مقایسه برخی پارامترهای بیوشیمیایی در پلاسمای خون و موکوس پوست جنس ماده ماهی قرمز (*Carassius auratus*) در مراحل مختلف رسیدگی جنسی

زهرا روستا[۱]، بهرام فلاحتکار[۱،۲*]، میرمسعود سجادی[۱]، حامد پاکنژاد[۳] و پاتریک کستمونت[۴]

[۱] ایران، صومعه سرا، دانشگاه گیلان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

[۲] ایران، رشت، دانشگاه گیلان، پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، گروه علوم دریایی

[۳] ایران، گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات و محیط زیست، گروه شیلات

[۴] بلژیک، دانشگاه نامور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۱۱

چکیده

تعیین مراحل رسیدگی جنسی و آگاهی از شرایط فیزیولوژی تولیدمثل در ماهی به‌منظور مدیریت صحیح مولدها انجام می‌شود. با این هدف، کارایی استفاده از موکوس پوست به‌عنوان منبع مهمی از ترکیبات بیوشیمیایی و همچنین روش کم‌تهاجمی در تعیین مراحل رسیدگی جنسی ماهی قرمز ماده مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌گیری از ماهیان قرمز طی پنج ماه صورت گرفت و با توجه به آنالیز بافت‌شناسی گناد، ماهیان به پنج مرحله تولیدمثلی شامل: رشد اولیه (I)، کورتیکال آلوئولی (II)، زرده‌سازی اولیه (III)، زرده‌سازی نهایی (IV) و تخمریزی (V) تقسیم‌بندی و سطوح پروتئین کل محلول، کلسیم، لیپیدها (کلسترول و تری-گلیسرید) و آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی (ALP) در موکوس و پلاسما اندازه‌گیری شدند. میزان پروتئین موکوس در زرده‌سازی نهایی به صورت معنی‌داری نسبت به سایر مراحل تولیدمثلی افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). کلسیم موکوس در کل مراحل کم‌تر از پلاسما بود و سطوح کلسترول و تری‌گلیسرید موکوس در زرده‌سازی افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). سطح ALP در پلاسما پس از مراحل زرده‌سازی همچنان ثابت باقی ماند اما در موکوس طی مرحله تخمریزی کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۵$). تجزیه وتحلیل شاخص گنادوسوماتیک با پروتئین موکوس همبستگی مثبت داشت ($P < ۰/۰۱$). در مطالعه حاضر، سطح ALP موکوس به عنوان شاخص متمایز کننده مناسب مرحله زرده‌سازی و تخمریزی معرفی می‌شود. همچنین، نتایج این مطالعه نشان داد که تمام فاکتورهای بیوشیمیایی موکوس پوست، قابل اندازه‌گیری است و از موکوس می‌توان به‌عنوان ابزاری کم‌تهاجمی و جایگزین خون جهت پایش پاسخ‌های درون‌ریز ماهی، شاخص‌های تولیدمثلی و مراحل رسیدگی جنسی به‌خصوص در مراحل زرده‌سازی استفاده کرد.

واژه های کلیدی: موکوس، کلسیم، کلسترول، رسیدگی جنسی، ماهی قرمز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۰۳۷۴۲۸ پست الکترونیکی: falahatkar@guilan.ac.ir

مقدمه

لایه موکوس پوست به‌عنوان رابط مستقیم بین ماهی و محیط آبی عمل می‌کند و دارای ترشحات و نقش‌های بسیاری است. موکوس در سیستم ایمنی، تنفس، تنظیم یونی، اسمزی و تولیدمثل دخیل است (۳۸ و ۴۰). این لایه از پوست به‌علت دسترسی سریع و آسان، به‌عنوان یک ابزار تشخیصی موثر و مفید برای محققان به شمار می‌رود. همچنین با نمونه‌گیری از لایه موکوسی می‌توان از قربانی‌کردن ماهی‌ها، به‌خصوص در گونه‌های کوچک

جلوگیری کرد. روش جمع‌آوری موکوس، مولدها را از پاسخ فیزیولوژیک به عوامل استرس‌زا محافظت می‌کند و در مطالعات تولیدمثلی نیز مناسب‌تر از روش‌های مخرب بافت شناسی گنادها و استفاده از خون، ارزیابی شده است (۶، ۱۳ و ۳۸) نقش موکوس در تشخیص کارایی سیستم درون‌ریز و تولیدمثل ماهیان با ترشح ویتلوژنین (۲۷ و ۲۹) و ۱۱-کتوتستوسترون (۶ و ۳۸) و همچنین در ایمنی با ترشح لایزوزیم، کمپلمان، پروتئاز، ایمونوگلوبولین و غیره (۱۶ و ۴۴) به اثبات رسیده است. بنابراین نمونه‌برداری از موکوس به عنوان روش کم‌تهاجمی/غیرتهاجمی در سال‌های اخیر موضوع بسیاری از مطالعات را به خود اختصاص داده است و با توجه به داشتن بسیاری از ترکیبات مشابه (۶، ۳۶ و ۴۴) جایگزین مناسبی برای خون در مطالعات گسترده مربوط به گونه‌های مختلف ماهیان، به خصوص ماهیان باارزش خواهد بود (۶، ۱۳، ۲۹، ۳۸ و ۴۴).

