پیمان روستائیان
سازمان تحقیقات و آموزش شیلات ایران
مرکز تحقیقات شیلاتی نرمتنان خلیج فارس، بندرلنگه

بررسی اثر آدرنالین بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در عصارهٔ گوناد *Crassostrea cucullata*

چکیده

اثر آدرنالین بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در عصارهٔ گوناد C. cucullata در زمانهای مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰ دقیقه) با غلظت های گوناگون آدرنالین (۰، ۰/۰۷۴، ۰/۷۴، ۷/۴، ۷۴ میکروگرم در میلی لیتر) مورد مطالعه قرار گرفت. همبستگی مثبت بسیار بالای معنی داری بین فعالیت آنزیمی و واحد زمان مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$ ،$r > ۰/۹۹۹$) در حالی که همبستگی میان فعالیت آنزیمی (در زمانهای مختلف) و غلظت های مختلف آدرنالین از نقطه نظر آماری معنی دار نمی باشد($p > ۰/۲$ ،$r < ۰/۰۵$).

مقدمه

آنزیم اسید فسفاتاز یکی از آنزیم های هیدرولیزکننده لیزوزیمی سلولهای بوکاریوت می باشد.

(De Robertis & De Robertis, 1981). علی رغم طیف وسیع عملکرد این آنزیم در بافت های سوماتیک جانوران مختلف و همچنین اهمیت این آنزیم در پروسه های

فیزیولوژیکی گونادی (Reddy & Svoboda, 1967; Ianes, 1977; Sidorov et al., 1980; Chemes, 1986) اطلاعات بسیار ناچیزی در رابطه با اثر هورمون‌ها و مواد شیمیایی مختلف بر فعالیت اسید فسفاتاز گونادی در گونه‌های اقتصادی دوکفه‌ایها، موجود است. هدف از انجام این پژوهش به‌عنوان قسمتی از مطالعات اولیه در تکثیر و پرورش صدف‌های خوراکی، مطالعه آدرنالین بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در عصارهٔ گوناد صدف C. cucullata بود. نتایج حاصله می‌تواند به‌عنوان نقطه آغازی در رابطه با اثر هورمون‌ها و مواد شیمیایی در بهبود رشد و افزایش پتانسیل تولیدمثلی در کشت اقتصادی اویستر خوراکی در کشور مطرح گردد.

مواد و روش کار

در حدود ۸۰ عدد صدف C. cucullata به طول ۳ تا ۵ سانتیمتر (قدامی ـ خلفی) و عرض ۴ تا ۷ سانتیمتر (پشتی ـ شکمی) از منطقه جزر و مدی در ناحیه بندر لنگه در مهر و آبان ماه ۱۳۷۱ جمع‌آوری گردید. پس از تمیز کردن پوسته خارجی صدف (برس زدن)، صدف‌ها به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۲۰ + ۲۹ و تراکم یک اویستر در لیتر در آکوآریوم‌های حاوی آب دریا با هوادهی مناسب به منظور تطابق با شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. آب آکوآریوم‌ها در طول مدت آزمایش به‌طور روزانه تعویض می‌شد. گونادها در ۹ حجم آب مقطر سرد (صفر درجه) هموژن شده و در RPM ۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۴°C سانتریفوژ گردیدند. عصاره حاصله به‌منظور مطالعه آنزیمی مورد مطالعه قرار گرفت. محیط سنجش آنزیمی حاوی ترکیبی از پارانیتروفنل فسفات (به‌عنوان سوبسترا) و غلظت‌های مختلف آدرنالین (۰، ۰/۰۷۴، ۰/۷۴، ۷/۴، ۷۴ میلی گرم در سی سی) بود که در ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داشتند. فعالیت آنزیمی با استفاده از کیت‌های کلینیکی شرکت «زیستی شیمی» سنجش و فعالیت آنزیمی برحسب میکرومول پارانیتروفنل حاصله از گرم بافت‌تر گوناد در شرایط سنجش آنزیمی در زمانهای مختلف گزارش شد. هر سنجش به‌صورت دوبل انجام و هر آزمایش سه بار تکرار گردید.

