

بررسی بافت شناسی و روند رسیدگی جنسی تخمدان ماهی سیم (*Abramis brama orientalis* (Berg ۱۹۰۵) بوسیله القای LHRHa_۲ و آنتاگونیست‌های دوپامین

- سارا کوهی لای (نویسنده مسئول)
گروه بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
- شهربانو عریان
گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران
- همایون حسین زاده صحافی
مؤسسه تحقیقات شیلات، تهران
- مریم رضاییان
بخش بافت شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
- ندا خسروپناه
گروه بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
- فردوس ابراهیم پور
بخش بافت شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
تاریخ دریافت: تیرماه ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: اسفندماه ۱۳۸۷
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۸۰۴۴۴۸۷
Email : sarakoohi61@yahoo.com

چکیده

در پژوهش حاضر مطالعات بافتی به دنبال تقسیم‌بندی ماهیان سیم ماده *Abramis brama orientalis* در ۸ تیمار و در نتیجه القای LHRHa_۲ ۳ μg/kg، متوکلوپرامید ۵ mg/kg و کلرپرومازین ۱۰ mg/kg، صورت پذیرفت. این تیمارها شامل تزریق انفرادی و ترکیبی ترکیبات مذکور، تیمار کنترل (بدون هیچ‌گونه تزریق) و شاهد (سالین) بودند. نتایج تحقیق نشان دادند هر سه ترکیب آزمایش شده در پژوهش حاضر دارای اثر تحریکی بوده و منجر به پیشرفت رسیدگی جنسی گردیدند. LHRHa_۲ طی تیمارهای انفرادی و ترکیبی منجر به بلوغ اووسیت‌ها گردیده و تغییرات کیفی در اووسیت‌ها در طول القاء تخم ریزی به هم پیوستن واکوئل چربی به صورت یک واکوئل بزرگ و حل شدن دانه‌های زرده به علت افزایش فعالیت پروتئولیتیک در طول بلوغ نهایی صورت گرفت. متوکلوپرامید نیز منجر به تسریع رسیدگی جنسی در اووسیت‌ها گردیده و اووسیت آماده ورود به مراحل نهایی رسیدگی جنسی و بلوغ شده است، ولی کلرپرومازین تأثیر چشمگیری نداشته و از آنتاگونیست‌های قوی و اختصاصی دوپامین نمی‌باشد هم‌چنین اندازه قطر اووسیت‌ها در تیمارهای متوکلوپرامید ۸۱۰ میکرون، LHRHa_۲ ۷۷۲ میکرون، کلرپرومازین ۶۸۰ میکرون، متوکلوپرامید+LHRHa_۲ ۵۴۵ میکرون، کلرپرومازین+LHRHa_۲ ۵۱۵ میکرون، متوکلوپرامید+کلرپرومازین+LHRHa_۲ ۳۸۳ میکرون و کنترل ۳۷۹ میکرون بود و قطر تخمک‌ها در هر یک از تیمارهای انفرادی، در مقایسه ترکیبات مذکور با تیمار کنترل اختلاف معنی‌دار ایجاد گردید (P < ۰/۰۵).

کلمات کلیدی: رسیدگی جنسی، LHRHa_۲، آنتاگونیست دوپامین، سیم *Abramis brama orientalis*

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 84 pp: 31-39

Ovarian histological and sexual maturation study in bream *Abramis brama orientalis* (Berg, 1905) through induce LHRHa2 and dopamine antagonists

By: S. Kooheilai (Corresponding Author; Tel: +989128044487) and N. Khosropanah, Marine Biology Dept, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Sh. Oryan, Biology Dept, Science Faculty, Tarbiat Moalem University, Tehran, H. Hosseinzadeh Sahafi, Iranian Fisheries Research Organization, Tehran, M. Rezaian and Ferdos Ebrahimpoor, Histology Dept of Anatomy, Faculty of Vet Medicine, Tehran University, Tehran.

In the present study histological studies was conducted after the female *Abramis brama orientalis* was exposed to eight treatment phases in which LHRHa₂ (3 µg/kg), Metoclopramide (5 mg/kg), and Chlorpromazine (10 mg/kg) were inoculated. The treatments were characterized by combined and solitary injections, control group (o injection), and experimental group (saline). The results showed that all three investigated compositions enjoy arousal effects which bring about sexual maturity. In both solitary and combined treatments LHRHa₂ entailed oocyte maturity and qualitative developments among the oocytes occurred during the spawning period and fat vacuole as a macro vacuole and resolution of the vitelline took place due to improvements in the proteolytic activity during the final maturity phase. Metoclopramide fostered sexual maturity among the oocytes which have been ready to enter the last and final sexual maturity stage; however, Chlorpromazine did not have any significant impacts and thereby they are not identified as a powerful and special dopamine types. Oocyte diameter in treatments Metoclopramide: 810µm, LHRHa₂: 773µm, Chlorpromazine: 680µm, Metoclopramide+LHRHa₂: 545µm, Chlorpromazine+LHRHa₂: 515µm, Metoclopramide+Chlorpromazine+LHRHa₂: 383 µm and Control: 379.

