پیش مولد، مولد و نابالغ به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر را بـه خود اختصاص دادند.

Njin koue و همکاران با تحقیق بر روی محتوای لیپیدها و اسیدهای چرب در ماهیچه کبد و پوست ماهیان خوراکی(۱۰±۰/۹ درصد) *Sardinella madernesis*, (۱۲ ± ۰/۹ درصد) *S . aurita* و (۸ ± ۰/۶ درصد) *Cephalopholis taeniops* در سال ۲۰۰۱ به این نتایج دست یافتند که محتوای لیپید در کبد این سه ماهی با تغییر فصول تغییر یافت . با افزایش فـرا جوشـی در دریاهـا بـه سـبب ازدیاد دسترسی به عناصر غذایی ، لیپیدها افزایش و با افزایش دما محتوای لیپید کبد کاهش می یابـد . بـدین ترتیـب عوامـل مـوثر در محتوای لیپید در تمامی بافت ها از جمله کبد ، پوست و کلیه و تخمدان را می توان به تغییر فصل ، دما ، جیره غذایی جنسیت ، سـن و اندازه ماهیان مرتبط دانست. در تحقیق حاضر کبد گروه پیش مولد، مولد و نابالغ به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار لیپیـد را بـه خـود اختصاص دادند.

مطالعات Korsgaard and Peterson در سال ۲۰۰۳ بر روی متابولیسم لیپید و کربوهیدرات در طول مرحله بارداری مارماهی Eel pout (*Zoarces viviparous*) نشان داد که بیشترین میزان لیپید کبد قبل از مرحله ویتیلوژنزیز یافت مـی شـود و در طـول دوره بارداری کبد از لیپید و گلیکوژن خالی است (پس از دوره بلوغ در زمانی که نزدیک به زایمان ماهیان زنده زا است) در این حـال لیپیـد کل و فسفولیپید در خون تجمع می کند و استرادیول ها در زمان بارداری زایمان منجر به افزایش ویتیلـوژنین در خـون مـی شـوند. در مطالعه حاضر بیشترین میزان لیپید درکبد در دوره پیش مولد (قبل از زایمان مولی های ماده یافت شد) مولـد و نابـالغ یافـت شـد. بـر اساس تحقیقاتی که Ayes و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی ۱۸۰ بافت ماهی ۱ تا ۲ سـاله شـامل(*Cyprinus carpio, Silurus glanis, Alburnus escherichii*) در دریاچه Sarivar ترکیه انجام دادند به این نتایج رسیدند کـه اسـترس هـای فیزیولوژیـک و آلودگی های محیطی در طول دوره های پرورش و نگهداری مهمترین عوامل در تغییر ساختارهای هیستولوژیک مـی باشـند کـه نهایتـا سبب تغییر در متابولیسم و سطوح سلولی می شوند و کبد اندامی بود که بیشترین تغییرات فوق الذکر را در خود نشان داد.

مطالعات Grisdale و همکاران در سال ۲۰۰۸ پیرامون تاثیرات پروتئین و لیپید جیره در کارایی غذا در بافـت هـای بـدن مـاهی کـاد اقیانوس اطلس(*Cadus morhua*) نشان داد که کارایی غذا با کربوهیدرات های موجود در جیره و بافت ها رابطـه عکـس و بـا لیپیـد موجود در جیره رابطه مستقیم دارد از اینرو کربوهیدرات نمی تواند جانشین خوبی در تامین لیپید مورد نیاز ابزیان باشد. اما قادر خواهد بود تا حدی در تامین انرژی به پروتئین ها کمک رسانی کنند و جایگزین پروتئین جیره شوند.

