پاسخ‌هاي فيزيولوژيک ناشي از کاشت هورمون کورتيزول در فيل ماهي (***Huso huso***) ماده پرورشي جراحي شده باآندوسکوپي

سمانه پورسعيد[۱]، بهرام فلاحتکار*[۱]، باقر مجازي اميري[۲] و گلن وندر کراک[۳]
[۱] گروه شيلات، دانشکده منابع طبيعي، دانشگاه گيلان، صومعه سرا، ايران
[۲] گروه شيلات، دانشکده منابع طبيعي، دانشگاه تهران، کرج، ايران
[۳] گروه بيولوژي تکميلي، دانشگاه گوئلف، گولف، کانادا
(تاريخ دريافت: ۱۳۹۰/۱/۲۲ ، تاريخ تصويب: ۱۳۹۰/۱۰/۲۰)

چکيده
اين مطالعه با هدف بررسي کاشت هورمون کورتيزول (به منظور القاي استرس مزمن) بر شاخص هاي هماتولوژيک و غلظت هورمون کورتيزول در فيل ماهي ماده پرورشي بعد از جراحي آندوسکوپي صورت پذيرفت. در شروع آزمايش، وضعيت گنادي همه ماهيان با استفاده از دستگاه آندوسکوپي تعيين شد. سپس به منظور شبيه سازي استرس مزمن در ماهيان جراحي شده، کپسول هاي حاوي کورتيزول- Cocoa butter به صورت داخل صفاقي در فيل ماهيان ماده سه ساله در مرحله دو رسيدگي جنسي (وزن متوسط ۵۳/۲۳ ± ۶۷۵۹ گرم) کاشته شدند. ميزان هورمون دريافتي شامل صفر (C_0؛ شاهد)، ۵ (C_5) و ۵۰ (C_{50}) ميلي گرم به ازاي هر کيلوگرم وزن بدن و پنج عدد ماهي به ازاي هر گروه در نظر گرفته شد. هر هفته به مدت ۲۸ روز از ماهيان خون گرفته شد تا پاسخ هاي هماتولوژي و غلظت کورتيزول خون ارزيابي گردد. اختلاف معني داري در غلظت کورتيزول سرم در طول دوره آزمايش در ماهيان C_{50} مشاهده نشد اما در ماهيان C_5 غلظت کورتيزول افزايش معني داري در طي چهار هفته داشت. همچنين اختلاف معني داري در غلظت کورتيزول در گروه C_5 به طور معني داري بالاتر از گروه هاي شاهد و C_{50} بود. تعداد گلبول هاي سفيد در کليه تيمارها بعد از جراحي افزايش يافت اما پاسخ در تيمار شاهد کمتر از دو تيمار دريافت کننده کورتيزول بود. کاشت هورمون تاثير معني داري بر ميزان هموگلوبين و هماتوکريت نداشت. اختلاف معني داري در درصد لنفوسيت ها و نوتروفيل ها در هفته دوم و چهارم بعد از کاشت در گروه هاي آزمايشي مشاهده شد. تعداد سلول هاي سفيد خون در درصد افتراقي نشان از بروز پديده نوتروفيلا و لنفوپنيا در تيمارهاي C_5 و C_{50} از هفته دوم بعد از اندوسکوپي و کاشت کورتيزول داشت. نتايج نشان داد استرس هاي مزمن بعد از جراحي آندوسکوپي باعث کاهش پاسخ ايمني و سرکوب آن مي شود. همچنين نشان داد که فيل ماهي در مقايسه با ماهيان استخواني پاسخ کمتري را به کاشت کورتيزول نشان مي دهد.