Key words: Sexual maturation, LHRHa₂, Dopamine antagonist, *Abramis brama orientalis* (Berg, 1905)

مقدمه

ماهی سیم یک ماهی نیمه مهاجر است (۴)، معمولاً در خلیج‌ها، رودخانه‌ها و دریاچه‌ها زندگی می‌کند (۲). ماهی سیم یکی از ماهیان با ارزش اقتصادی دریای خزر است که مصرف‌کننده اصلی آن مردم استان گیلان و به خصوص اهالی رشت می‌باشند (۵)، (شکل ۱). با توجه به اینکه زیرگونه سیم *Abramis brama orientalis* به عنوان یکی از گونه‌های در حال انقراض در دریای خزر معرفی شده است، بنابراین عمده گزارشات در داخل کشور در جهت برآورد و حمایت ذخایر گونه مذکور از طریق روش‌های مختلف تکثیر ماهی سیم صورت پذیرفت. با توجه به از بین رفتن ذخایر این گونه، شیلات ایران از سال ۱۳۶۹ کار تکثیر مصنوعی ماهیان مولد و رهاسازی بچه ماهیان این گونه را به تالاب انزلی آغاز نموده است، به طوری که در سال ۱۳۸۲ میزان رها کرد نسبت به سال ۱۳۷۱ به میزان ۲/۹ برابر افزایش داشته است (۶). طی بررسی‌های به عمل آمده در سال ۱۳۴۹ مشخص شده که بالاترین سن ماهیان سیم صید شده مربوط به سنین ۳ و ۴ سالگی (حدود ۴۵ درصد) بوده است که این نشانه صید غیر اصولی این ماهیان و تحت فشار بودن ذخایر این ماهی در سال‌های اخیر می‌باشد (۳)، بنابراین بیش از ۹۰ درصد ماهیان صید شده در تالاب انزلی حتی فرصت یک بار تخم‌ریزی را هم نداشته‌اند (۵). امروزه فعالیت‌های مرتبط با تکثیر و پرورش آبزیان در دنیا و در کشور ما به عنوان یکی از فعالیت‌های اقتصادی مهم و قابل رقابت با دیگر فعالیت‌ها مطرح است. در حال حاضر با توجه به مطالعات انجام شده در

زمینه امکان تولید آبزیان پرورشی در دنیا و در کشور ما، ظرفیت تعیین شده برای آبزیان در تأمین پروتئین حیوانی از طریق فعالیت‌های تکثیر و پرورش آبزیان رو به افزایش است. در ماهیان استخوانی به خوبی شناخته شده که زرده‌سازی و رسیدگی نهایی اووسیت به وسیله گنادوتروپین‌ها از طریق ترشح استروئیدها به وسیله سلول‌های فولیکولی اطراف اووسیت‌ها صورت می‌گیرد (۱۳). در تعدادی ماهیان استخوانی (DP- β ۲۰ و 17α)، به عنوان یک (Maturation Inducing Hormone) MIH معرفی شده است، اگرچه در Sciaenid Fish (β -S ۲۰) به عنوان یک MIH معرفی و مطالعه شده است (۲۰). GTH II رسیدگی نهایی اووسیت را بوسیله تکمیل ایجاد بلوغ تخمدان و بوسیله تحریک سلول‌های فولیکولی جهت سنتز (Maturation Inducing Steroide) MIS یا MIH انجام می‌دهد (۱۵). عملکرد رسیدگی MIH در سطح اووسیت توسط فاکتور سیتوپلاسمیک MPF ایجاد می‌شود (۱۸). در بیشتر ماهیان استخوانی سطح cAMP داخل سلولی در لایه‌های فولیکولی تخمدان به تحریک استروئیدوزن بستگی پیدا می‌کند (۸). در پستانداران آزادسازی هورمون LH و FSH، بوسیله LHRH تحریک می‌شود. این نوروپپتید از بخش هیپوتالاموس که به عنوان یک دکاپپتید شناسایی شده است، آزاد می‌شود (۷). در گونه‌های مختلف ماهیان استخوانی مانند گربه ماهی آفریقایی، رسیدگی اووسیت و اوولاسیون حتماً تحت شرایط تکثیر و پرورش ماهی رخ نمی‌دهد (۱۷). این پژوهش با هدف گسترش اطلاعات از روند رسیدگی جنسی در نتیجه القاء ترکیبات تحریکی در ماهی سیم

در مقاطع بافتی متعلق به تیمار کنترل جذب زرده کبدی و ذخیره آن در زرده سیتوپلاسم اووسیت، شروع مرحله زرده سازی را نشان می‌دهد، قطر تخمک‌ها ۳۷۹ میکرون می‌باشد (شکل ۳). اووسیت‌های مربوط به تیمار متوکلوپرامید+کلرپرومازین+LHRHa₂ شامل سیتوپلاسمی است که محتوی وزیکول‌های زرده‌ای و لایه سلول‌های فولیکولی است، سلول‌های تکا و گرانولوزا در ساخت استروئیدهای تخمدان مؤثر می‌باشند (شکل ۴) قطر تخمک‌ها ۳۸۳ میکرون بوده و قطر تخمک‌های این تیمار در مقایسه با تیمار کنترل هیچ گونه اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ($P>0/05$). در اووسیت‌های متعلق به تیمار کلرپرومازین+LHRHa₂، کانال‌های روزنه‌ای میکروویلی‌های اووسیت و سلول‌های گرانولوزا با پوشش زرده در هم می‌شوند، در نهایت اتصالات با روزنه در سلول‌های غیر متجانس و متجانس با فولیکول‌های زرده تماس می‌یابند (شکل ۵)، قطر تخمک‌ها ۵۱۵ میکرون می‌باشد و در مقایسه قطر تخمک‌های این تیمار با تیمار کنترل، اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌گردد ($P>0/05$). در نمونه‌های متعلق به تیمار متوکلوپرامید+LHRHa₂، قطرات زرده‌ای به شکل توده‌ای افزایش یافته و حتی بیشترین قسمت فضای سیتوپلاسم را در نتیجه رشد اووسیت پُر می‌کند (شکل ۶)، قطر تخمک‌ها ۵۴۵ میکرون می‌باشد و قطر تخمک‌های این تیمار در مقایسه با تیمار کنترل نیز اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد ($P>0/05$).