بر اساس شواهد و مطالعات انجام شده در تحقیق حاضر می توان اذعان داشت که لیپید قبل از دوره اول غذادهی در تامین انرژی ماهیان نسبت به پروتئین و کربوهیدرات ها از اهمیت بالایی برخوردار است این مسئله را می توان یکی از عمده ترین دلایـل افـزایش لیپیـد در تخمدان های ماهیان نابالغ نسبت به دو گروه پیش مولد و مولد دانست . طبیعتاً گروه پیش مولد بنابر اهمیت زرده سازی بیشتر نسـبت به بالغینی که در ابتدای مرحله تخم ریزی قرار دارند به لیپید بیشتری نیازمندند که این میزان لیپید از طریق کبد تامین خواهد شد کـه نتایج حاصل از لیپید در کبد گروه های پیش مولد و مولد خود بر این مطالب صحه می گذارد. از طرفی می توان این طور بیان کـرد کـه در گروه های نابالغ و لاروی ماهی مولی قادر به تامین لیپید مورد نیاز تخمدان های خود از طریق جیره غذایی هستند و به دلیل کامـل نشدن فرایند ویتیلوژنزیز در کبد احتمالا قادر نخواهد بود در این مرحله از انتقال لیپید به تخمدان نقش حمایت کننده داشته باشـد . در مولی ها نیز از دوره نابالغ میزان لیپید تخمدان شروع به افزایش می کند تا ضامن رشد بیشتر لاروها و تخمـدان هـای آنهـا و در آینـده تامین کننده بقا و ماندگاری بیشتر آنها باشد . اما پس از آن شروع به افت می کند. نیاز به لیپید زمانی بیشتر احساس می شود کـه نیـاز به رسیدگی بیشتر تخمدان ها باشد . در دوره پیش مولد و مولد چون تخمدان ها به حد مناسبی از رسیدگی رسـیدند میـزان لیپیـد در آنها کمتر است البته پس از دوره تخم ریزی مجددا لیپید در بعضی از ماهیان مانند *Cat fish(Silurus asotus)* ها افزایش می یابـد تا تامین کننده نیاز تخمک ها در شروع فصل تخم ریزی بعدی باشد .

آنالیز آماری داده های این تحقیق نشان می دهد که اختلاف معناداری ($P<۰/۰۰۰$) بین درصد پروتئین در بافت کبد در هر سه گـروه وجود دارد و از طرفی میزان این عنصر در گروه نابالغ (۰/۰۷۴ ±۰/۰۰۸) از گـروه پـیش مولـد (۰/۰۲۴ ±۰/۰۰۳) ومولـد (۰/۰۰۲ ±۰/۰۱۹) بیشتر بود . آنالیز پروتئین تخمدان نشان داد که میـزان پـروتئین در گـروه نابـالغ (۰/۱۱۹±۰/۰۰۴) از دو گـروه پـیش مولـد (۰/۱۰۹±۰/۰۷) و مولد (۰/۰۰۹ ±۰/۰۰۰)بیشتر بود و اختلاف معناداری($P<۰/۰۰۰$) در هر سه گروه مشاهده شد.

بر اساس نتایج بدست امده از تحقیقات Fageriund و همکاران در سال ۱۹۸۲ پروتئین نقش موثری را در جیره غذایی ایفا می کند و حضور بیشتر این ماده بیوشیمیایی در کبد علاوه بر رشد محرکی برای ساخت فسفولیپیدهایی از قبیل ویتیلن می تواند باشد.

Fernandez در سال ۱۹۹۷ با مطالعه گناد توتیای *Paracentrotus lividus* دریافـت کـه تغییـرات فصـول ، جیـره و فاکتورهـای فیزیکی می تواند تجمع پروتئین در ترکیبات گنادها (بیضه و تخمدان) را تحت تاثیر قـرار دهـد . مـثلا *Seaurchin* سـاکن در خلـیج

مکزیک از *Seaurchin* هایی که در دمای بالاتر و پایین تر پرورش داده شده بودند محتوای پروتئین بیشتری را داشتند و فعالیت هـای گامتی بیشتری داشتند در تحقیق حاضر نیز میزان پروتئین در گروه نابالغ از گروه پیش مولد و مولد بیشتر بود.

بر اساس تحقیقات Min lee و همکاران در سال ۲۰۰۰ پیرامون تاثیرات دفعات غذادهی و رطوبت جیره بر رشـد و محتـوای ترکیبـات بدن به این نتایج رسیدند که افزایش دفعات غذادهی تاثیر معنادری بر محتوای پروتئین ماهیچه ها نداشت.

بـر اسـاس مطالعـات Hammer و همکـاران در سـال ۲۰۰۵ بـر روی تـاثیر پـروتئین و کربوهیـدرات جیـره بـر ترکیبـات بیوشیمیایی(*Lytechinnus variegates*) *Seaurchin* دریافتند که افزایش پروتئین ها در جیره سبب افزایش پروتئین در گنادها و افزایش حجم و اندازه گامت ها (اسپرم و اووسایت ها) شد . این مطالعه نشان می‌دهد که پروتئین ذخیره شده در گنادهـا بـا پـروتئین جیره رابطه مستقیم و با کربوهیدرات جیره رابطه غیرمستقیم دارد. در تحقیق حاضر تنها به بررسی میزان پـروتئین در تخمـدان مـاهی مولی ماده پرداخته شد که از این میان گروه نابالغ (۰/۰۰۴ ± ۰/۱۱۹ درصد) از دو گروه پیش مولد (۰/۰۰۷ ± ۰/۱۰۹ درصد) و مولد (۰/۰۰۰ ± ۰/۰۰۹ درصد) بیشتر بود و اختلاف معناداری در هر سه گروه مشاهده شد.