از آنجا که دانش صحیح در مورد وضعیت سیستم تولیدمثل در مطالعات آبزی پروری به‌منظور مدیریت صحیح مولدها بسیار ارزشمند است، تلاش برای به‌کارگیری روش های غیرتهاجمی برای تشخیص جنسیت و مراحل رسیدگی جنسی ادامه دارد (۶ ، ۱۴ و ۴۸). سطوح در گردش استروئیدهای جنسی و ویتلوژنین در خون، به‌عنوان تنظیم کننده‌های حیاتی چرخه تولیدمثل، نشانگر مناسبی برای شناسایی جنس و / یا بلوغ جنسی به شمار می‌روند (۸، ۱۴ و ۲۵). مولکول ویتلوژنین یک گلیکوفسفولیپوپروتئین است که به‌منظور رسیدگی تخمدان به خون تخلیه می‌شود و حاوی مقدار زیادی کلسیم و فسفات می‌باشد (۲۶ و ۳۳). از طرفی آلکالین فسفاتاز (ALP) یک آنزیم هیدرولاز مسئول حذف گروه های فسفات می‌باشد و تحقیقات نشان داده است که این آنزیم تحت کنترل استروئیدهای جنسی بوده و محل اصلی فعالیت آن در سلول های تکای تخمدان است (۱۰). هورمون های جنسی همچنین در بازسازی یون کلسیم در زمان رسیدگی تولیدمثل نقش داشته که این یون در مهره داران، در طی چرخه تولیدمثلی افزایش می‌یابد (۳ و ۴). اندازه‌گیری ویتلوژنین باتوجه‌به هزینه‌بر بودن، لزوم دسترسی به تجهیزات آزمایشگاهی و دانش مناسب در رابطه با تعیین غلظت‌های معتبر، در بسیاری از موارد امکان‌پذیر نیست (۴ و ۲۹). کلسیم و فسفر خون شاخص‌های غیرمستقیم تعیین غلظت ویتلوژنین جهت تعیین توسعه تخمدان و مرحله رسیدگی جنسی محسوب می‌شوند (۱۸، ۲۴ و ۴۵). در ماهی کاد (*Gadus morhua*) کلسیم پلاسما به‌عنوان شاخص گردش استروژن در ماده‌ها (۱۰) و همچنین فاکتور تعیین کننده سطح ویتلوژنین در انواع مختلف ماهیان از جمله ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (۴۶) و ماهیان خاویاری (۴، ۲۴ و ۴۱) گزارش شده است. همچنین ارتباط مستقیم بین سطوح استروئیدهای جنسی با یون کلسیم و آنزیم آلکالین فسفاتاز در ارتباط با تکامل گناد در ماهی کپور نقره ای نر و ماده گزارش شده است. از طرفی در برخی موارد اندازه‌گیری آلکالین-لیبل فسفوپروتئین فسفروس، به دلیل دسترسی سریع و آسان به واکنشگرها و امکانات آزمایشگاهی، همچنین در برخی موارد نتایج دقیق تر نسبت به کلسیم ترجیح داده شده است (۳۳). ویتلوژنین علاوه بر اتصال به پروتئین، کلسیم و فسفر پلاسما، در انتقال لیپیدها و مواد حلال در چربی ها نقش مهمی را ایفا می‌کند (۴). اثر استروئیدهای جنسی در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) بر تغییر غلظت فاکتورهای بیوشیمیایی خون، مانند نوسانات سطح تری‌گلیسرید پلاسما (۴۹) و در بررسی پلاسمای ازون برون (*Acipenser stellatus*) نوسانات غلظت تری‌گلیسرید، کلسترول، فسفر و گلوکز گزارش شده است (۱۵). اسووبودا و همکاران با اندازه‌گیری پروتئین کل، لیپید، کلسترول، ترانس آمیناز، کراتین کیناز، آلکالین فسفاتاز و الکترولیت های موجود در پلاسمای جنس‌های نر و ماده لای ماهی (*Tinca tinca*) اختلافاتی را در دوران قبل و بعد از تخمریزی گزارش کردند (۴۵).

در مطالعه حاضر، از ماهی قرمز که در دنیا به‌عنوان یک مدل مناسب در مطالعات تولیدمثلی و سیستم غدد درون‌ریز شناخته شده است، استفاده شد. این ماهی علاوه بر نگهداری و دسترسی آسان به مولدها، توانایی بلوغ و تولید مثل در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی، به دلیل پیچیدگی تشخیص دقیق مرحله رسیدگی جنسی وغیرهمزمانی تخمدان گونه هدف قرار گرفت (۲۲ و ۳۰).

مطالعه حاضر، به اندازه‌گیری سطوح پروتئین، کلسیم، آلکالین فسفاتاز قلیایی، کلسترول و تری‌گلیسرید در موکوس پوست ماهی و مقایسه سطوح ذکر شده در موکوس با غلظت‌های موجود در پلاسما می‌پردازد. هدف نهایی، بررسی تفکیک مراحل رسیدگی جنسی با استفاده از پارامترهای ذکر شده در موکوس پوست ماهی و مقایسه کارآمدی این روش با روش اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی پلاسمای خون و روش بافت‌شناسی است.

مواد و روشها

شرایط آزمایش و نمونه‌برداری: نمونه‌گیری از ماهی قرمز طی فصول زمستان (وزن ۵/۶۵ ± ۵۳/۰۴ گرم و طول کل ۰/۵۷ ± ۱۴/۵۷ سانتی‌متر) و بهار (وزن ۱۶/۰۱ ± ۸۷/۶۰ گرم و طول کل ۱/۱۳ ± ۱۶/۰۵ سانتی‌متر) صورت گرفت. در مجموع هشتاد و دو قطعه ماهی قرمز ۲ ساله پرورشی در مزرعه خصوصی (چوبه، رشت، گیلان) مورد بررسی ظاهری قرار گرفتند، غذادهی یک روز قبل از نمونه‌گیری متوقف و نمونه‌گیری‌ها صبح انجام شدند. درجه حرارت آب (۹/۹ درجه سانتی گراد) و دوره نوری (۱۱ ساعت روشنایی :۱۳ ساعت تاریکی) در زمستان و همچنین درجه حرارت آب (۱۳/۳ درجه سانتی گراد) و دوره نوری (۱۳ ساعت روشنایی: ۱۱ ساعت تاریکی) در بهار ثبت شدند. نمونه‌برداری از ماهیان پس از بیهوشی با پودر میخک انجام گرفت (۳۴). طبق دستورالعمل اخلاقی برخورد با موجودات آزمایشگاهی ارائه شده توسط متکاف و کریگ با کمی اصلاحات، ماهیان در دو مرحله نیمه-بیهوشی و بیهوشی تا مرگ کامل، نمونه‌گیری شدند (۲۷). برای جلوگیری از تاثیر ماده بیهوشی بر بدن ماهیان و همچنین امکان خونگیری آسان، قبل از نمونه‌گیری، ماهیان در آب یخ (نیمه-بیهوشی) نگهداری شدند و نمونه‌برداری از گناد نیز پس از بیهوشی کامل (۱۰۰ ppm) و مرگ انجام شد.

جمع‌آوری پلاسما و موکوس: خونگیری از نمونه‌ها توسط سرنگ هپارینه ۲ میلی لیتر از طریق باله دمی انجام شد. لوله‌های مربوطه به آزمایشگاه انتقال داده شدند و پس از سانتریفیوژ (۱۵۰۰ × g به مدت ۲۰ دقیقه) نمونه‌های پلاسما جداسازی و در ویال‌های کدگذاری شده در دمای ۶۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آنالیزهای مدنظر ذخیره شدند (۴۲).

نمونه‌گیری از موکوس، بدون بیهوشی کامل و به-صورت جداگانه در هر ماهی با استفاده از سرنگ ۲ میلی لیتر (بدون سوزن) انجام شد. موکوس عمدتا از نزدیکی باله‌های پشتی، سینه‌ای و شکمی جمع آوری، با نوک سرنگ به آرامی به‌درون سر سوزن کشیده و برداشته شد، بلافاصله در تیوب‌های ۱۰ میلی لیتر کدبندی شده ریخته شده و در جعبه حاوی یخ خشک ذخیره و پس از انتقال به آزمایشگاه مرکزی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار (۱۵۰۰ × g به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد) مایع رویی شیری‌رنگ جداسازی شده و در ویال‌های مخصوص کدگذاری شده، سپس در دمای ۶۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری فاکتورهای مدنظر نگهداری شدند (۴۳).