نتایج با استفاده از آنالیز رگراسیون به‌منظور مشخص کردن همبستگی میان زمان (متغیر غیروابسته) و فعالیت آنزیمی (متغیر وابسته) و همچنین بین غلظت‌های آدرنالین (متغیر غیروابسته) و فعالیت آنزیمی (متغیر وابسته) مورد تجزیه و تحلیل آماری واقع گردید.

ضریب همبستگی (r) برای یافتن میزان رابطه فعالیت آنزیمی به‌عنوان تابعی از زمان و غلظت‌های مختلف آدرنالی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

شکل‌های ۱ و ۲ به‌ترتیب نشان‌دهنده اثر زمان و آدرنالین بر فعالیت اسید فسفاتاز گونادی در C. cucullata می‌باشد. در جدول ۱، دامنه، انحراف معیار و انحراف استاندارد از میانگین اسید فسفتاز در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف آدرنالین مشخص گردیده است. معادله رگراسیون و ضریب همبستگی بین زمان و فعالیت آنزیمی و همچنین میان غلظت‌های آدرنالین و فعالیت آنزیمی به ترتیب در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده اند. نتایج حاصله بیانگر همبستگی زیاد معنی‌داری بین زمان و فعالیت آنزیمی در غلظت‌های مختلف آدرنالین بود ($r > ۰/۹۹$ و $p < ۰/۰۵$) در حالی که همبستگی بین غلظت‌های مختلف آدرنالین و فعالیت آنزیمی در زمانهای مختلف از نقطه نظر آماری معنی‌دار گزارش نگردید ($r > ۰/۵$، $p > ۰/۲$).

بحث

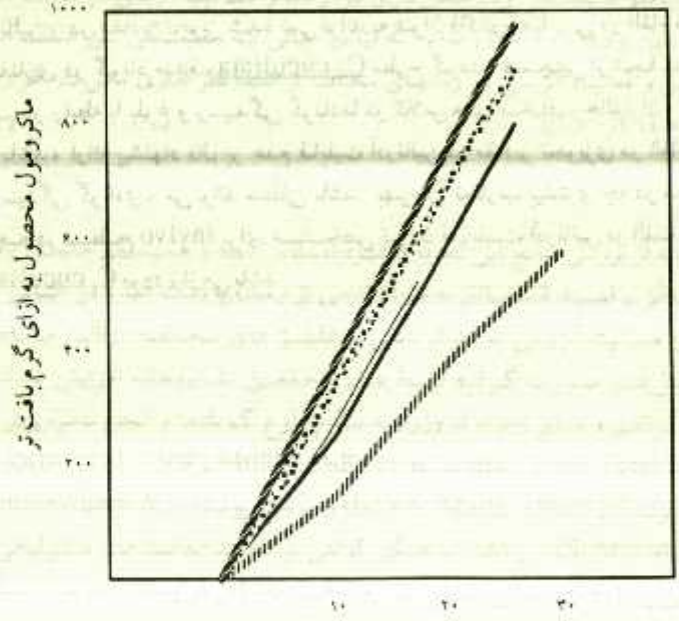
همانگونه که از بررسی نتایج این تجربه مشهود است، رابطه و همبستگی مثبت زیادی میان فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز به عنوان تابعی از زمان به‌دست آمد، در حالی که همبستگی بین فعالیت آنزیمی به عنوان تابعی از غلظت‌های مختلف آدرنالین مشاهده نگردید. پژوهش‌های صورت گرفته توسط سایر محققین نشان‌دهنده افزایش فعالیت اسید فسفاتاز گونادی و سایر اجزاء لیزوزوم به هنگام بلوغ گونادها و انجام تخم‌ریزی در ماهیان (Sidorov et al., 1980; Mukhopadhyay & Sinha., 1983; Establier et al., 1986) خزندگان (Ben & Maiti, 1986) و سخت پوستان (Munuswamy & Subramoniam, 1986) می‌باشد که همگی گواهی بر تجدید فعالیت‌های متابولیکی به هنگام انجام این پروژه‌های حیاتی است. در روند اسپرماتوژنز در پستانداران نیز دستگاه گلژی فعالتر شده و افزایش فعالیت اسیدفسفاتازی و همچنین افزایش تعداد لیزوزوم‌ها از چند عدد در اسپرماتوگونیا به تعداد بسیار زیادی در اسپرماتید مشهود می باشد (Chemes, 1986). همچنین استفاده از مواد مهارکننده فعالیت جنسی منجر به کاهش فعالیت ین آنزیم در بافت بیضه رت* می‌شود (Inanas, 1977). در بافت تخمدانی پیشنهاد شده است که اپی تلیوم سطح فولیکول گراف منبع پراهمیتی از آنزیم‌های پروتئولیتیک بوده و به هنگام ترشح خارجی سلولی در آزاد شدن تخمک از تخمدان نقش دارند (Ca jander & Bjersity, 1976).