با توجه به نقش این عنصر در رشد ، تولید مثل و محرک ساخت فسفولیپیدهایی از قبیل ویتیلن و تولید گامتهـایی بـا مانـدگاری بـالا و اندازه بزرگتر و رابطه‌ای که پروتئین های جیره با پروتئین های کبد و گناد دارد می توان اذعان داشت که احتمالا حضور این عنصـر بـه مقدار بیشتر در گروه نابالغ و در دو گروه دیگر به سبب اهمیت و نیاز به انرژی و رشد و در تخمدان ها به سبب آمادگی بیشتر در جهـت تولید گامت هایی با مقاومت بالاتر است . مسلما این گروه نابالغ در آینده با حفظ و کنتـرل شـرایط آزمایشـگاهی فعالیـت هـای گـامتی موثرتری را از خود نشان خواهند داد و در پدیده تولید مثل موفق تر عمل می کنند . این نتایج می تواند به منزله تمایل بیشتر مولی هـا به غذاهایی با درصد پروتئین و لیپید خام بالاتر به منظور نیل به اهداف فوق باشد . از طرفی با حفظ دمای مطلوب مشابه دمای طبیعـی مولی ها در محیط پرورشی (۲۲ تا ۲۳ درجه سانتی گراد) می توان با حفظ میزان مناسب پروتئین در جیره فعالیتهای گامتی و گنادی را بهبود بخشید.

تنظیم کلسیم در ماهیان به لحاظ قابلیت دسترسی به کلسم محیط با مهره داران خشکی متفاوت است. ماهیان علاوه بـر کلسـیم جیـره غذایی به کلسیم موجود درآب نیز دسترسی دارند که تقریبا در آب دریا میزان آن ۱۰ mmol به ازای هر لیتر است که بـه میـزان قابـل توجهی بیشتر از یون کلسیم موجود در سلول هاست یا در آب شیرین، ۰/۱ تا ۴ میلی مول به ازای هر لیتر است که مشـابه یـا کمتـر از غلظت های داخلی سلول است (ستاری، ۱۳۸۱) .

کمبود مواد مغذی ماکرو مانند کلسیم سبب افزایش استرس های فیزیولوژیک و کاهش توان تولید مثلی تخمک در آبزیان شده و کیفیت و ترکیب تخمها را دگرگون می کند . یکی دیگر از نقش های مهم کلسیم مرتبط بودن با پدیده ویتلوژنز و بلوغ جنسی ماهیان اسـت. در بلوغ تخمدان ها نیز کلسیم به طور مستقیم در افزایش میزان GTH-II نقش ندارد، بلکه محرک اصلی آن GnRH است.

بر اساس مطالعات و مشاهدات کیفی و بافت شناسی انجام شده از طریق روش رنگ امیزی Von-Kossa در تخمدان های مولی مولد ، پیش مولد و نابالغ می توان دریافت که میزان کیفی این عنصر در بافت کبد و تخمدان ماهیان مولد و پیش مولد از گـروه نابـالغ بیشـتر است . میزان کلسیم در بافت های آبزیان از جمله کبد و تخمدان، تحت تاثیر شیمی آب ، نوع گونه ، بلوغ و به میزان کمتری تحت تاثیر جیره های غذایی است زیرا که آبزیان کلسیم مورد نیاز در پروسه های فیزیولوژیک خود را از محیط آبی دریافت می کنند . به طور کلـی می توان این طور اذعان داشت که تغییرات کلسیم در بافت های تخمدان و کبد می تواند به عنوان شاهدی در تعیین تخم ریزی و تولید مثل ماهیان به حساب آید.