واژه هاي کليدي: استرس مزمن، جراحي آندوسکوپي، سلول هاي خوني، کورتيزول، فيل ماهي (*Huso huso*)

* نويسنده مسئول: تلفن: ۰۱۸۲۳۲۲۳۵۹۹ فاکس: ۰۱۸۲۳۲۲۳۶۰۰ E-mail: falahatkar@guilan.ac.ir

مقدمه

استرس يکي از مشکلات عمده در آبزي پروري محسوب مي گردد و از مهم ترين اثرات آن مي توان به کاهش رشد، اختلال در سيستم هاي ايمني و عملکرد توليد مثلي اشاره کرد (Wendelaar bonga, 1997; Pankhurst and Van Der Kraak, 1997; Barton, 2002). در ماهيان، مشابه پستانداران سيستم عصبي، اندوکريني و ايمني داراي ارتباط متقابل با يکديگر هستند. تحقيقات مختلف نشان داده است که سيستم ايمني تحت کنترل هورمون هايي نظير کورتيکوستروئيد بوده و در صورت تغيير اين هورمون ها در طول مدت بروز استرس، اختلالاتي در فعاليت سيستم دفاعي رخ داده و در نهايت سبب ظهور بيماري مي شود (Hou *et al*., 1999; Harris *et al*., 2000; Chen *et al*., 2002). مطالعات انجام شده بر روي پستانداران و جوندگان نشان داده است که استرس هاي مزمن باعث تاخير در بهبود زخم مي شوند (Padgett *et al*., 1998; Sheridan *et al*., 2004) همچنين عملکرد سيستم ايمني را مختل مي سازد (Pulsford *et al*., 1994; Espelid *et al*., 1996; Verburg-van Kemenade *et al*., 1999).

جراحي آندوسکوپي، عملي با رويت درون بدن بوسيله برش هاي بسيار کوچک مي باشد و به دليل کارايي بالا، آسيب جزيي به بدن و بهبود سريع پس از عمل، امروزه به طور گسترده اي در پزشکي مورد استفاده قرار مي‌گيرد. امروزه استفاده از اين شيوه علاوه بر پزشکي، در برخي از شاخه هاي ديگر علوم از جمله دامپزشکي براي جراحي انواع حيوانات کوچک و بزرگ با اهداف متفاوتي متداول شده است. مطالعات بر روي پستانداران نشان داده است که جراحي اندوسکوپي، استرس حادي را به موجودات وارد نموده و باعث افزايش غلظت کورتيزول خون مي شود (Martin *et al*., 1981; Kehlet, 1999). در اين ارتباط، مطالعه خاصي در ماهيان صورت نگرفته است و تنها مطالعه انجام شده نشان دهنده افزايش پاسخ هاي استرسي پس از بيوپسي و لاپاراسکوپي در فيل ماهي است (Falahatkar, 2010). در اين بين، ماهيان مدل مناسبي جهت بررسي ارتباط متقابل سيستم هاي اندوکريني و ايمني مي باشند، چرا که بخش پرونفروز کليه مرتبط کننده توليد کورتيکوستروئيدها به بخش هاي مهم ايمني مانند خون سازي و توليد آنتي بادي مي باشد.

ماهيان خاوياري از گونه هاي بسيار با ارزش هستند که امروزه نسل آنها بنا به دلايلي من جمله صيد بي رويه، افزايش آلودگي آبها، از بين رفتن مناطق تخم ريزي در حال کاهش بوده و بسياري از آنها در فهرست گونه هاي در معرض خطر قرار گرفته اند (IUCN, 2010). کاهش بيش از حد ذخاير و صدمات جبران ناپذير به ذخاير طبيعي اين ماهيان با ارزش، بسياري از کشورهاي جهان را به توسعه و گسترش صنعت آبزي پروري گونه هاي سريع الرشد و مقاوم به شرايط نامساعد محيطي معطوف ساخته است (Bronzi *et al*., 2009) بطوريکه طبق آمارهاي ارائه شده توسط سازمان خواربار جهاني، ميزان پرورش انواع گونه هاي خاوياري در سال ۲۰۱۰ به ۴۰۲۷۳ تن رسيده است (FAO, 2010). در صنعت آبزي پروري ماهيان خاوياري، بسته به هدف پرورش (گوشتي يا توليد خاويار) تعيين جنسيت امري ضروري مي باشد. در حال حاضر از شيوه هاي مختلفي نظير بيوپسي (Conte *et al*., 1988) و آندوسکوپي (Wildhaber *et al*., 2005; Wildhaber *et al*., 2007; Hurvitz *et al*., 2007) جهت عمليات مذکور استفاده مي گردد که با هدف تشخيص جنس نر و ماده انجام شده تا به اين طريق بتوان ماهيان نر را جهت توليد گوشت به بازار عرضه و ماهيان ماده را جهت استحصال خاويار و تکثير مصنوعي آتي در سيستم هاي پرورشي نگهداري نمود. لازمه اين فعاليت ها مستلزم عمل جراحي و ايجاد برش در سطح شکمي ماهي براي مشاهده گناد ها است که در اين اثنا محل جراحي با توجه به وضعيت فيزيولوژيک ماهي، شرايط نگهداري، مديريت نا مناسب تغذيه اي و بهداشتي، ممکن است عفوني شده و محل مناسبي براي رشد باکتري ها و قارچ ها و عفونت هاي ثانويه گردد. در پرورش ماهيان خاوياري استرس زا بودن