فعالیت اسید فسفاتازی در اسپرم و تخمک جانوران تخمگذار (Oviparous) نشانگر

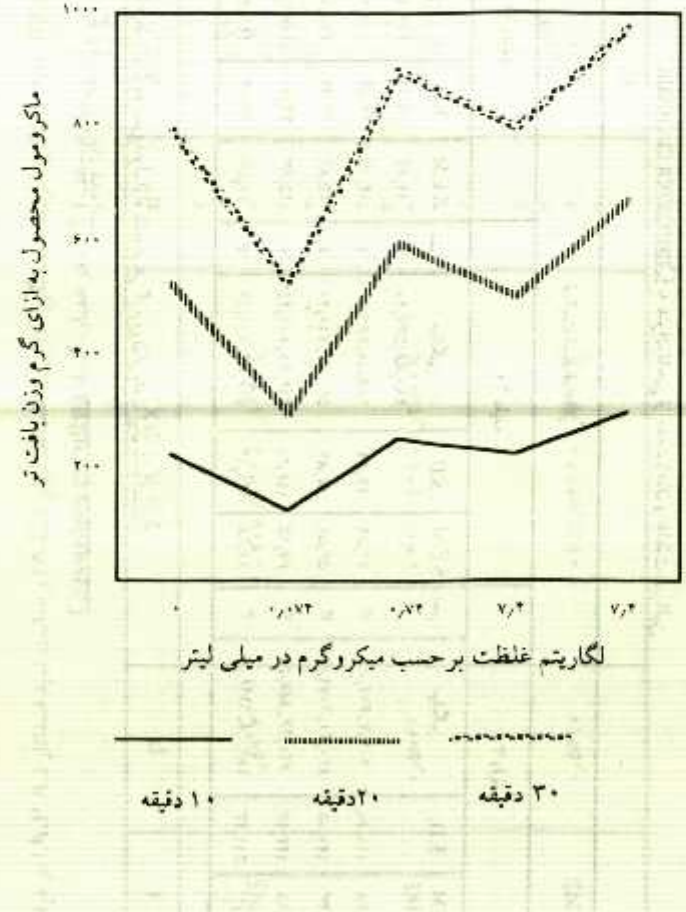
* Rat

اهمیت این آنزیم در فرآیندهای فیزیولوژیکی گامت ها است. به نظر می رسد که فعالیت اسید فسفاتازی در رابطه با نفوذ اسپرم به داخل تخمک در لقاح حائز اهمیت باشد (Ahluwalia, 1991 & Buckland - Nickst et al 1988) حضور این آنزیم در کرتکس تخمک غیرفعال و فعال در خلال واکنش کرتیکال دال بر نقش فیزیولوژیکی اسید فسفتاز در انحلال غشاء است (Hart et al., 1987). همچنین پیشنهاد شده است که فعالیت لیزوزومی برای سهولت جذب زرده تخمک مورد نیاز می باشد (Gopal et al., 1975). با استفاده از نتایج و بحث ارائه شده در این گزارش، چنین به نظر می رسد که آدرنالین، در مقادیر تجویز شده نمی تواند به عنوان فاکتور مناسبی در القاء فعالیت اسید فسفتازی در گوناد صدف C. cucullata مطرح گردد. همچنین از آنجا که فعالیت این آنزیم در رابطه با بلوغ و رسیدگی گونادها در کلاس های مختلف جانداران، حائز اهمیت می باشد، ارائه پیشنهاد دال بر عدم قابلیت آدرنالین در مقادیر تجویزی در القاء بلوغ جنسی و رسیدگی گونادی، می تواند منطقی باشد. بهرحال تجارب بیشتری چه در سطح Invitro و چه در سطح Invivo برای مشخص کردن قابلیت آدرنالین در القاء بلوغ جنسی C. cucullata مورد نیاز می باشد.