بر اساس مطالعات Fletcher و King در سال ۱۹۷۷ میزان عنصر کلسیم در کبد ماهی *Sacheye salmon* در طول مهاجرت برای تخم ریزی افزایش می یابد. مطالعات انجام شده توسط Hoar و همکاران در سال ۱۹۸۳ روی ماهی قزل الای رنگین کمان نیز حاکی از ارتباط کلسیم با پدیده ویتیلوژنز و میزان هورمون استروژن است، که با پدیده های بلوغ جنسی و ویتیلـوژنز ماهیـان مـرتبط اسـت . بـر اساس مطالعات Tsai و Wang در سال ۲۰۰۰ نیز می توان دریافت که در جنس ماده به سـبب هورمـون اسـتروژن و القـای افـزایش کلسیم در خون ، میزان کلسیم بیشتر از نر بوده است و با بلوغ نهایی اووسیتها ، عنصر کلسیم در خون افزایش می یابد . مطالعات انجـام شده توسط Evans و همکاران در سال ۱۹۹۸ نیز نتایج مشابهی را در خصوص غلظت کلسیم در زمان بلوغ نهایی اووسیت ها نشان می دهد. Sarasquete و همکاران در سال ۲۰۰۲ نیز بیان کردند که کلسیم در ارتباط با تولید ویتیلوژنز در ماهیان نیز عمل می کند .

به طور کلی می توان بیان کرد که مقدار لیپید در کبد گروه پیش مولد از گروه مولد و نابالغ، و در تخمدان گروه نابالغ از دو گروه پـیش مولد و مولد بیشتر بود. درصدپروتئین نیز در هر دو بافت کبد و تخمدان گروه نابالغ از پیش مولد و مولد بیشتر بود. رنگ آمیـزی von-kossa در بررسی یون کلسیم در هر دو بافت حاکی از افزایش این عنصر در گروه مولد و پیش مولد نسبت به گرو نابالغ است.

سپاسگزاری:
ازسرکارخانم دکتر فاطمه عباسی از دانشگاه الزهراکمال تشکر و قدردانی را دارم.

منابع

پوستی، ا.، ادیب مرادی، م. ۱۳۸۵. روش های آزمایشگاهی بافت شناسی. انتشارات دانشگاه تهران. ایران.
ستاری، م. ۱۳۸۱. ماهی شناسی عمومی(۱) تشریح و فیزیولوژی. انتشارات نقش مهر. دانشگاه گیلان.
AOAC. 1996. Assotiation of official analytical chemists official methods of analysis Washington¸ D, C.
Ayes, Z., Ekmekci, G., Ozmena, M & K.Yerli,S. 2006.Histopathological changes in liver and kidneys of fish in Sariyar Reseivor, Turkey.Hacaptepe University. Ankara, Turkey.
Caballero, M.J., Lopez ,G., Socotto, J., J. Roo,F., S. Izuierd., M & Fernandez, A.1999.Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of Gilthead sea braem(*Sparus aurata*). Department of biology, University of Plamasde Granaria. Spain.
Cirrascaff¸ R. M & Scussel¸ V. M. 2008. Histochemical characterization of chanal catfish by FB1. University of California.USA.
Evans,D. H. 1998. The physiology of fishes(second edition)C.R.C press .USA.
Fernandez, F. 1997. Effect of diet on the biochemical composition of paracentrotus lividus under natural and raering condition. Comparative biochemistry and physiology,118: 1377-1384.
Fernandez, F., G. Miquel, A., Cordoba. M., Varas, M., Meton, I., Caseras, A & V. Banante, I. 2006. Effect of diets with distinct protein to carbohydrate rations on nutrient digestive growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead (*Sparus aurata*). 343(1):1-10.
Fletcher, G.l & king, M.J.1977. Cooper, zinc, calcium, magnesium and phosphaشte in the gonads and liver of sockeye salmon(*Oncorhynchus nerka*) during spawning migration.Aquaculture Memorial University of Newfoundland, Canada.193:1-2
Gaspar¸ I. D. 1998. The hatching gland cell of trout embryos characteriza Tion of N- and O- linked oligosaccharides. University of Alcala.USA.
Grisdole, B., Sharer, k., Gatlin, D & Helland, S. J.2008. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, protein digestibility, feed utilization and body composition of Atlantic cod(*Gadus morhua*).Aquaculture,283, (1- 4):156- 162.
Hammer, H., Hammer, B., Wattss, S., Lawrence, A & Lawrence, J.2005. The effect of dietary protein and carbohydrate concentration on the biochemical composition and gametogenic condition of sea urchin(Lytechinus variegatus). University of Alabama, Birmingham. USA.
Hara¸ A. 1984. Vitellogenin and its derivatives in egg yolk proteins of white spotted char *(Salvelinusleucomaenis)* ¸ 35(3): 1-2.
Hoar, R & Donaldson. E, M. 1983. Fish physiology Reproduction, part A and B. Aquaculture, Academic Press. USA.
Kauslik, S.J. 1997. Nutritional improvement of sea bass and sea bream production in the Mediterranean region, recent development in the nutrition and feeding of marine fin fish of interest to the Mediterranean. Alilla trade show the Ssaloniki,KLUWER Academic Publisher, Greece.
Kauslik, S.J., Medale, F., Fauconneau, B & Balance, D. 2003. Effect of digestive carbohydrates on