عواملي نظير تراكم بالا، كيفيت نامناسب آب، استرس دستكاري نظير ساير ماهيان استخواني نيز به اثبات رسيده است (Barton *et al*., 1998, 2000; Barton, 2002; Webb *et al*., 2007; Rafatnezhad *et al*., 2008). وجود چنين عوامل استرس زايي مي تواند با تضعيف سيستم ايمني سلامت ماهيان را بعد از جراحي به مخاطره بياندازند. تا كنون مطالعه اي در خصوص اثرات استرس مزمن روي پاسخ هاي فيزيولوژيک ماهيان جراحي شده صورت نگرفته است. از آنجا كه سلول ها و ساير شاخص هاي خوني درک مناسبي از شرايط فيزيولوژيک و پاسخ هاي استرسي در ماهيان نسبت به تغييرات رخ داده با منشا داخلي و خارجي را نشان مي دهند (Wedemeyer *et al*., 1983; Rey Vazquez and Guerrero, 2007). بنابراين اين مطالعه با هدف بررسي اثرات كاشت هورمون كورتيزول (به منظور القاي استرس مزمن موجود در سيستم هاي پرورشي) بر روي تغييرات پاسخ هاي فيزيولوژيک بعد از جراحي اندوسكوپي در فيل ماهي (*Huso huso*) ماده پرورشي كه يكي از مهم ترين گونه هاي ماهيان خاوياري با رشد سريع و داراي خاوياري با كيفيت بالا است صورت پذيرفت.

مواد و روش ها

ماهي و شرايط پرورش

كليه مراحل اجرايي اين تحقيق در كارگاه پرورش ماهيان خاوياري مروارید قروق تالش واقع در استان گيلان با استفاده از يک مخزن بتوني گرد (قطر ۲۹۷ سانتي متر، عمق ۵۷ سانتي متر و ظرفيت ۳۹۵۰ ليتر) كه مجهز به سيستم آبرساني از آب چاه و هوادهي پيوسته بود انجام پذيرفت. ۱۵ فيل ماهي ماده سه ساله با ميانگين وزني ۵۳/۲۳ ± ۶۷۵۹(ميانگين ± خطاي معيار) گرم و طولي ۱/۱۱ ± ۱۰۶/۹ سانتي متر براي انجام اين مطالعه انتخاب شدند. در طول مدت آزمايش از غذاي تجاري فرادانه (شهركرد، ايران) با محتواي پروتئيني ۳۶%، چربي ۱۴%، خاكستر ۱۰% و رطوبت ۱۱%، به ميزان ۱/۵ درصد وزن بدن استفاده شد. دماي آب در طول دوره پرورش ۰/۳± ۱۲/۹سانتي گراد و غلظت اكسيژن محلول ۰/۲± ۶/۱ ميلي گرم در ليتر بود.