در اووسیت‌های مربوط به تیمار کلرپرومازین، ساختمان دیواره سلول‌های فولیکولی در طول تشکیل زرده کامل‌تر و پیچیده‌تر می‌شود و ذرات به علت طولانی بودن فرایند جذب زرده‌ای و هم‌چنین تولید زرده، در ابعاد و سایزهای مختلف مشاهده می‌شود (شکل ۷)، قطر تخمک‌ها ۶۸۰ میکرون می‌باشد و در مقایسه قطر تخمک‌های این تیمار با تیمار کنترل اختلاف مؤثر و معنی‌داری مشاهده می‌گردد ($P<0/05$). در نمونه‌های متعلق به تیمار LHRHa₂، ابتدا مهاجرت وزیکول زاینده به سمت قطب حیوانی صورت می‌گیرد (شکل ۸)، تعداد دانه‌های زرده‌ای به شدت افزایش یافته و تشکیل توده‌های بزرگ‌تر زرده‌ای را می‌دهند. حفرات که محل ذخیره چربی هستند در سیتوپلاسم به تعداد زیاد دیده می‌شوند (شکل ۹) قطر تخمک‌ها ۷۷۳ میکرون می‌باشد و قطر تخمک‌های این تیمار در مقایسه با تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<0/05$).

در اووسیت‌های متعلق به تیمار متوکلوپرامید نیز بزرگ و حجیم شدن اووسیت در اثر جذب آب کاملاً قابل ملاحظه است. شروع و تکمیل دومین تقسیم کاهش کروموزومی بعد از لقاح آغاز می‌گردد، هم‌چنین دیواره سلولی ضخیم‌تر شده و منافذ کانال‌ها در آن ایجاد می‌شود، این ویژگی باعث جذب ترکیبات زرده‌ای از خارج به داخل می‌شود (شکل ۱۰)، قطر تخمک‌ها ۸۱۰ میکرون می‌باشد و در مقایسه تخمک‌های این تیمار با تیمار کنترل اختلاف مؤثر و معنی‌دار آماری مشاهده می‌گردد ($P<0/05$) (جدول ۱).

بحث و نتیجه گیری

در پژوهش حاضر نمونه بافتی متعلق به تیمار متوکلوپرامید ۵ mg/kg، اووسیت رسیده‌ای می‌باشد که تجمع مقادیر زیادی ذرات ویتلین و چربی در داخل اووسیت صورت گرفته و به شکل توده‌های واحد

Abramis brama orientalis، انجام گردید و با توجه به کمبود تحقیقات و مطالعات کافی در این زمینه، سعی بر آن شده که با استفاده از بررسی‌های میکروسکوپی روند رسیدگی جنسی در ماهی سیم تشریح گردد.

مواد و روش کار

مطالعات بافتی به دنبال تقسیم‌بندی ۶۴ عدد ماهی سیم ماده در ۸ تیمار و در نتیجه القاء ۳ μg/kg LHRHa₂، متوکلوپرامید ۵ mg/kg و کلرپرومازین ۱۰ mg/kg، در اردیبهشت ۱۳۸۶ صورت پذیرفت. این تیمارها شامل تزریق انفرادی و ترکیبی ترکیبات مذکور، تیمار کنترل (بدون هیچ‌گونه تزریق) و شاهد (سالین) بودند. به دنبال جواب‌دهی تعدادی از ماهیان، از سایر ماهیان به صورت انتخابی از هر تیمار برش‌های بافتی تهیه شد. عملیات بافت شناسی شامل تثبیت نمونه‌های بافتی در محلول بوئن که شامل ترکیبی از اسید پیکریک (به میزان ۷۰ درصد)، اسید استیک (به میزان ۵ درصد) و فرمالین (به میزان ۲۵ درصد) می‌باشد و مراحل تهیه نمونه‌های بافتی شامل آبگیری، شفاف سازی، آغستگی، قالب‌گیری، برش‌گیری، رنگ آمیزی و مونته کردن است. سه مرحله اولیه آبگیری، شفاف‌سازی و آغستگی در دستگاه تمام اتوماتیک اتوتکنیکوم صورت پذیرفت. طی آبگیری بافت به ترتیب در آب مقطر، اتانول‌های ۷۰'، ۸۰'، ۹۰'، ۹۵' درجه و دو اتانول مطلق یا ۱۰۰' درجه، قرار داده شد. شفاف‌سازی شامل دو مرحله گزیرلول بوده و آغستگی بوسیله پارافین انجام گردید. قالب‌گیری نیز بوسیله پارافین جامدی که در درجه حرارت ۵۸ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد به حالت پارافین مایع در آمده و سپس در قالب‌های مخصوصی که نمونه در آن قرار داده شده است ریخته تا قالب بسته شود، صورت گرفت. در ادامه برش‌گیری توسط دستگاه میکروتوم به ضخامت ۶ میکرون انجام گردیده و نمونه مورد نظر بر روی لام سوار شد (۱). رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین و در انتها نیز قرار دادن لام بر روی لام طی مرحله مونته کردن انجام شد (۱۰). سنجش اندازه قطر تخمک‌ها نیز با استفاده از گراتیکول در درشت‌نمایی ۱۰ صورت پذیرفت. به این ترتیب نمونه بافت جهت تشریح و بررسی آماده مشاهده در زیر میکروسکوپ گردید. در مشاهدات مقاطع بافتی از بزرگنمایی‌های ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری شامل محاسبه میانگین‌ها و آزمون T (T test) با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج

اووسیت‌های مرحله پیش هستکی: در مرحله پیش هستکی اولیه هستک‌ها به صورت پراکنده در داخل هسته قرار داشته و تقسیم کاهش کروموزومی در مرحله دیپلوتن شروع می‌گردد اما زمان مرحله کروموزومی بسته به حرکت هسته‌ها و انواع گونه‌های مختلف فرق می‌کند. در مرحله پیش هستکی ثانویه هستک‌ها در دیواره هسته به صورت منظم قرار گرفته‌اند. اولین رشد اووسیت‌ها در زمان کناری شدن هستک انجام می‌گیرد، این مرحله دارای خصوصیات نشان‌دهنده جسم زرده‌ای بالبیانی در نزدیکی هسته می‌باشد (این اووسیت‌ها به طور پراکنده و در تعداد کم بین اووسیت‌های رسیده قرار می‌گیرند)، (شکل ۲).



شکل ۱- مورفولوژی ماهی سیم *Abramis brama orientali*

شکل ۲- اووسیت مرحله II جنسی،

۱: هسته،

۲: هستک‌ها، در مرحله پیش هستکی ثانویه وجود دارند، چرا که هستک‌ها به شکل منظمی در بخش کناری هسته و سلول‌های فولیکولی در اطراف اووسیت قرار دارند.

۳: هستک‌ها در مرحله پیش هستکی اولیه قرار دارند و به صورت منظم در دیواره داخلی هسته قرار دارند (۱۰۰×).

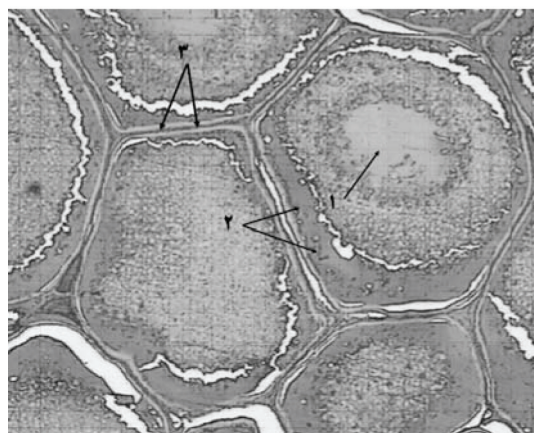


شکل ۳- تصویری از تخمک‌های در حال رشدی است که در مراحل ابتدایی ویتلوژنز به سر می‌برند.

۱: هسته،

۲: ذرات زرده،

۳: لایه‌های فولیکولی، تعدادی ذرات ویتلین در سیتوپلاسم قابل مشاهده هستند و مواد زرده‌ای در حال ورود به داخل سلول هستند. سیتوپلاسم حاوی مواد زرده‌ای و سلول‌های لایه فولیکولی می‌باشد، تیمار کنترل (۲۰×).



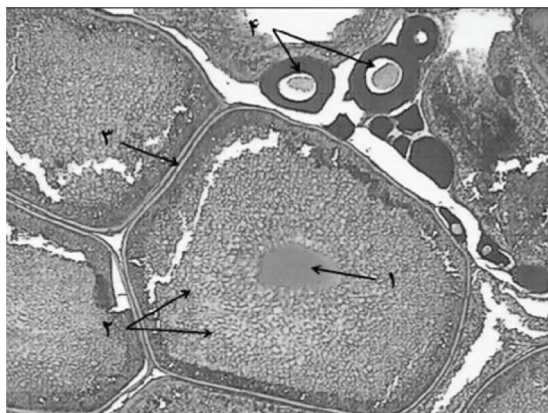
شکل ۴- اووسیت در مرحله ابتدایی IV جنسی،

۱: هسته،

۲: مواد زرده‌ای،

۳: لایه‌های فولیکولی،

۴: اووسیت مرحله II جنسی، در این مرحله مواد زرده‌ای همچنان در حال ورود به اووسیت هستند و ذرات زرده‌ای در دیواره خارجی از طریق عبور از روزنه‌ها و پینوسیتوز وارد شده و از دیواره داخل از طریق میکروویلی‌ها به درون سیتوپلاسم تخمک نفوذ می‌کند، تیمار متوکلوپرامید ($5 \text{ mg/kg} + 3 \text{ LHRHa}_2 \text{ } \mu\text{g/kg}$) + کلرپرومازین (10 mg/kg) ($\times 20$).