بافت‌شناسی گناد: پس از نمونه‌برداری موکوس و خون، ماهیان کاملا بیهوش شدند و شکم ماهی به وسیله تیغ و قیچی شکافته شده و جداسازی گنادها از بدن با استفاده از پنس صورت گرفت. شاخص گنادوسوماتیک (GSI) با استفاده از فرمول (وزن گناد/ وزن بدن) ×۱۰۰ مشخص شد (۱۹). در هر نمونه‌برداری، گنادهای ماده به صورت تفکیک

شده کدگذاری شدند و به مدت ۷۲ ساعت در محلول بوئن (۷۵ میلی لیتر محلول اسید پیکریک اشباع، ۲۵ میلی لیتر فرمالدئید ۳۷٪ و ۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال) نگهداری و فیکس شدند. سپس در اتانول ۷۰٪ ذخیره و در آزمایشگاه بافت‌شناسی علوم پزشکی دانشگاه نامور (بلژیک) مورد بررسی قرار گرفتند. بافت تخمدان پس از طی مراحل آبگیری، قالب‌گیری با پارافین و برش ۶ میکرومتری بلوک های بافتی به‌وسیله دستگاه میکروتوم (RM 2245 microtome, Leica, Germany) ، با دو روش هماتوکسیلین ائوزین (H & E) و تری کروم سبز، رنگ آمیزی شدند. مراحل رسیدگی جنسی بااستفاده از آنالیز هیستومورفومتریک (۷، ۹ و ۳۴)، اندازه اووسیت‌ها و درصد نسبی اووسیت‌ها با شمارش ۲۰۰ اووسیت در هر نمونه تخمدان ماهی (Fluorescence Microscope, BX63-OLYMPUS, Tokyo, Japan) ثبت شدند.

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمی: میزان پروتئین محلول با استفاده از روش کلرومتریک و بر اساس جذب نوری و دستورالعمل کیت مخصوص (پارس آزمون، کرج، ایران)، در طول موج ۵۴۶ نانومتر مشخص شد (۱۲). میزان کلسیم با استفاده از روش فوتومتریک اندازه گیری شد (۵). براساس این روش یک ترکیب بنفش رنگ در-معرض کرسولفالتین- کروم تشکیل می‌شود. مقدار جذب نوری استاندارد و نمونه‌ها در طیف نوری ۵۷۰ نانومتر طبق دستورالعمل کیت پارس آزمون (کرج، ایران) قرائت و محاسبه شد.

سطح کلسترول و تری‌گلیسرید با روش آنزیمی تعیین شد و جذب نوری در طول موج ۵۰۰ نانومتر بررسی شد (۳۵). اندازه گیری سطح آنزیم ALP با استفاده از روش جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر صورت گرفت (۱۷). اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی ذکر شده در این مطالعه موکوس و پلاسما بر اساس دستورالعمل کیت‌های مخصوص (پارس آزمون، کرج، ایران) و دستگاه اسپکتروفتومتر(Unico, New Jersey, USA) انجام شدند (۲۰، ۳۵ و ۳۷).

تجزیه و تحلیل آماری: در تجزیه و تحلیل آنالیزهای آماری پس از بررسی همگنی واریانس‌ها و نرمال بودن داده‌ها، تفاوت میانگین داده‌های به دست آمده از طریق آزمون آنالیز واریانس یکطرفه One-Way-ANOVA و تست دانکن در سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌های موکوس و پلاسما با استفاده از آنالیز t-test مستقل انجام شد. تعیین رابطه فاکتورهای اندازه‌گیری شده از طریق آزمون همبستگی پیرسون در سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ و $P < ۰/۰۱$ صورت گرفت. تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۵ (SPSS Inc., IBM, USA) انجام شدند.

نتایج

در مطالعه حاضر، بافت شناسی تخمدان ماهیان قرمز ۲ ساله نشان داد که اووگونیا، اووسیت‌های اولیه، اووسیت-های کورتیکال آلوئولی، اووسیت‌های در مراحل زرده‌سازی و تخمریزی در طی ۵ ماه قابل مشاهده است. مراحل رسیدگی جنسی با استفاده از درصد نسبی اووسیت‌ها (جدول ۱) (شکل ۱) طبقه‌بندی شدند. نمونه‌های تخمدانی در مراحل اولیه (I) و کورتیکال آلوئولی (II)، در زمستان و تخمدان‌های مراحل زرده‌سازی اولیه (III)، نهایی (IV) و همچنین در حال تخمریزی (V) در طی نمونه-گیری‌های بهاری یافت شدند و GSI (شکل ۲) نیز محاسبه شد.

شکل ۳ (الف) سطح پروتئین محلول موکوس و پلاسما را در مراحل مختلف رسیدگی جنسی ماده‌ها در ماهی قرمز نشان می‌دهد. به طور کلی، سطح پارامترهای بیوشیمیایی در پلاسمای خون نسبت به موکوس پوست بیشتر بود. سطح پروتئین پلاسما و موکوس در مرحله زرده‌سازی

نهایی به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). ولی بااین‌حال، نتایج نشان داد که میزان پروتئین در پلاسما و موکوس بین گروه‌های زرده‌سازی و همچنین گروه رشد اولیه دارای تفاوت معنی‌داری است ($P < ۰/۰۵$).

میزان کلسیم پلاسما در انتهای زرده‌سازی افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۳–ب). اگرچه در سطح کلسیم موکوس مراحل زرده‌سازی و دیگر مراحل مختلف توسعه تخمدان تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$) اما سطح کلسیم موکوس نسبت به کلسیم پلاسما در تمام مراحل به جز تخمریزی به صورت معنی‌داری کاهش نشان داد ($P < ۰/۰۵$).

شکل ۳ سطوح چربی‌ها، کلسترول (ج) و تری‌گلیسرید (د) را در طول دوره تولیدمثلی نشان می‌دهد. سطح کلسترول پلاسما در زمان زرده‌سازی افزایش قابل توجهی داشت ($P < ۰/۰۵$) و در مرحله تخمریزی رو به کاهش بود. میزان کلسترول موکوس در انتهای زرده‌سازی به صورت معنی‌دار افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$) و در مرحله تخمریزی نیز همچنان ثابت ماند. میزان تری‌گلیسرید پلاسما و موکوس در طی رشد اولیه کم بوده و در طی کورتیکال آلوئولی، زرده‌سازی اولیه و نهایی نیز ثابت باقی ماند. در مطالعه حاضر، سطوح لیپید پلاسما در مراحل مختلف به طور معنی‌داری بیشتر از موکوس بود ($P < ۰/۰۵$) که در اندازه‌گیری‌های تری‌گلیسرید، مرحله تخمریزی از این قاعده مستثنی بود.

در شکل ۳ (ه) نتایج نشان داد که سطح آنزیم ALP در ماهی قرمز طی مراحل رسیدگی جنسی در موکوس بالاتر از پلاسما است. بااین‌حال سطوح ALP موکوس و پلاسما هیچ گونه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، به جز در مرحله تخمریزی که سطح ALP پلاسما به صورت معنی‌داری از موکوس بالاتر بود ($P < ۰/۰۵$). سطح این آنزیم در پلاسما طی مراحل زرده‌سازی و تخمریزی ثابت باقی ماند و در موکوس با ورود به مرحله تخمریزی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد.

جدول ۲ تجزیه و تحلیل همبستگی بین GSI و پارامترهای بیوشیمیایی موکوس و پلاسما را در طول کل دوره رسیدگی جنسی ارائه می‌دهد. GSI همبستگی مثبت و معنی‌داری با میزان پروتئین محلول در هر دو بافت موکوس پوست و پلاسمای خون ماهی قرمز و همچنین با کلسیم در واحد پلاسما ($P < ۰/۰۱$) دارد. ارتباط GSI با لیپیدها، کلسترول و تری‌گلیسرید، در موکوس پوست منفی بود ($P < ۰/۰۵$).