تعيين جنسيت و طراحي آزمايش

جهت تعيين جنسيت تمامي ماهيان از دستگاه آندوسكوپ (#21.00a, LUT GmbH, Denzlingen, Germany) مدل ۳۰° به همراه ملحقات مربوطه شامل منبع نور هالوژن سرد، كابل نور سرد، دوربين و ست بيوپسي استفاده به عمل آمد. به منظور جراحي ابتدا ماهيان با استفاده از پودر گل ميخک به ميزان ppm ۴۰۰ بيهوش شدند. ماهي بيهوش شده بر روي ميز كار قرار گرفت. سپس توسط اسكالپل شكافي به طول كمتر از يک سانتي متر در ناحيه شكمي بين پلاک هاي سوم و چهارم انتهايي به صورت افقي ايجاد گرديد و به طريق Open access با تكنيک Hasson وارد حفره شكمي شده و نهايتا توسط سيستوسكوپ اين دستگاه گناد ماهي در مانيتوري كه به آندوسكوپ متصل بود مشاهده شد (Falahatkar *et al*., 2011). بيوپسي از گناد توسط فورسپس صورت گرفت و حدود ۲-۳ گرم گناد برداشته شد. قبل از بخيه زدن محل جراحي، به منظور شبيه سازي و القاي استرس مزمن در ماهيان جراحي شده، كپسول‌هاي حاوي هورمون كورتيزول (Hydrocortisone; Sigma-Aldrich, St. Luis, Mo, USA) و Cocoa butter (Altinmarka, Istanbul, Turkey) در بدن ماهيان در محل جراحي به صورت داخل صفاقي كاشته شدند. ماهيان انتخاب شده با پلاک هاي ميكروچيپ توسط دستگاه پلاک زن علامت گذاري گرديدند. آماده سازي كپسول ها در آزمايشگاه صورت گرفت بدين منظور، ابتدا هورمون كورتيزول بر اساس وزن بدن ماهيان با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن و سپس به داخل دو كپسول ژلاتيني (با ابعاد ۵ × ۵ × ۲۰ ميلي متر) منتقل شدند. در نهايت، به داخل كپسول محتوي هورمون، ۰/۲ ميلي ليتر Cocoa butterذوب شده به عنوان حاملي براي رها سازي آهسته هورمون مذكور اضافه گرديد (Trudeau *et al*., 1991; Zou *et al*., 1997). در اين مطالعه، پنج ماهي

ماده سه ساله جراحي شده که در مرحله II رسيدگي جنسي قرار داشتند براي هر تيمار هورموني در نظر گرفته شد. تيمارهاي آزمايشي شامل موارد ذيل بودند:

تيمار يک (شاهد؛ C_0):

0 mg Cortisol/kg body weight + 0.2 ml Cocoa butter

تيماردوم (C_5):

5 mg Cortisol/kg body weight + 0.2 ml Cocoa butter

تيمارسوم (C_{50}):

50 mg Cortisol/kg body weight + 0.2 ml Cocoa butter

سطوح هورمون هاي مورد نظر بر اساس مطالعات مشابه پيشين تعيين شد (Vijayan *et al*., 1988; Barreto *et al*., 2006; Morgado *et al*., 2007). بعد از کاشت کپسول هاي محتوي هورمون و حامل، محل شکاف با يک بخيه ساده بسته شد و با پوويدون آيودين-مديفارم ۱۰ درصد ضد عفوني گرديد. همچنين جهت جلوگيري از عفونت هاي باکتريايي، mL ۱ اکسي تتراسايکلين به صورت عضلاني زير باله پشتي ماهيان تزريق شد.

اندازه گيري فاکتورهاي هماتولوژي

از تمامي ماهيان در شروع آزمايش (قبل از جراحي آندوسکوپي) و هر هفت روز به مدت چهار هفته، mL ۴ خون از سياهرگ وريدي در قسمت انتهايي باله مخرجي توسط سرنگ غير هپارينه اخذ شد. در هر مرحله نمونه گيري ماهيان با استفاده از پودر گل ميخک به ميزان ppm ۴۰۰ بيهوش شدند. سپس بخشي از نمونه خون به لوله هاي هپارينه منتقل تا پارامترهاي معمول هماتولوژيک شامل تعداد گلبول هاي سفيد (WBC) و قرمز (RBC)، ميزان هماتوکريت (Hct) و غلظت هموگلوبين (Hb) مورد سنجش قرار گيرند. همچنين به ازاي هر ماهي، دو عدد لام جهت تهيه گسترش خوني و تعيين درصد افتراقي گلبول هاي سفيد در نظر گرفته شد.