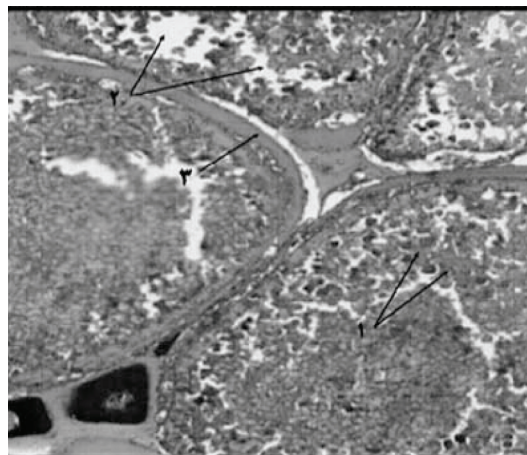


شکل ۵- اووسیت‌هایی در اواسط مرحله IV جنسی،

۱: ذرات زرده‌ای،

۲: توده‌های چربی،

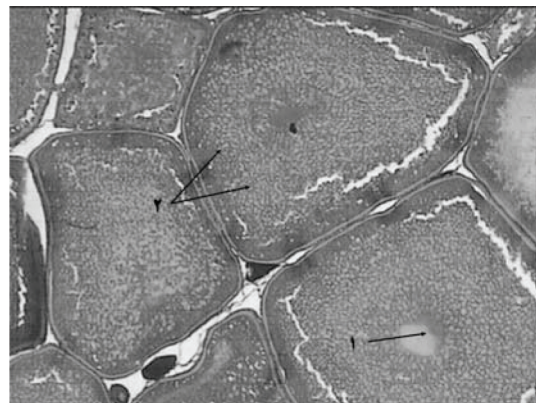
۳: لایه‌های فولیکولی، در این مرحله ذرات زرده‌ای و چربی در سلول اووسیت تجمع یافتند و ورود هر چه بیشتر این ترکیبات به داخل اووسیت‌ها ادامه دارد، تیمار کلرپرومازین (10 mg/kg) + ($3 \text{ LHRHa}_2 \text{ } \mu\text{g/kg}$) ($\times 50$).



شکل ۶- اووسیت‌های مرحله انتهایی IV جنسی،

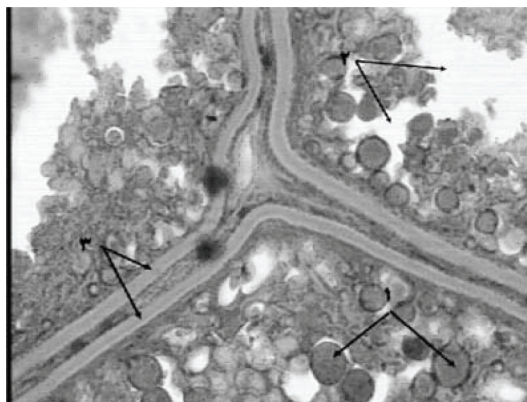
۱: هسته،

۲: ذرات زرده، دانه‌های زرده‌ای و ذرات چربی به تدریج در داخل اووسیت افزایش یافته و به صورت توده‌های واحد و بزرگی تبدیل می‌شوند و اووسیت آماده ورود به مراحل نهایی رسیدگی جنسی می‌گردد، تیمار متوکلوپرامید (5 mg/kg) + ($3 \text{ LHRHa}_2 \text{ } \mu\text{g/kg}$) ($\times 50$).



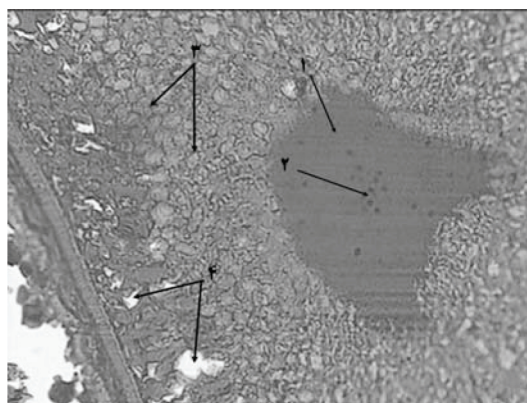
شکل ۷- اووسیت‌های رسیده،

- ۱: مواد زرده‌ای،
- ۲: توده‌های چربی،
- ۳: لایه‌های فولیکولی، این اووسیت‌ها از مرحله IV جنسی عبور کرده و وارد مرحله نهایی و سپری کردن بلوغ و رسیدگی نهایی خود شده‌اند، تیمار کلرپرومازین (10 mg/kg) (100x).