شکل ۱ ـ تغییرات فعالیت اسید فسفاتاز در واحد زمان برای غلظت های مختلف آدرنالین در هموژن گوناد C. cucullata هر نقطه نمایانگر میانگین سه تجربه دوبل است. انحراف معیار (S.D.)، انحراف استاندارد از میانگین (S.E.M.) هر نقطه در جدول یک نشان داده شده است.



شکل ۲ ـ فعالیت اسید فسفاتاز در هموژن گوناد C. cucullata به عنوان تابعی از غلظت آدرنالین در زمان‌های مختلف. هر نقطه نشانگر میانگین سه آزمایش دوبل است. انحراف معیار (S.D.) و انحراف استاندارد از میانگین (S.E.M.) هر نقطه در جدول یک نشان داده شده است.



جدول یک ـ دامنه، انحراف معیار (S.D) و خطای معیار میانگین (S.E.M) فعالیت اسید فسفاتاز در عصار گوناد Crassostrea cucullata به عنوان تابعی از مدت زمان و غلظت آدرنالین

فعالیت اسید فسفاتاز												
A.C.	۱۰ دقیقه				۲۰ دقیقه				۳۰ دقیقه			
	نمره	میانگین	S.D.	S.E.M.	نمره	میانگین	S.D.	S.E.M.	نمره	میانگین	S.D.	S.E.M.
۰/۰۰۰	۳	۲۱۶/۴۹_۱۵۲/۶۰	۱۹/۴۸	۱۱/۲۴	۳	۴۹۸/۸۸_۵۳۷/۹۰						
۰/۰۷۴	۳	۱۰۷/۲۰_۱۵۰/۳۱	۲۲/۵۲	۱۴/۱۷	۳	۲۸۹/۸۸_۳۴۳/۹۰	۲۲/۵۹	۲۲/۵۹	۳	۴۰۲/۴_۴۱۷/۷۲	۱۱۱/۶۹	۶۴/۴۸
۰/۷۴۰	۳	۲۲۰/۹۳_۳۰۳/۶۰	۴۲/۸۱	۲۵/۸۹	۳	۵۳۰/۸۷_۷۱۰/۴۱	۹۷/۸۹	۵۶/۵۲	۳	۸۲۰/۳۰_۱۰۷۱/۳۰	۱۴۱/۰۲	۸۱/۴۳
۷/۴۰۰	۳	۱۸۷/۷۹_۲۷۵/۴۱	۴۴/۹۰	۲۵/۹۳	۳	۳۹۳/۶۱_۶۱۲/۴۵	۱۱۶/۳۱	۶۷/۱۵	۳	۶۳۸/۲۶_۸۸۷/۵۷	۱۶۳/۷۲	۸۲/۹۸
۷۴/۰۰۰	۳	۲۳۲/۹۷_۳۶۳/۰۹	۶۶/۷۹	۳۸/۵۶	۳	۵۲۶/۷۷_۹۰۱/۵۹	۱۴۱/۱۳	۸۱/۴۸	۳	۷۸۱/۳۸_۱۱۹۶/۸۰	۲۱۱/۳۳	۱۲۲/۰۰

* فعالیت اسید فسفاتاز به صورت میکرومول پارانیتروفنول آزاد شده از هر گرم وزن تر بافت بیان شده است.

+ غلظت آدرنالین به صورت میکروگرم در میلی لیتر بیان شده است.