اندازه گيري غلظت کورتيزول

بخشي از خون اخذ شده به لوله هاي غير هپارينه منتقل و به منظور جدا سازي سرم در g ۱۶۰۰ دور به مدت ۱۰ دقيقه سانتريفيوژ گرديد. نمونه هاي سرم اخذ شده تا زمان اندازه گيري کورتيزول، در فريزر ۸۰- درجه سانتي گراد نگهداري شدند. کورتيزول موجود در سرم بر اساس روش ELISA با استفاده از کيت تجاري Radim (Pomezia, Roma, Italia) و به وسيله دستگاه الايزاريدر (Sirio S, Seac RADIM, Italy) با واحد $ng\ ml^{-1}$ اندازه گيري شد (Barry *et al*., 1993).

تهيه گسترش خوني و شمارش افتراقي گلبول سفيد

براي اين منظور يک قطره خون منعقد نشده روي لام تميز ريخته شد و با استفاده از لام سنگي با زاويه ۴۰ درجه گسترشي از خون تهيه گرديد. پس از خشک شدن لام در دماي اتاق، جهت فيکس کردن از متانول استفاده شد. سپس لام ها با رنگ گيمسا رنگ آميزي شدند. بعد از ۲۰ دقيقه، لام ها با آب مقطر شستشو داده شده و با استفاده از ميکروسکوپ نوري با بزرگنمايي ۱۰۰ و روغن ايمرسيون مورد بررسي قرار گرفتند. براي شمارش افتراقي گلبول هاي سفيد، بخشي از لام که نازک و شامل يک لايه سلول بود انتخاب شد. تعداد گلبول هاي سفيد شمارش شده در هر مرحله ۲۰۰ بود و نهايتاً تعداد سلول هاي بدست آمده بر حسب درصد بيان گرديد (Houston, 1990).

تعيين درصد هماتوکريت (**Hct**)

بيش از دو سوم لوله هاي هماتوکريت با خون بر اساس خاصيت موئينگي پرگرديدند. سپس لوله ها با دستگاه ميکروهماتوکريت با دور g ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقيقه سانتريفيوژ شدند و در انتها، ميزان Hct بر حسب درصد توسط صفحه مدرج مخصوص قرائت گرديد (Řehulka, 2000).

تعیین غلظت هموگلوبین (**Hb**)

براي اندازه گيري مقدار Hb بر طبق روش Cyanmethemoglobin، ۲۰ میکرولیتر خون با ۵ میلي ليتر محلول درابکین مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در محیط تاریک نگهداري شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۶-۵۴۰ نانومتر میزان جذب نوري نمونه ها و استاندارد در مقابل شاهد خوانده و از رابطه T/S×20 غلظت Hb بر حسب گرم در دسي ليتر محاسبه گرديد (Svobodova and Vykusova, 1991).

تعیین تعداد گلبول قرمز (**RBC**)

براي شمارش RBC از پیپت هاي حباب دار (ملانژور) قرمز استفاده گرديد. تعداد RBC با استفاده از لام نئوبار بعد از رقیق سازي خون با محلول ریس (با رقت ۱ به ۲۰۰) شمارش شد. از مربع هاي مياني (۴ مربع در گوشه و یک مربع در وسط) لام نئوبار براي شمارش استفاده و عدد بدست آمده در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب و تعداد RBC در یک میلي متر مکعب خون محاسبه گرديد (Houston, 1990).

تعیین تعداد گلبول سفید (**WBC**)

براي شمارش WBC از پیپت هاي حباب دار (ملانژور) سفید استفاده گرديد. تعداد WBC با استفاده از لام نئوبار بعد از رقیق سازي خون با محلول ریس (با رقت ۱ به ۵۰) شمارش شد. از ۴ مربع کناري لام نئوبار براي شمارش استفاده و عدد بدست آمده در عدد ۵۰ ضرب و تعداد WBC در یک میلي متر مکعب خون محاسبه گرديد (Houston, 1990).