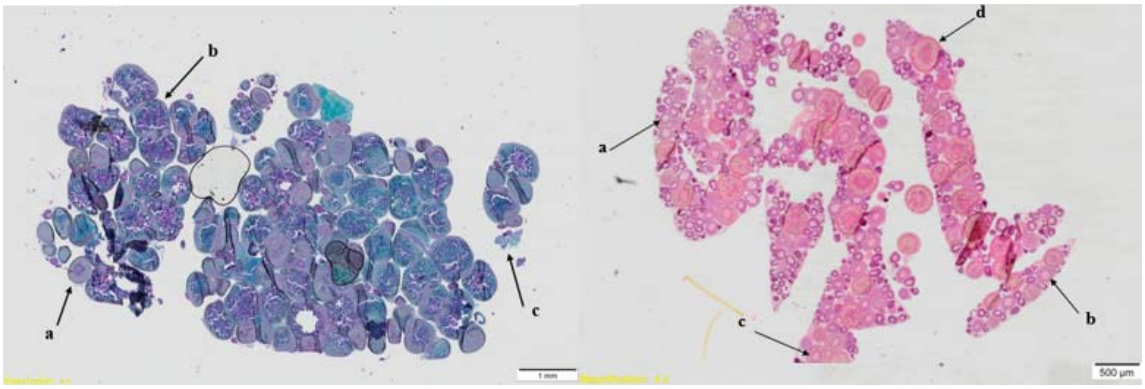
جدول ۱– طبقه‌بندی پنج مرحله ای رسیدگی جنسی در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) ماده بر اساس درصد نسبی اووسیت‌های تخمدان. تعداد ماهیان ماده در نمونه‌گیری عبارتند از: مرحله رشد اولیه (I) (n=۷) ، کورتیکال آلوئولی (II) (n=۹)، ویتلوژنزیز اولیه (III) (n=۹)، ویتلوژنزیز نهایی (IV) (n=۱۰)، شروع تخمریزی(n=۶) (V).

مراحل رسیدگی جنسی	درصد نسبی اووسیت ها					
	اووگونیا	پری نوکلئوس	کورتیکال آلوئولی	زرده‌سازی اولیه	زرده‌سازی نهایی	اووسیت ریخته شده
اووسیت اولیه (I)	۳۸/۴۷±۱۰/۸۲	۴۴/۴۰±۱۳/۶۰	۱۷/۱۱±۱۱/۷۸	–	–	–
کورتیکال آلوئولی (II)	۴۲/۹۰±۷/۱۱	۲۱/۰۸±۵/۷۲	۳۶/۴۰±۴/۶۲	–	–	–
زرده‌سازی اولیه (III)	–	۱۰/۶۹±۵/۲۴	۲۲/۸۲±۷/۷۸	۶۰/۶۸±۶/۸۱	۸/۰۷±۰/۰۸	–
زرده‌سازی نهایی (IV)	–	–	۷/۰۵±۲/۹۰	۲۷/۵۰±۶/۳۴	۶۵/۴۴±۲/۲۳	–
تخمریزی (V)	–	–	۱۹/۰۹±۰/۲	۲۰/۰۱±۰/۴	۲۲/۰۳±۰/۳	۳۹/۲۰±۰/۱

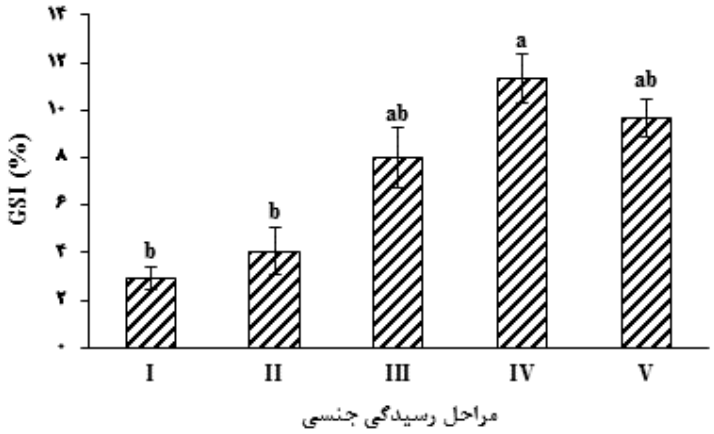
جدول ۲- رابطه همبستگی پیرسون بین شاخص گنادوسوماتیک (GSI) و فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسما و موکوس ماهی قرمز (*Carassius auratus*) در یک دوره تولیدمثلی (n = ۱۵) [رشد اولیه اووسیت‌ها (n=۳)، کورتیکال آلوئولی(n=۳)، زرده‌سازی اولیه (n=۳)، زرده‌سازی نهایی(n=۳) و شروع تخمریزی(n=۳)]

	تری گلیسرید (پلاسما)	کلسترول (پلاسما)	کلسیم (پلاسما)	پروتئین (پلاسما)	ALP (پلاسما)
GSI	-۰/۴۰۷	-۰/۴۹۷	**۰/۶۸۷	**۰/۸۲۳	-۰/۱۸۴

	تری گلیسرید (موکوس)	کلسترول (موکوس)	کلسیم (موکوس)	پروتئین (موکوس)	ALP (موکوس)
GSI	*-۰/۵۹۴	*-۰/۵۹۶	۰/۴۵۸	**۰/۸۰۶	*-۰/۶۸۸