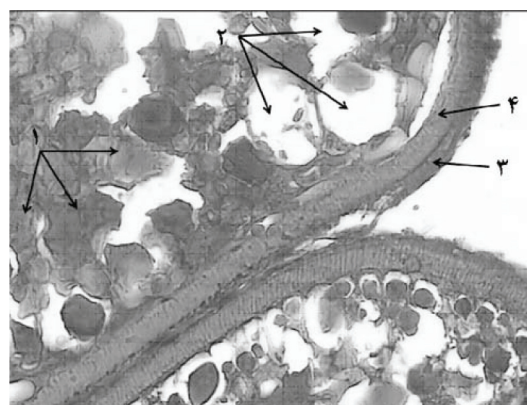
شکل ۸- این تصویر مرحله‌ای از حرکت هسته به سمت قطب حیوانی است و اووسیت در انتهای مسیر بلوغ خود می‌باشد.

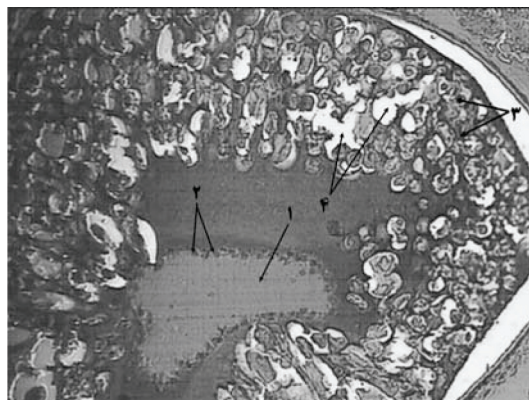
- ۱: هسته،
- ۲: هستک‌ها،
- ۳: ذرات ویتلین،
- ۴: ذرات چربی، هستک‌ها به تعداد زیاد در داخل هسته قابل مشاهده هستند و اووسیت به طور کامل از توده‌های بزرگ زرده‌ای و چربی تشکیل شده است و ورود آب نیز به مقدار زیاد به داخل اووسیت صورت خواهد گرفت، تیمار (LHRH_α) (3 μg/kg) (100x).



شکل ۹- اووسیت بالغ و رسیده،

- ۱: ترکیبات و ذرات زرده‌ای،
- ۲: توده‌های چربی،
- ۳: غشاء خارجی،
- ۴: غشاء داخلی، ذرات ویتلین به تدریج به صورت مجتمع‌های وزیکولی دیده می‌شوند و ذرات چربی هم به صورت توده‌های عظیم چربی وجود دارند. تیمار LHRH_α (3 μg/kg) (200x).





شکل ۱۰- ۱: هسته،

۲: هستک‌ها،

۳: ذرات ویتلینی،

۴: ذرات چربی، تجمع مقادیر زیادی ذرات ویتلین و چربی در داخل اووسیت صورت گرفته و به شکل توده‌های واحد درآمده، مهاجرت GV تکمیل می‌شود، هستک‌های فراوانی نیز در داخل هسته قابل مشاهده هستند، اووسیت به طور کامل رسیده و در حال جذب آب و آماده ورود به مرحله V و تخلیه می‌باشد، تیمار متوکلوپرامید (۵ mg/kg) (× ۱۰۰).

جدول ۱- مقایسه قطر تخمک‌های (میکرون) تیمار کنترل و هر یک از تیمارها

تعداد	میانگین ± SEM	حداکثر	حداقل	
۲۷	۳۷۹/۲۶۴ ± ۸/۲۷۲	۴۴۸	۳۲۰	تیمار کنترل
۳۳	۸۱۰/۴۱۶ ± ۱۱/۳۶۸*	۹۴۴	۶۴۰	تیمار متوکلوپرامید (۵ mg/kg)
۲۷	۷۷۳/۳۲۸ ± ۱۲/۱۳۷۶*	۸۸۰	۶۴۰	تیمار LHRHa ₂ (۳ μg/kg)
۲۷	۶۸۰/۸۹۶ ± ۱۲/۴۴۴*	۸۰۰	۵۹۲	تیمار کلرپرومازین (۱۰ mg/kg)
۲۷	۵۴۵/۱۸۴ ± ۹/۴۶۸۸	۶۴۰	۴۰۰	تیمار متوکلوپرامید + LHRHa ₂
۳۳	۵۱۵/۸۷۲ ± ۹/۶۲۴	۶۴۰	۴۱۶	تیمار کلرپرومازین + LHRHa ₂
۳۰	۳۸۳/۴ ± ۶/۶۲۵۶	۴۴۰	۳۲۰	تیمار متوکلوپرامید + کلرپرومازین + LHRHa ₂

- در جدول میانگین‌هایی که با * نشان داده شده است دارای اختلاف معنی‌دار هستند، $P < 0.05$.
- در جدول قطر تخمک‌های تیمار کنترل با هر یک از تیمارها به صورت مجزا مقایسه گردیده است.

البته گاهی در تزریق LHRHa ممکن است اثر معکوس نیز دیده شود، اگرچه نتایج مثبت استفاده از ترکیب مذکور در تحریک مکرر بلوغ (سه بار در طول سه روز) به اثبات رسیده است (۱۳)، بروز این اثر معکوس شامل دو مرحله می‌باشد مرحله اول مقدماتی بوده که در جریان آن کاهش تعداد گیرنده‌ها اتفاق می‌افتد و در نتیجه پپتیدهای فعال بیولوژیک ذخیره شده و این تراکم موجب توقف فعالیت گنادوتروپینی سلول‌های گنادوتروف می‌گردد. مرحله دوم شامل کاهش فعالیت عملکرد شبکه‌های یونی بوده و در زمانی اتفاق می‌افتد که تعداد گیرنده‌ها به اندازه طبیعی خود بازگشته است (۱۶). بنابراین هر سه ترکیب آزمایش شده در پژوهش حاضر دارای اثر تحریکی بوده و منجر به پیشرفت رسیدگی جنسی گردیدند. LHRHa و متوکلوپرامید به شکل مؤثرتری عمل کردند در حالی که کلرپرومازین تأثیر خیلی چشم‌گیری از خود نشان نداده و از آنتاگونیست‌های قوی و اختصاصی دوپامین نمی‌باشد.