روش هاي آماري

ابتدا وضعیت داده ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov براي نرمال بودن داده ها و آزمون Levens براي همگني واریانس ها، بررسي شد. بعد از اطمینان از نرمال بودن داده ها و همگني واریانس ها، جهت تجزیه و تحلیل داده ها در طول دوره نمونه گیري از آنالیز واریانس یک طرفه با مقادیر تکراري (One-Way Repeated Measure Analysis of Variance) جداگانه براي هر تیمار هورموني استفاده شد. در این آزمون، زمان هاي نمونه گیري به عنوان عامل درون آزمودني (Within subject) و هر ماهي به عنوان یک عامل آزمودني (Subject) در نظر گرفته شدند. مقایسه میانگین ها در طول زمان با استفاده از t-test جفتي صورت پذیرفت و براي کنترل خطاي نوع اول از آزمون Holm's sequential Bonferroni استفاده گرديد (Quinn and Keough, 2002). همچنین از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون چند دامنه Tukey براي مقایسه تفاوت آماري بین میانگین هاي سه گروه آزمایشي در هر زمان نمونه گیري استفاده شد (Zar, 1999). از نرم افزار SPSS (Chicago, IL, USA, version 15) براي آنالیز آماري داده ها در سطح اعتماد ۵% استفاده گرديد. داده هاي درون متن به صورت میانگین ± خطاي معیار (mean ± S.E) بیان شده اند.

نتایج

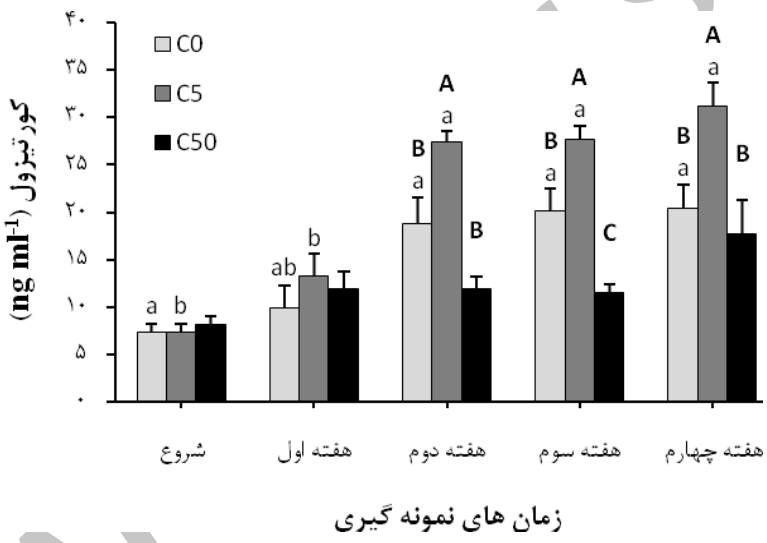
غلظت هورمون کورتیزول در سرم خون ماهیان شاهد بعد از جراحي آندوسکوپي افزایش قابل ملاحظه اي یافت بطوري که اختلاف معني داري بین هفته هاي دوم، سوم و چهارم با شروع آزمایش مشاهده شد (نمودار ۱، $P<۰/۰۵$). یک روند افزایشي و معني دار در طول چهار هفته در تیمار C_5 بعد از کاشت کورتیزول مشاهده شد (نمودار ۱، $P<۰/۰۵$). اما غلظت کورتیزول سرم در تیمار C_{50} تقریباً روند ثابتي در طول چهار هفته داشت (نمودار ۱، $P>۰/۰۵$). مقایسه آماري بین تیمارها نشان داد که غلظت کورتیزول ماهیان تیمار C_5 از هفته دوم تا انتهاي آزمایش به صورت معني داري بالاتر از گروه هاي شاهد و C_{50} بود ($P<۰/۰۵$).

غلظت این هورمون کورتیکوستروئیدي در تیمار C_{50} در اکثر زمان هاي نمونه گیري کمتر از گروه شاهد بود. با این وجود اختلاف معني‌داري جز در سومین هفته

نمونه‌گيري بين اين دو تيمار مشاهده نشد (نمودار ۱، $P>۰/۰۵$).

تعداد WBC در همه تيمارها تا هفته دوم پس از کاشت کپسول افزايش يافت و پس از آن روند کاهشي را نشان داد. اين در حالي است که تنها در هفته سوم اختلاف معني داري بين تيمارها مشاهده شد (نمودار۲، الف)، بطوري که تيمار C_5 با بيشترين تعداد گلبول هاي سفيد، اختلاف معني داري را با گروه شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$). در طول دوره آزمايش، تنها در تيمار C_5 اختلاف معني داري مشاهده شد بطوري که تعداد WBC در هفته دوم بعد از کاشت هورمون اختلاف معني داري را با شروع آزمايش و هفته چهارم نشان داد.