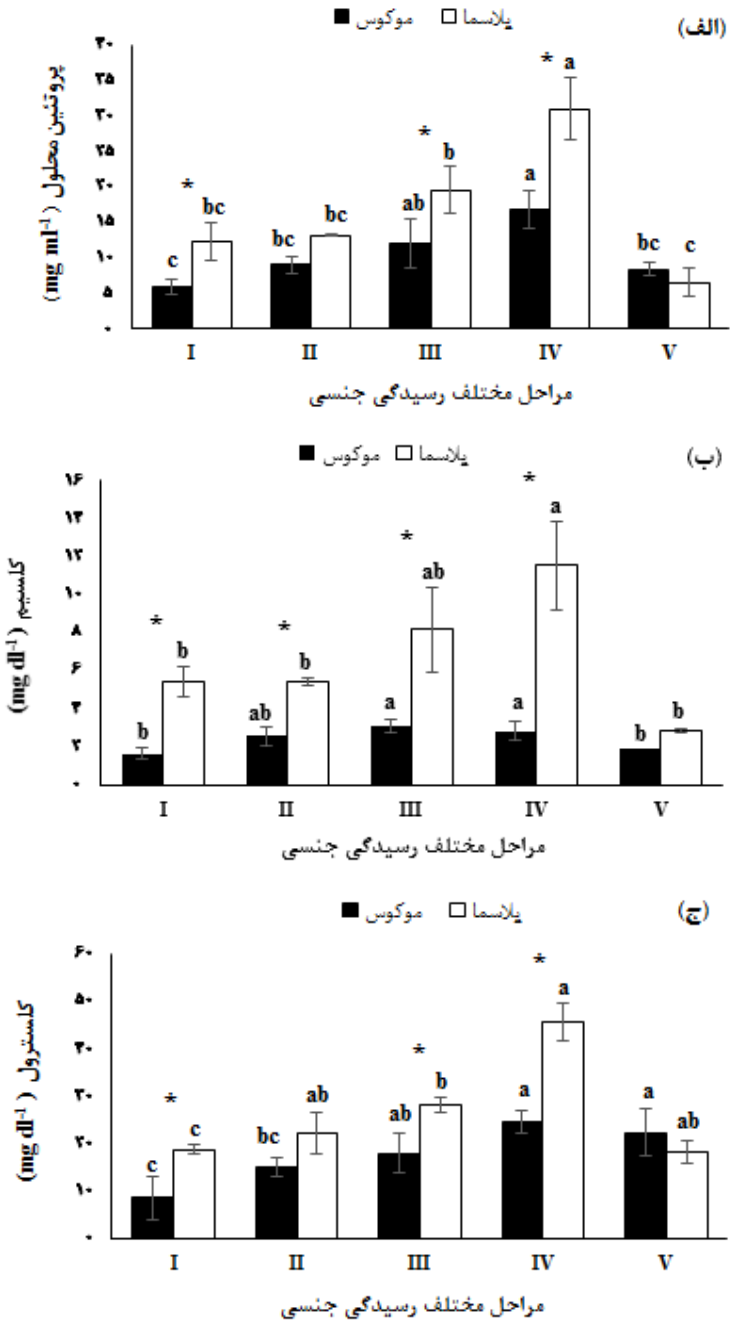
شکل ۱- بخشی از تخمدان‌های (نوع تخمدان: غیرهمزمان) ماهی قرمز (*Carassius auratus*) ۲ ساله. شکل سمت راست: رنگ آمیزی H & E و بزرگنمایی ۵۰۰ میکرومتر، دارای اووگونیا (a)، اووسیت پری نوکلئوس (b)، اووسیت کورتیکال آلوئولی (c) و اووسیت زرده‌سازی اولیه (b). شکل سمت چپ: رنگ آمیزی تری کروم سبز و بزرگنمایی ۱ میلی‌متر، دارای اووسیت زرده‌سازی اولیه (a)، اووسیت زرده‌سازی نهایی یا رسیده (b) و قسمتی از اووسیت ریخته شده (c).

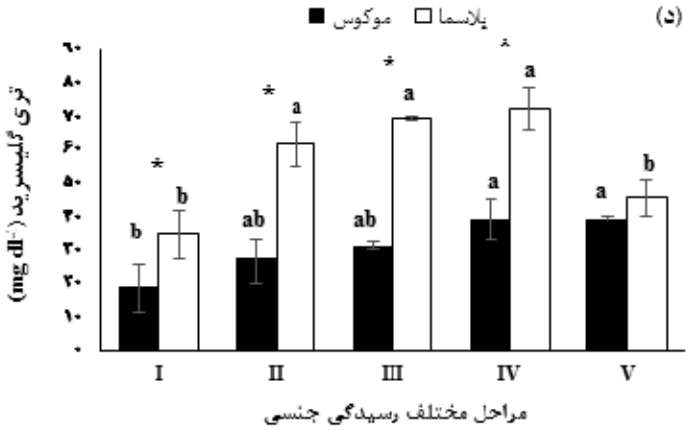


شکل ۲- شاخص گنادوسوماتیک (GSI) در طی مراحل مختلف رسیدگی جنسی ماهی قرمز (*Carassius auratus*) ۲ ساله. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است.

بحث و نتیجه گیری

تا امروز تلاش‌های کمی برای مطالعه موکوس ترشحی از پوست به‌عنوان منبع مهم منعکس کننده کارایی سیستم داخلی، به‌ویژه محور تولیدمثل صورت گرفته است. هدف اصلی این پژوهش، تعیین چرخه تولیدمثل و بلوغ گناد بااستفاده از فاکتورهای بیوشیمیایی موکوس به‌عنوان ابزار مناسب، سریع و کم‌تهاجمی است.





شکل ۳- مقایسه میزان پروتئین محلول (الف)، کلسیم (ب)، کلسترول (ج)، تری‌گلیسرید (د) و آلکالین فسفاتاز قلیایی (ه) طی مراحل مختلف رسیدگی جنسی در پلاسما و موکوس ماهی قرمز (*Carassius auratus*). حروف متفاوت انگلیسی نشان دهنده اختلاف معنی دار است. اختلاف معنی دار بین پلاسما و موکوس در هر مرحله به صورت جداگانه با علامت ستاره مشخص شده است.

در این مطالعه، میزان پروتئین محلول سطح موکوس در طول زرده‌سازی افزایش یافت که شاخص مناسبی برای متمایز نمودن این مرحله از رسیدگی جنسی در ماده‌ها تلقی می‌شود. میزان پروتئین پلاسما، مشابه با موکوس در مرحله زرده‌سازی افزایش و در تخمریزی کاهش یافت. در واقع، E_2 به عنوان یک استروئید جنسی مهم در جنس ماده به‌عنوان محرک تولید ترکیب ویتلوژنین بوده و می‌تواند سطوح پروتئین را در پروسه زرده‌سازی بوسیله افزایش بازتولید پروتئین در کبد افزایش دهد (۱۰، ۲۲ و ۴۸). همچنین مشابه با نتایج این آزمایش، اسووبودا و همکاران افزایش سطح پروتئین کل خون لای ماهی را در زمان قبل از تخمریزی و بلافاصله در مرحله تولیدمثل مورد بررسی قرار دادند که نتایج مشابه دریافت شد (۴۵). فیزیولوژی تولیدمثل ماهی با استفاده از روند تکاملی گناد به راحتی قابل بررسی است. با استفاده از GSI می‌توان وضعیت تولیدمثلی ماهی و زمان تخمریزی را مشخص نمود (۱ و ۲۸). اکاگاوا و همکاران با بررسی هورمون‌های خون و شاخص‌های توسعه تخمدان ماهی قرمز، مشابه با نتایج این تحقیق، بیان کردند که GSI قبل از تخمریزی سریعا افزایش و پس از تخمریزی کاهش می‌یابد (۲۱). در این تحقیق، نتایج ارتباط بین GSI، به عنوان یکی از فاکتورهای مهم وضعیت رشد تخمدان با پروتئین پلاسما و موکوس مثبت بوده و می‌تواند نشان دهنده تاثیر توسعه گنادی بر ترشحات موکوس باشد. همبستگی توسعه تخمدان با غلظت ویتلوژنین پلاسما، پروتئین کل و کلسیم در بسیاری از مطالعات اثبات شده است (۴، ۱۵، ۲۴ و ۴۵). اگرچه در این مطالعه، ارتباط بین GSI و کلسیم فقط در پلاسما مثبت نشان داده شد.