protein/ energy utilization and on glucose metabolism in Rain bow trout(*Salmo gardineri*). Laboratory of nutrition and pooissons, I.N.R.A G4310,saint pee-sur- Nivelle, France.

Korsgoard, B & Peterson. I. 1978. Vitellogenin, lipid and carbohydrate metabolism during vitellogenesis and pregnancy and after hormonal induction in the Blenny(Zoarces viviparous L.). Institue of biology and institute of biochemistry, Qdense University, DK 5230, Danmark.

Liang, L., Horvat, M., Feng, X.B., Shang, L.H., Li, H & Pang, P. 2004. Re-evaluation of distillation and comparison with HNO3 leaching/solvent extraction for isolation of methyl mercury compounds from sediment/soil samples. Appl. Organomet. Chem., 18: 264–270.

Minlee, S., Hwang, Un- Gi & Hwoancho, S. 2000. Effect of feeding frequency moisture content on growth, body composition and gastric evacuation of juvenile Korean rock fish(*Seabastes schlegeli*).

, Kangnung National University , South Korea.

Njinkoue, J. M., Barnathan, G., Miralles, J., M. Gaydon, E. & Samb, A.2001. Lipids and fatty acids in muscle, liver and skin of three edible fish from the Senegalese coast: *Sardinella maderensis*, *Sardinella aurita* and *Cephalopholis taeniops*. Fish physiology.2: 101-112.

Nunomura¸ W. 1983.Immunohistochemical localization of vitellogenin in hepatic cell of some salmonid fishes¸Fish physiology. 34(2): 1-2 .

Ortiz¸ J. B. 2008. Histochemical characterization of oocytes of swordfish (*Xiphiasgladius).* University of Siena¸ Fish physiology. 72(3): 1-13.

Parker¸ L. M. 1993. Biochemical and histochemical properties of hepatic tumor of rainbow trout*(* *Oncorhynchusmykiss).* University of California Davis.USA.

Rainuzzo, J., Reitan, K & Olsent, Y. 1998. The significance of lipid at early of marine fish.Trondheim, Norway.

Sarasquete, C., Canales, C & Pascu, E. 2002. Oogenesis in Blue fin tuna(*Thunnus thynnus L.*), a histological and histochemical study. Histology and Histopathology, 17 (3) :775- 788.

Segner, H & Witt, U. 1990. Weaning experiments with Turbot(*Scophthalmus maximus*), election microscopic study of liver. Mar. Biol., 105: 353-361.

Shirai, N., Suzaki, H., Toukarian, S.H .& Wads, S.H. 2000. Spawning and season affect lipid content and fatty acid composition of ovary and liver in Japanese cat fish(*Silurus asotus).* Department of Food science and Technology, Tokyo.

Sisekkoprucu¸ S. & Koprucu¸ k. 2002. Immunohistochemical identification of peptide hormones in the endocrine cells of the gastrointestinal tract of the *Oreochromisniloticus*.Compertive biochemistry and fish . part B:Biochemistry and molecular biology 141:2 Firat University.

Vandervan, T.M. 2003. Vitellogenin expression in Zebra fish(*Deniro rerio*) evaluation by histochemistry, immunochemistry and in situ mRNA hybridization. Aquatic toxicology 65:1-6.

Valtonen, T. 1973. Seasonal and sex- bound variation in the carbohydrate metabolism of the liver of the White fish*(Coregonus nasus*). Department of zoology and bothanian Ouluto, Finland.

Wang, L.H & Tsai, Cl. 2000. Sex differences in the response of serum calcium concentration to temprature and estrogen in Tilapia(*Oreochromis mossambicus*). zoological studies, 39(1): 55-60.

Yenshiau, sh. 1997. Utilization of carbohydrate in warm water fish with particular refrence to Tilapia(*Oreochromis niloticus xo. Aureus*). Department of Marine food science, National Taiwan.