تعداد RBC تا هفته سوم بعد از کاشت کپسول در هر سه تيمار روند افزايشي داشت و در تيمار شاهد در هفته چهارم به بالاترين تعداد خود رسيد اما در دو تيمار C_5 و C_{50}کاهش يافت (نمودار۲، ب). در سومين هفته بعد از کاشت هورمون، تيمار C_{50} با بيشترين تعداد RBC اختلاف معني داري با تيمار شاهد نشان داد (نمودار ب۲، $P<۰/۰۵$).



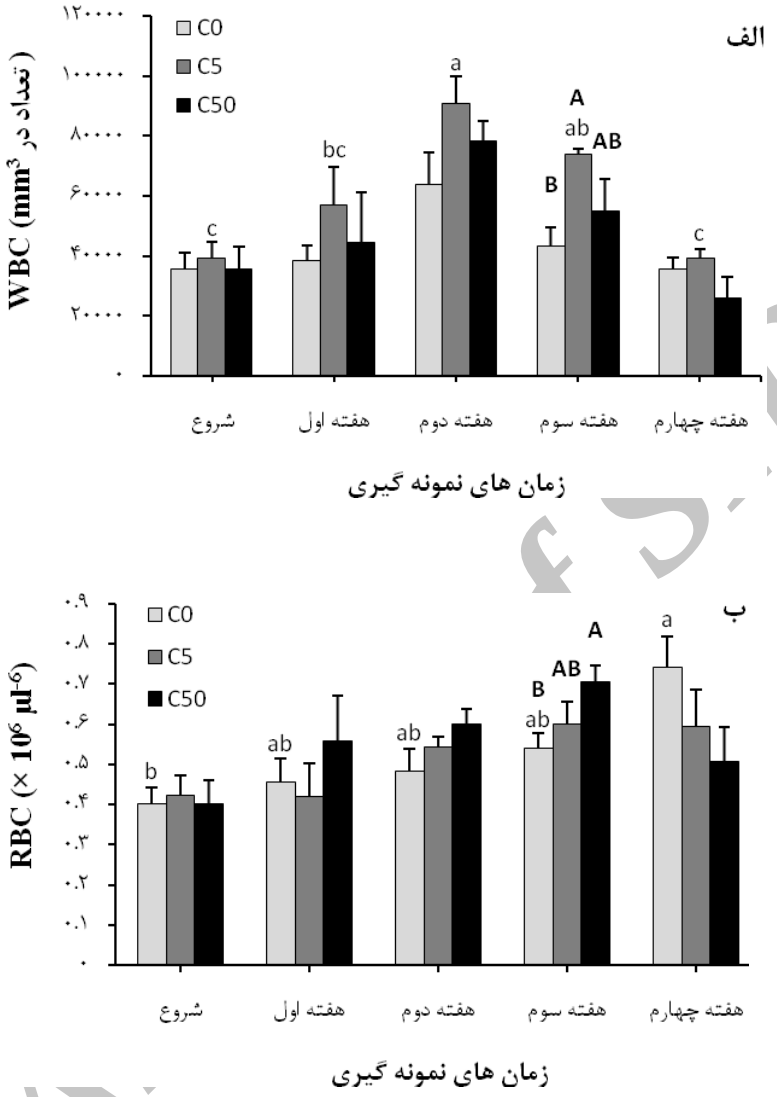
نمودار ۱- روند تغييرات غلظت هورمون کورتيزول پس از کاشت هورمون کورتيزول در فيل ماهي ماده پرورشي طي چهار هفته نمونه برداري.

*حروف **A**، **B** و **C** نشان دهنده اختلاف معني دار بين ميانگين هاي تيمارهاي مختلف است ($P<۰/۰۵$).

حروف **a** و **b** نشان دهنده اختلاف معني دار بين ميانگين هاي يک تيمار در طول آزمايش است.

ستون هاي داراي حداقل يک حرف مشترک در هر تيمار فاقد اختلاف معني دار هستند ($P>۰/۰۵$).

داده ها به صورت ميانگين ± خطاي معيار ارائه شده اند (براي هر تيمار **n= ۵**).