به طور کلی، کلسیم یکی از ابزارهای مهم برای شناسایی شرایط بلوغ ماهی است که با توسعه گناد افزایش می‌یابد (۴، ۲۴ و ۳۳). نتایج این تحقیق با مقایسه کلسیم در مراحل مختلف رسیدگی تخمدان نشان داد که سطح کلسیم پلاسما در سطح زیاد و قابل توجهی طی مراحل شروع تا انتهای زرده‌سازی قرار دارد. اگرچه سطح کلسیم پلاسما به صورت معنی‌دار بیشتر از موکوس بود اما کارایی استفاده از اندازه‌گیری کلسیم موکوس در تمایز مراحل رسیدگی جنسی قابل تایید بود. در راستای این نتایج، لینارس-کازناو و همکاران تأیید کرده‌اند که بین ویتلوژنین پلاسما و کلسیم در مرحله پیش زرده‌سازی همبستگی وجود دارد (۲۴). این نتیجه‌گیری با مطالعه حاضر مشابه بوده و می‌تواند قدم

مناسبی برای اثبات مراحل رسیدگی جنسی (به خصوص در تفکیک مراحل پیش زرده‌سازی و زرده‌سازی) توسط اندازه‌گیری میزان کلسیم باشد. عدم همبستگی توسعه تخمدان و کلسیم موکوس را می‌توان به عملکرد فیزیولوژی تولیدمثل ماهی قرمز، نوع تخمدان و غیرهمزمان بودن اووسیت‌ها نسبت داد. همچنین یاسمی و همکاران، با اندازه‌گیری کلسیم خون ماهی کپور نقره ای *Hypophthalmichthys molitrix* گزارش کردند که در مراحل مختف و همزمان با پیشرفت رسیدگی جنسی این پارامتر افزایش می یابد (۳). فلاحتکار و پورحسین سارمه، تفاوت معنی‌داری در میزان کلسیم پلاسمای ماهی سوف *Sander lucioperca* در زمان پس از تخمریزی با قبل از آن مشاهده نکردند. اگرچه به صورت کلی، میزان کلسیم در مولدهای نر و ماده پس از تخمریزی روند صعودی داشت. آن‌ها تغییرات مولدهای ماده را حاکی از تغییرات سطوح ویتلوژنین در گردش خون معرفی کردند (۲).

ویتلوژنین ماهی قرمز شامل فسفولیپیدها (۱۹) و پروتئین-های زرده شامل لیپوویتلین‌ها و فوسفویتین‌ها (۴۶) می‌باشد که می‌تواند منجر به افزایش سطح فسفولیپید در مراحل ویتلوژنین شود. همچنین این امکان وجود دارد که ماهی لیپوپروتئین‌ها را برای گردش کلسترول و تری‌اسیل-گلیسرول نیاز داشته باشد (۲۳ و ۴۰). علاوه بر این پارامترهای محیطی می‌توانند بر خروجی‌های تولیدمثل ازجمله استروئیدهای جنسی پلاسما که در میزان سطوح لیپوپروتئین دخیل هستند، تاثیر بگذارند (۳۱ و ۳۹). تری-گلیسرید پلاسما در مراحل ابتدایی رشد و تخمریزی مولدها کاهش یافته که مشابه با یافته‌های کوکامن و همکاران مبنی بر نوسان تری‌گلیسرید در قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* طی بلوغ و تخمک‌گذاری است (۲۳). رابطه‌ای بین سطوح چربی پلاسما در جنس نر و ماده ، تغییرات محیطی (۱۱) و همچنین وضعیت تولیدمثل وجود دارد (۴۵ و ۴۷). درواقع، چربی‌ها انرژی لازم را بوسیله متابولیک در طول زمان زرده‌سازی تامین می‌کنند (۴ و ۲۳). در مطالعه حاضر، تری‌گلیسرید موکوس در ماهی قرمز شاخص مناسب‌تری در طی مراحل تولید-مثلی قبل از تخمریزی برای میزان اعتبار حضور زیاد چربی بود. این فرضیه وجود دارد که نه تنها ویتلوژنین منبع مهم تامین چربی اووسیت‌هاست، بلکه لیپوپروتئین‌ها نیز ممکن است در انتقال چربی به تخمدان دخیل باشند (۴).

افزایش ALP پلاسما ماهی قرمز به عنوان آنزیم فعال در مراحل زرده‌سازی مشاهده شده است و فرض بر این است که تجزیه و تحلیل ALP یک معیار مناسب جهت اندازه-گیری غیرمستقیم عملکرد ویتلوژنین می باشد (۴ و ۳۳). در مطالعه حاضر، موکوس پوست نتایج متفاوت و جالبی را ارائه داد، به‌این‌صورت که میزان این آنزیم در طول تخمریزی در سطح بالایی باقی ماند. مشابه با نتایج این تحقیق، ALP پلاسما به طور معنی‌داری در مولدین ماهی آزاد اقیانوس اطلس *Salmo salar* و لای ماهی *Tinca tinca* در طی زرده‌سازی به طور قابل توجهی افزایش یافته است (۱۸ و ۴۵). این موضوع نقش حیاتی سیستم آنزیمی را به‌عنوان منبع ذخیره‌سازی فسفات برای سنتز کبدی ویتلوژنین نشان می‌دهد (۵ و ۳۲). نکته قابل ملاحظه در این مطالعه، افزایش بیشتر فعالیت APL موکوس نسبت به پلاسما در طی مراحل رسیدگی جنسی قبل از تخمریزی بود و درنتیجه تفکیک مرحله زرده‌سازی و تخمریزی را به‌خوبی نشان داد. در ماهی کپور نقره ای نیز میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز خون در جنس نر و ماده در تمامی مراحل رسیدگی جنسی تفاوت داشت (۳). علاوه بر ALP، اندازه-گیری سطح کلسیم موکوس می‌تواند در تمایز ماهیان بالغ (مراحل زرده سازی) و ماهیان مرحله اولیه رشد اووسیت‌ها مورد استفاده قرار بگیرد. اندازه‌گیری پروتئین کل در موکوس برای تفکیک مرحله انتهایی زرده‌سازی و مراحل پایین‌تر و همچنین تخمریزی قابل استناد می‌باشد. استفاده از کلسترول و تری‌گلیسرید نیز، تنها در تشخیص مراحل انتهایی زرده‌سازی و رشد اولیه اووسیت‌ها قابل بررسی است.

نتایج حاصل از مطالعه کنونی بیانگر امکان استفاده از موکوس سطحی پوست برای شناسایی مراحل مختلف رسیدگی جنسی در ماهی قرمز ماده است. دیدگاه مثبت این تحقیق، کارایی موکوس پوست در چرخه تولیدمثلی به عنوان یک روش کم‌تهاجمی است. این تحقیق اولین بررسی روی فاکتورهای بیوشیمیایی موکوس ماهی است و نیازمند تحقیقات بیشتری در سایر گونه‌ها به‌خصوص گونه‌های بومی و با ارزش که نیازمند به دانستن چرخه تولیدمثلی و بازسازی ذخایر مولدین هستند، می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پژوهشکده دریای خزر که نقش اصلی در تامین بودجه این پژوهش را برعهده داشتند، کمال تشکر و قدردانی را داریم. از زحمات آقای مهندس سلیمی مدیر "مزارع پرورش گلدفیش، چوبه"، آقای دکتر عبدالعلی راهداری و خانم ها مهندس سکینه ابراهیمی، نغمه جعفری و راضیه نظری طی نمونه‌گیری و همچنین همکاری آقای مهندس زمانی مسئول آزمایشگاه شیلات (دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان) قدردانی می‌گردد. از زحمات بی-دریغ آقای دکتر Benoit Balau در "آزمایشگاه هیستولوژی دانشکده پزشکی نامور بلژیک" نیز درراستای آموزش روش‌ها و استفاده از دستگاه‌ها قدردانی می گردد.