جدول ۲ ـ معادله همبستگی (Y = A + BX) و ضریب همبستگی (r) بین غلظت آدرنالین (A.C.) و فعالیت اسید فسفاتاز (A.P.A.) در فواصل زمانی مختلف (T.I.) در عصارهٔ گوناد Crassostrea cucullata.

DV¹/DV²	T.I.	A.C.	n	Y = A + BX	p	r
APA/AC	۱۰	۰	۳			
		۰٫۰۷۴	۳			
		۰٫۷۴	۳	y = ۲۰۷٫۵۰۳۲ + ۱٫۱۴۴۶X	۰٫۵۹۰۳	NS
		۷٫۴	۳			
		۷۴٫۰	۳			
APA/AC	۲۰	۰	۳			
		۰٫۰۷۴	۳			
		۰٫۷۴	۳	y = ۴۸۲٫۱۶۴۰ + ۲٫۲۵۸۰X	۰٫۵۷۶۶	NS
		۷٫۴	۳			
		۷۴	۳			
APA/AC	۳۰	۰	۳			
		۰٫۰۷۴	۳			
		۰٫۷۴	۳	y = ۷۵۳٫۷۳۴۶ + ۲٫۹۳۳۲X	۰٫۵۶۱۷	NS
		۷٫۴	۳			
		۷۴	۳			

N.S آزمون معنی‌دار نیست

+ غلظت آدرنالین به صورت میکروگرم در میلی‌لیتر آورده شده است.

* متغیر وابسته

× متغیر پیوسته

جدول ۳ـ معادله همبستگی (Y = A + BX) و ضریب همبستگی (r) بین فاصله زمانی (TC) و فعالیت اسید فسفاتاز (APA) در غلظتهای مختلف آدرنالین (AC) در عصارهٔ گوناد Crassostrea cucullata.

DV^{r}/IDV^{k}	AC	Time (min.)	n	Y = A + BX	r	P
APA/TC	۰٫۰۰۰	۱۰ ۲۰ ۳۰	۳ ۳ ۳	y = − ۵۷٫۴۲ + ۲۸٫۶۳ X	۰٫۹۹۹۶	< ۰٫۰۱
APA/TC	۰٫۰۷۴	۱۰ ۲۰ ۳۰	۳ ۳ ۳	y = − ۸۳٫۹۱ + ۲۰٫۲۶ X	۰٫۹۹۹۶	< ۰٫۰۲
APA/TC	۰٫۷۴۰	۱۰ ۲۰ ۳۰	۳ ۳ ۳	y = − ۶۹٫۸۶ + ۳۲٫۸۲ X	۰٫۹۹۹۵	< ۰٫۰۵
APA/TC	۷٫۰۰۰	۱۰ ۲۰ ۳۰	۳ ۳ ۳	y = − ۴۴٫۶۳ + ۲۸٫۳۶ X	۰٫۹۹۹۹	< ۰٫۰۱
APA/TC	۷۴٫۰۰۰	۱۰ ۲۰ ۳۰	۳ ۳ ۳	y = − ۴۲٫۹۰ + ۳۳٫۸۴ X	۰٫۹۹۹۶	< ۰٫۰۵

* غلظت آدرنالین به میکروگرم در میلی‌لیتر بیان شده است.

+ متغیر وابسته

× متغیر مستقل.

تشکر و قدردانی

لازم می‌دانم از آقایان حمید رضایی و دکتر درودی به خاطر ارائه نظرات و پیشنهادات سازنده در تدوین این گزارش قدردانی نمایم. همچنین از آقای قنبرزاده در اجرای کار نمونه برداری و مراقبت از آکوآریوم‌ها در خلال این پژوهش‌ها تشکر می‌کنم. هزینه این پژوهش تماماً، توسط مرکز تحقیقات نرمتنان خلیج فارس تأمین گردیده است.

منابع

Ahluwalia, B., Rajgura, S., Westney, L. S. & Kaul, L., 1991. Zinc inhibits protein phosphorylation in isolated sperm head membranes in spisula solidissima. Andrologia. 23 (2): 121 - 126.