سیاسگزاری

بدینوسیله از بخش بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در انجام این پروژه ما را همراهی نمودند، کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

منابع مورد استفاده

- ۱- پوستی، ا، صدیق مردوستی، ع، (۱۳۷۸) اطلس بافت‌شناسی ماهی، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران، ۴۸۰ صفحه.
- ۲- حسینی، س، ا و سیرنگ، ه، (۱۳۶۹) ماهی سیم، سازمان تحقیقات شیلات ایران (معاونت تحقیقات و آموزش شیلات)، ۱۲۲ صفحه.
- ۳- صیاد بورانی، م، (۱۳۸۰) بررسی کمی و کیفی بچه ماهیان استخوانی رها سازی شده در استان گیلان، مؤسسه تحقیقات شیلات و آموزش شیلات ایران (مرکز تحقیقات شیلاتی استان گیلان)، گیلان، ایران، ۱۱۷ صفحه.
- ۴- عباسی، ک، ولی پور، ع، حقیقی، د، سر پناه، ع و نظامی، ش، (۱۳۷۸) اطلس ماهیان ایران آب‌های داخلی گیلان، مرکز تحقیقات شیلاتی گیلان، ۱۱۳ صفحه.
- ۵- عبدالملکی، ش، (۱۳۸۳) پویایی جمعیت ماهی سیم (*Abramis brama orientalis*) (در سواحل ایرانی دریای خزر در سال ۱۳۸۰-۱۳۷۹، مجله پژوهش و سازندگی (در امور دام و آبزیان)، شماره ۶۸، ۸ صفحه.
- ۶- عبدالملکی، ش و غنی نژاد، د، (۱۳۸۲) وضعیت ذخایر ماهیان استخوانی در سواحل ایرانی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، ایران، صفحات ۹-۱.

7- De Leeuw, R. ; Goos, J.TH. and Van W.J. (1987) The regulation of gonadotropin release by neurohormones and gonadal steroids in the African catfish (*Clarius gariepinus*). *Aquaculture*. vol. 63. pp. 43 – 58.

8- Devlin, R.H. and Nagahama, Y. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological and environmental innences, *Aquaculture*. vol. 208. pp. 191 – 364.

در آمده اند؛ از طرفی نمونه مورد نظر در تیمار کنترل تخمک های در حال رشدی است که در مراحل ابتدایی ویتلوژنز به سر می برند و مواد زرده‌ای در حال ورود به داخل سلول هستند. بنابراین القاء متوکلوپرامید (5 mg/kg) منجر به تسریع رسیدگی جنسی گردیده است.

در طول رشد و نمو اووسیت گنادوتروپین‌ها باعث تحریک تخمدان و سپس تولید E2 می‌شوند و تستوسترون نیز به عنوان پیش ساز استرادیول مطرح می‌باشد (۱۹). در نمونه بافت متعلق به تیمار LHRHa ($3 \mu\text{g/kg}$) در تحقیق حاضر نیز اووسیت بالغ و رسیده‌ای است که در آن ذرات ویتلین به تدریج به صورت مجتمع‌های وزیکولی دیده می‌شوند و ذرات چربی هم به صورت توده‌های عظیم چربی وجود دارند و در مقایسه آن با تیمار کنترل رسیدگی اووسیت قابل توجه و چشمگیر می‌باشد، همچنین در رابطه با ترکیب LHRHa در طی یک بررسی مشخص گردید که این ترکیب دارای استفاده مؤثری جهت اوولاسیون و تخم‌ریزی در تعدادی از ماهیان تجاری مهم شامل تعدادی گونه‌های خانواده هامور ماهیان می‌باشد و در برخی گونه‌ها مانند قزل آلا (*Cynoscion nebulosus*) و Sciaenops, ocellatus Red Drum که دارای اووسیت‌هایی با رشد تکامل یافته می‌باشند، یک تزریق منفرد یا ورود خوراکی LHRHa برای انجام اوولاسیون کافی است (۱۴). در نمونه مربوط به تیمار متوکلوپرامید (5 mg/kg) LHRHa ($3 \mu\text{g/kg}$)، دانه‌های زرده‌ای و ذرات چربی به تدریج در داخل اووسیت افزایش یافته و به صورت توده‌های واحد و بزرگی تبدیل می‌شوند و اووسیت ماده ورود به مراحل نهایی رسیدگی جنسی و بلوغ می‌گردد، همزمان با بلوغ اووسیت نیز غشای سلولی و غشای ویتلینی دستخوش تغییراتی می‌شوند که مهم‌ترین آنها شامل ایجاد دو لایه یکی به نام لایه خارجی (*Zona externa*) دارای طرح لایه لایه بوده و دیگری به نام لایه داخلی (*Zona interna*) که دارای ساختمان زیگزاگ و یا آجری فرم است، می‌باشند. Horvath و همکاران نیز در سال ۱۹۹۷ به یک تکنیک جدید از تحریک اوولاسیون در کپور ماهیان تجاری با استفاده از کیت محتوی GnRH، دست یافتند. یک کیت Ovopel، حاوی آنالوگ GnRH پستانداران در دوز ($20 - 18 \mu\text{g}$) و آنتاگونیست دوپامین مانند متوکلوپرامید با دوز ($10 - 8 \text{ mg/kg}$) می‌باشد (۱۲). در آزاد ماهیان GTH II در تحریک تولید ($17\alpha\text{-OHprog}$)، بوسیله لایه هتکا و تولید DHP (که استروئید ایجادکننده رسیدگی در آزاد ماهیان است) بوسیله لایه گرانولوزا در حضور $17\alpha\text{-OHprog}$ بسیار مؤثر است (۱۱)، همچنین القاء LHRHa به طور قابل ملاحظه‌ای در فصل تخم‌ریزی ماهی *Flounder (Pleuronectes americanus)*، استفاده می‌شود (۱۴).