منابع

۱. حسینی ع، ستوده ا، موسوی ز، محمدی م و عباس زاده ا. ۱۳۹۶. زیست شناسی تولیدمثل سیاه‌ماهی (*Capoeta capoeta intermedia*) درررودخانه شاپور (استان بوشهر). مجله پژوهشهای جانوری (مجله زیست شناسی ایران). ۳۰ (۱)، ۵۱-۵۹.

۲. فلاحتکار ب و پورحسین سارمه، س. تغییرات بیوشیمیایی، استروئیدهای جنسی و پارامترهای هماتولوژیک در قبل و پس از تخمریزی ماهی سوف سفید *Sander licioperca*. مجله پژوهشهای جانوری (مجله زیست شناسی ایران). ۲۶(۳)، ۳۴۳-۳۳۳.

۳. یاسمی م، رفیع پرهیزکار ح، تیزکار ب و یوسفی جوردهی ا. ۱۳۹۵. تغییرات سطوح هورمون های استروئید جنسی، یون کلسیم و آنزیم آلکالین فسفاتاز طی مراحل مختلف رسیدگی جنسی در مولدین کپور نقره ای *Hypophthalmichthys molitrix*. مجله پژوهشهای جانوری (مجله زیست شناسی ایران). ۲۹(۴)، ۵۰۳-۵۱۴.

4. Akhavan, S.R., Salati, A.P., Falahatkar, B., and Jalali, S.A.H., 2016. Changes of vitellogenin and lipase in captive Sterlet sturgeon *Acipenser ruthenus* females during previtellogenesis to early etresia. Fish Physiology and Biochemistry, 42 PP: 967-978.

5. Baginski, E.S., Marie, S.S., Clark, W.L., and Zak, B., 1973. Direct micro determination of serum calcium. Clinica Chimica Acta, 46 PP: 46-54.

6. Barkowski, N.A., and Haukenes, A.H., 2014. Investigating the utility of measuring 11α-ketotestosterone and vitellogenin in surface mucus as an alternative to plasma samples in assessments of the reproductive axis of white bass. North American Journal of Aquaculture, 76 PP: 112-118.

7. Blazer, V.S., 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. Fish Physiology and Biochemistry, 26 PP: 85-101.

8. Chu-Koo, F., Dugué, R., Aguilar, M.A., Daza, A.C., Bocanegra, F.A., Veintemilla, C.C., Duponchelle, F., Renno, J.F., Tello, S., and Nunez, J., 2009. Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17β-estradiol, and 11-ketotestosterone levels. Fish Physiology and Biochemistry, 35 PP: 125-136.

9. Crime, L.W., and Glebe, B. D., 1990. Reproduction (in: Methods for fish biology edit, Schreck & Moyle), American Fisheries Society Publication, PP: 529-553.

10. Dahle, R., Taranger, G.L., Karlsen, Ø., Kjesbu, O.S., and Norberg, B., 2003. Gonadal development and associated changes in liver size and sexual steroids during the reproductive cycle of captive male and female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 136 PP: 641-653.

11. De Pedro, N., Guijarro, A.I., López-Patiño,

M.A., Martínez-Álvarez, R., and Delgado, M.J., 2005. Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. Aquaculture Research, 36 PP: 1185-1196.

12. Doumas, B.T., Bayse, D.D., Carter, R.J., Peters, T., and Schaffer, R., 1981. A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. Clinical Chemistry, 27 PP: 1642-1650.

13. Dzul-Caamal, R., Salazar-Coria, L., Olivares-Rubio, H.F., Rocha-Gómez, M.A., Girón-Pérez, M.I., and Vega-López, A., 2016. Oxidative stress response in the skin mucus layer of *Goodea gracilis* (Hubbs and Turner, 1939) exposed to crude oil: A non-invasive approach. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 200 PP: 9-20.

14. Falahatkar, B., Akhavan, S.R., Tolouei Gilani, M.H., and Abbasalizadeh, A., 2013. Sex identification and sexual maturity stages in farmed great sturgeon, *Huso huso* L. through biopsy. Iranian Journal of Veterinary Research. 14(2): 133-139.

15. Falahatkar, B., Poursaeid, S., Meknatkhah, B., Khara, H., and Efatpanah, I., 2014. Long-term effects of intraperitoneal injection of estradiol-17β on the growth and physiology of juvenile stellate sturgeon *Acipenser stellatus*. Fish Physiology and Biochemistry, 40 PP: 365-373.

16. Fast, M.D., Sims, D.E., Burka, J.F., Mustafa, A., and Ross, N.W., 2002. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 132 PP: 645-657.

17. Fischbach, F., and Zawta, B., 1992. Age-dependent reference limits of several enzymes in plasma at different measuring temperatures. Klin Lab, 38 PP: 555-61.

18. Johnston, C.E., Horney, B.S., Deluca, S., MacKenzie, A., Eales, J.G., and Angus, R., 1994. Changes in alkaline phosphatase isoenzyme activity in tissues and plasma of Atlantic salmon (*Salmo salar*) before and during smoltification and gonadal maturation. Fish Physiology and Biochemistry, 12 PP: 485-497.

19. Hori, S.H., Kodama, T., and Tanahashi, K., 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. General and Comparative Endocrinology, 37 PP: 306-320.

20. Hrubec, T.C., and Smith, S.A., 1999. Differences between plasma and serum samples for the evaluation of blood chemistry values in rainbow trout, channel catfish, hybrid tilapias, and hybrid striped bass. Journal of Aquatic Animal Health, 11 PP: 116-122.

21. Kagawa, H., Young, G., and Nagahama, Y., 1984. In vitro estradiol-17β and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carassius auratus*. General and Comparative Endocrinology, 54 PP: 139-143.

22. Kobayashi, M., Sohn, Y.C., Yoshiura, Y., and Aida, K., 2000. Effects of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin subunits in juvenile and ovariectomized goldfish *Carassius auratus*. Fisheries Science, 66 PP: 223-231.

23. Kocaman, E.M., Yanik, T., Erdogan, O., and Ciltas, A.K., 2005. Alterations in cholesterol, glucose and triglyceride levels in reproduction of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Animal and Veterinary Advances, 4 PP: 801-804.

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

25. Loke-Smith, K.A., Sundberg, M.A., Young, K.A., and Lowe, C.G., 2010. Use of morphology and endocrinology to predict sex in California sheephead: evidence of altered timing of sex change at Santa Catalina Island, California. Transactions of the American Fisheries Society, 139 PP: 1742-1750.

26. Maltais, D., and Roy, R.L., 2009. Purification and partial characterization of vitellogenin from shorthead redhorse (*Moxostoma macrolepidotum*) and copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*) and detection in plasma and mucus with a heterologous antibody. Fish Physiology and Biochemistry, 35 PP: 241-254.