Ben, M. & Maiti, B.R., 1980. Histochemical changes in the oviduct during sixual maturity in the soft - shelled turtle (Lissemys punctata). Zool. Anz. 216 (1/2): 90 - 94.

Buckland - Nicks, J., Koss, R. & Chia, F.S., 1988. The elusive acrosome of chition sperm. Int. Inverteber. Reprod. Dev. 13 (2): 193 - 198.

Cajander, S. & Bjersing, L., 1976. Further Studies of the surface epithelium convering preovulatory rabbit follicles with special reference to lysosomal alternations. Cell Tissue Res. 169 (2): 129 - 142.

Chemes, H., 1986. The phagocytic functjon of Sertoli cells: A morphological, biochemical & endocrinological study of lysosome & acid phosphatase localization in the rat testis. Endocrinology. 119 (4): 1673 - 1681.

De Robertis, E.D.P. & De Robertis, E.M.F., 1981. Cell And Molecular Biology. 7th edn. Holt - Saunders International Edition, Tokyo, pp. 294 - 295.

Establier, R., Gutierrez, M., Sarasquete, Mac., Blasco, J., & Bravo, E., 1986. Chnges in phosphatase activity in various organs of the

toadfish, Halobatrachus didactylus (Schneider, 1801), during sexual maturation. Invest. Pesq. (Barc.) 50 (2): 271 - 278.

Gopal, D.N.H., Govindan, P. & Rajasele, M.R., 1975. Histochemical localization of alkaline & acid phosphatase in the oocytes of Anabas scandens (Cuvier). J. Anim. Morphol. Physiol. 22 (2): 151 - 158.

Hart, N.H., Wolenski, J.S. & Donovan, M.J., 1987. Ultrastructural localization of lysosomal enzymes in the egg cortex of Brachydanio. J. Exp. Zool. 244 (1): 17 - 32.

Inanas, O., 1977. Decrease of acid phosphatase activity in rat testis after administration of antisexual urinary substance. Endocrionologie. 15 (2): 123 - 5.

Mukhopadhyay, S. & Shnha, g.M., 1983. A histochemical study of some phosphatase in the testes of an Indian freshwater major crap, Cirrhinus mroigala (Hamilton), during maturation & spawning phases. Zool. Jahrb. (Anat. Ontog. Tiere) 109 (3): 359 - 367.

Munuswamy, N. & Subramoniam, T., 1986. Histochemical studies on the vitellogenesis in a fairy shrimp streptocephalus dichotomus Baird (Crustaces: Anostraca). Proc. Indian Acad. Sci., Anim. Sci. 95 (2): 171 - 179.

Reddy, H.J. & Svoboda, D.J., 1976. Lysosomal activity in Sertoli cells of normal & degenerating seminiferous epithelium of rat testes. Am. J. Pathol. 51 (1): 1 - 17.

Sidorov, V.S., Vysotskaya, R.U. & Kostylev, Y., 1980. Lysosomal enzyme activity in adult females of Salmo salar during prespawning maturation. J. Ichthyol. 20 (4): 111 - 116.

Surveying Adrenaline Influence Upon Acid Phosphatase Activity in Crassostrea. cucullata Gonadal Extract.

peyman Roostaeian

Persian Gulf Molluscs Fisheries Research Center. Bandar Lengeh, I.F.R.T.O.

ABSTRACT

The effect of Adrenaline on Acid phosphatase activity in the gonadal extract of C. cucullata at different time intervals (10, 20, 30 minutes) and adrenaline concentrations (0, .074, 0.74, 7.4, 74 $\mu g ml^{-1}$) was studied.

The results showed that there is a highly significant correlation between time intervals (IV)[1] and acid phosphatase activity (DV)[2] at different adrnaline concentrations ($P < 0.05$, $r > 0.999$).

Aditionally, no significant correlation was detected between adrenaline concentration (IV) and acid phosphatase activity (DV) at different time intervals ($P > 0.2$, $r > 0.5$).

1 - Independent variable
2 - Dependent variable