در پروژه حاضر در ارتباط با تیمار LHRHa ($3 \mu\text{g/kg}$) + کلرپرومازین (10 mg/kg) + متوکلوپرامید (5 mg/kg) نمونه مورد نظر شامل اووسیتی است که در مرحله ابتدایی IV قرار دارد، در این مرحله مواد زرده‌ای همچنان در حال ورود به اووسیت هستند، این درحالی است که رسیدگی اووسیت در تیمار مذکور به نسبت سایر تیمارها خیلی چشم‌گیر و قابل توجه نمی‌باشد. در گلدفیش‌ها نیز تزریق‌ها تنها یا چندگانه LHRH یا آنالوگ آن در دوزهای مختلف نمی‌تواند سرعت خیلی بالایی از اوولاسیون ایجاد کند (۹).

163 – 177.

15- Peter, R.E. and Yu, K.L. (1997) Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. vol. 7. pp. 173 – 197.

16- Ren, L.H., Kraak, J.Y. ; Liang, C. ; Peng, G.Y. ; Li, L.Z. ; Lu, X.Y. ; Zhou, M.L. ; Chang, J.P. and Peter, R.E. (1986) The effects of LHRHa and drugs which block the effects of dopamine on gonadotropin secretion and ovulation in fish cultured in China. *Aquaculture of cyprinids*. pp. 139 – 150.

17- Schild, R.G. and Peter, J. (1985) Innervation of GTH cells by GnRH containing nerve fibres in the African catfish (*Clarius gariepinus*) : an EM Immunocytochemical study. *Neurosci Lett Suppl*. vol. 22. pp 111.

18- Senthilkumaran, B. ; Yashikuni, M. and Nagahama, Y. , 2004. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicle prior to oocyte maturation, *Molecular and Cellular Endocrinology*. vol. 215. pp. 11 – 18.

19- Sukumasavin, N. ; Sakulthong, S. and Sangthong, R. (2000) A Comparison of the potency of dopamine antagonists on spawning induction in tail carp (*Puntius gonionotus* Bleeker). *Kasetsart*. vol. 34. pp. 240 – 247.

20- Tanaka, M. ; Nakajin, S. ; Kobayashi, D. ; Fukada, S. ; Guna, G. ; Todo, T. ; Senthilkumaran, B. and Nagahama, Y. (2002) Teleost ovarian carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase : Potential role in the production of maturation-inducing hormone during final oocyte maturation, *Biol Reprod*. vol. 66. pp. 1498 – 1504.

9- Goos, J.TH. ; De Leeuw, R. ; Van, W.J. ; Delft, M.L. and Glielen, J.TH. (1987) The effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa) in combination with different drugs with anti-dopamine and anti-serotonin properties on gonadotropin release and ovulation in the African catfish (*Clarius gariepinus*). *Aquaculture*. vol. 63, pp. 143–156.

10- Hung, S.S.O. Groff, J.M. Lutes, P.B. and Kotifiynn-Aikins, F. (1990) Hepatic and intestinal histology of juvenile white sturgeon fed different carbohydrates. *Aquaculture*. vol. 87. pp.349-360.

11. Kagawa, H. ; Tanaka, H. Okuzawa, K. and Kobayashi, M. (1998) GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream in vitro. *General and Comparative Endocrinology*. vol. 112. pp. 80 – 88.

12- Kucharczyk, D. Kujawa, R. Mamcarz, A. ; Targonska, K. Wyszomirska, E. Glogowski, J. Babiak, I. and Szabo, T. (2005) Inducing spawning in bream (*Abramis brama* L.) using pellets containing GnRH. *Czech J Anim*. vol. 3. pp. 89 – 95.

13- Lee, W.K. and Yang, S.W. , 2002. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroids hormones and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female Korean spotted sea bass (*Lateolabrax maculates*). *Aquaculture*. vol. 207. pp. 169–183.

14- Pankhurst, N.W. and Thomas, P.M. , 1998. Maintenance at elevated temperature delays the steroidogenic and ovulatory responsiveness of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to luteinizing hormone releasing hormone analogue. *Aquaculture*. vol. 166. pp.