27. Metcalfe, J.D., and Craig, J.F., 2011. Ethical justification for the use and treatment of fishes in research: an update. Journal of Fish Biology, 78 PP: 393-394.

28. Migaud, H., Fontaine, P., Sulistyo, I., Kestemont, P., and Gardeur, J.N., 2002. Induction of out-of-season spawning in Eurasian perch *Perca fluviatilis*: effects of rates of cooling and cooling durations on female gametogenesis and spawning. Aquaculture, 205 PP: 253-267.

29. Moncaut, N., Nostro, F.L., and Maggese, M.C., 2003. Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17β. Effects on liver and gonads. Aquatic Toxicology, 63 PP: 127-137.

30. Nelson, E.R., Allan, E.R., Pang, F.Y., and Habibi, H.R., 2010. Thyroid hormone and reproduction: regulation of estrogen receptors in goldfish gonads. Molecular Reproduction and Development, 77 PP: 784-794.

31. Orlando, E.F., Binczik, G.A., Denslow, N.D., and Guillette Jr, L.J., 2007. Reproductive seasonality of the female Florida gar, *Lepisosteus platyrhincus*. General and Comparative Endocrinology, 151 PP: 318-324.

32. Popesku, J.T., Martyniuk, C.J., Mennigen, J., Xiong, H., Zhang, D., Xia, X., Cossins, A.R., and Trudeau, V.L., 2008. The goldfish (*Carassius auratus*) as a model for neuroendocrine signaling. Molecular and Cellular Endocrinology, 293 PP: 43-56.

33. Pottinger, T.G., Pulman, K.G.T., Carrick, T.R., and Scott, A.P., 2005. Evaluation of biochemical methods for the non-destructive identification of sex in upstream migrating salmon and sea trout. Journal of Fish Biology, 67 PP: 1514-1533.

34. Potki, N., Falahatkar, B. and Alizadeh, A., 2018. Growth, hematological and biochemical indices of common carp *Cyprinus carpio* fed diets containing corn gluten meal. Aquaculture International, 26 PP:1573-1586.

35. Rifai, N., Bachorik, P.S., and Albers, J.J., 1999. Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins. Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company. 809-861.

36. Rinchard, J., and Kestemont, P., 1996. Comparative study of reproductive biology in single-and multiple-spawner cyprinid fish. I. Morphological and histological features. Journal of Fish Biology, 49 PP: 883-894.

37. Roosta, Z., Ghiasi, S., and Falahatkar, B., 2018. Comparative study on hormones and biochemistry indices in plasma, ovarian fluid and oocytes of LHRHa2-induced female Stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*). Aquaculture Research. 10.1111/are.13876

38. Schultz, D.R., Perez, N., Tan, C.K., Mendez, A.J., Capo, T.R., Snodgrass, D., Prince, E.D., and Serafy, J.E., 2005. Concurrent levels of 11-ketotestosterone in fish surface mucus, muscle tissue and blood. Journal of Applied Ichthyology, 21 PP: 394-398.

39. Sharpe, R.L., and MacLatchy, D.L., 2007. Lipid dynamics in goldfish (*Carassius auratus*) during a period of gonadal recrudescence: effects of β-sitosterol and 17β-estradiol exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 145 PP: 507-517.

40. Shepherd, R.H., and Koch, E.A. 1994. Function for fish mucus. Reviews in Fish Biology and Fisheries 4: 401-429.

41. Stahl, M.T., Whitledge, G.W., and Kelly, A.M., 2009. Reproductive biology of middle Mississippi River shovelnose sturgeon: insights from seasonal and age variation in plasma sex steroid and calcium concentrations. Journal of Applied Ichthyology, 25 PP: 75-82.

42. Spanò, L., Tyler, C.R., van Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Thomé, J.P., and Kestemont, P., 2004. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). Aquatic Toxicology, 66 PP: 369-379.

43. Subramanian, S., MacKinnon, S.L., and Ross, N.W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 148 PP: 256-263.

44. Subramanian, S., Ross, N.W., and MacKinnon, S.L., 2008. Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 150 PP: 85-92.

45. Svoboda, M., Kouřil, J., Hamáčková, J., Kalab, P., Savina, L., Svobodova, Z., and Vykusova, B., 2001. Biochemical profile of blood plasma of tench (*Tinca tinca* L.) during pre-and postspawning period. Acta Veterinaria Brno, 70 PP: 259-268.

46. Tyler, C.R., and Sumpter, J.P., 1990. The development of a radioimmunoassay for carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. Fish physiology and Biochemistry, 8 PP: 129-140.

47. Wallaert, C., and Babin, P.J., 1994. Age-related, sex-related, and seasonal changes of plasma lipoprotein concentrations in trout. Journal of Lipid Research, 35 PP: 1619-1633.

48. Webb, M.A., Feist, G.W., Foster, E.P., Schreck, C.B., and Fitzpatrick, M.S., 2002. Potential classification of sex and stage of gonadal maturity of wild white sturgeon using blood

plasma indicators. Transactions of the American Fisheries Society, 131 PP: 132-142.

49. Wiegand, M.D., and Peter, R.E., 1980. Effects of sex steroids on plasma lipids in the goldfish, *Carassius auratus*. Canadian Journal of Zoology, 58 PP: 967-972.

A comparative study on some biochemical and enzymatic parameters of plasma and mucus during reproductive stages in female goldfish (*Carassius auratus*)

Roosta Z.[1], Falahatkar B.[1,2], Sajjadi M.M.[1], Paknejad H.[3] and Kestemont P.[4]

[1] Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, I.R. of Iran

[2] Dept. of Marine Sciences, The Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

[3] Dept. of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. of Iran

[4] Research Unit in Environmental and Evolutionary Biology, Institute of Life, Earth and Environment (ILEE), University of Namur, Namur, Belgium

Abstract

Determination of reproductive status and knowledge in physiological situations of fish is essential to manage brooders. In this study, the efficacy of skin mucosal layer was investigated as the important source of biochemical and also less-invasive method to clarify goldfish reproductive status. In our research, fish sampling was carried out during five months and according to the histological analysis of gonad, the fish were divided into 5 stages: primary growth (I), cortical alveoli (II), early-vitellogenesis (III), late-vitellogenesis (IV) and spawning (V). Total protein, calcium, lipids (cholesterol and triglyceride) and alkaline phosphatase (ALP) levels of mucus and plasma were measured and compared. Protein levels of mucus were significantly increased during late-vitellogenesis ($P < 0.05$). Mucosal calcium levels were lower than plasma. Cholesterol and triglyceride of mucus showed significant enhancing during the late-vitellogenesis ($P < 0.05$). ALP activity was elevated in mucus more than plasma. In histological studies, the analysis of gonadosomatic index showed significant positive correlation between this factor and plasma protein as well as mucus ($P < 0.01$). ALP was the appropriate indicator to distinguishing vitellogenesis and spawning stages. In summary, the results of this study indicated that the biochemical factors in mucus is measurable and be considered as a less-invasive tool and alternative blood for monitoring the endocrine response, reproductive indices, and sexual stages, especially during the vitellogenesis stages.

Key words: Mucus, Calcium, Cholesterol, Maturational status, Goldfish