نمودار ۲- روند تغییرات تعداد گلبول سفید **WBC** (الف) و قرمز **RBC** (ب) پس از کاشت هورمون کورتیزول در فیل ماهي ماده پرورشي طي چهار هفته نمونه برداري. *حروف **A** و **B** نشان دهنده اختلاف معني دار بين ميانگين هاي تيمارهاي مختلف است (***P***<۰/۰۵). حروف **a**، **b** و **c** نشان دهنده اختلاف معني دار بين ميانگين هاي يک تيمار در طول آزمايش است (***P***<۰/۰۵). ستون هاي داراي حداقل يک حرف مشترک در هر تيمار فاقد اختلاف معني دار هستند (***P***>۰/۰۵).داده ها به صورت ميانگين ± خطاي معيار ارائه شده اند (براي هر تيمار **n**= ۵).

جدول ۱ ميزان هموگلوبين، هماتوکريت و درصد افتراقي گلبول هاي سفيد را نشان مي دهد. کاشت هورمون، تاثير معني داري بر ميزان هموگلوبين و هماتوکريت نداشت ($P>$ ۰/۰۵). بيشترين درصد نوتروفيل و کمترين درصد لنفوسيت در هفته اول بعد از کاشت مشاهده گرديد اما اختلاف معني داري در اين هفته بين تيمارها مشاهده نشد. در دومين هفته بعد از کاشت کپسول، درصد لنفوسيت ها در تيمار C_5 به طور معني داري کمتر از دو گروه آزمايشي ديگر بود ($P<$۰/۰۵). همچنين اختلاف معني داري در تعداد اين سلول در هفته چهارم مشاهده شد که تعداد آن در ماهيان دريافت کننده هورمون به طور معني داري از گروه شاهد کمتر بود ($P<$۰/۰۵).

درصد نوتروفيل در هفته دوم در ماهيان گروه C_5 از تيمارهاي شاهد و C_{50} به طور معني داري بيشتر بود ($P<۰/۰۵$) در حالي که در هفته چهارم اختلاف معني دار بين تيمارها C_{50} و شاهد مشاهده گرديد ($P<۰/۰۵$). درصد ائوزينوفيل در هفته اول بعد از کاشت در گروه هاي شاهد و C_{50} به طور معني داري نسبت به تيمار C_5 کمتر بود ($P<۰/۰۵$). لازم به ذکر است اختلاف معني داري در شمارش مونوسيت ها در بين تيمارها مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). ميزان هموگلوبين، هماتوکريت، تعداد گلبول هاي قرمز، نوتروفيل، لنفوسيت و مونوسيت در طول آزمايش در تيمار شاهد به صورت معني داري تغيير کرد ($P<۰/۰۵$) اما در تيمار هاي دريافت کننده کورتيزول اختلاف معني داري مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۱- روند تغييرات پارامترهاي هماتولوژي پس از کاشت هورمون کورتيزول در فيل ماهي ماده پرورشي طي چهار هفته نمونه برداري.

فاکتور خوني	تيمار هورموني	شروع	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم
هموگلوبين ($g\ dl^{-1}$)	C_0	۳/۹۲ ± ۰/۳۲^{b}	٤/۲ ± ۰/۳٦^{b}	٥/۳۷ ± ۰/۳۹^{ab}	٤/۸ ± ۰/۲۱^{ab}	٥/۸۷ ± ۰/٥۸^{a}
	C_5	۳/٦۷ ± ۰/۳۳	۳/۸٥ ± ۰/۲٥	٥/٥ ± ۰	٥/۰٥ ± ۰/۰٥	٤/۹۳ ± ۰/۳۲
	C_{50}	۳/۸۳ ± ۰/٤٤	٤/۳۳ ± ۰/۳۳	٥/٥۷ ± ۰/۷۲	٤/۲۳ ± ۰/٤۹	٥ ± ۰/۲٦
هماتوکريت (%)	C_0	۱٦/۲٥ ± ۰/٤۸^{c}	۱۷/٥ ± ۰/٦٤^{bc}	۲۳/٥ ± ۰/۹٦^{a}	۲۰/٦۷ ± ۱/۲۰^{ab}	۲۲ ± ۱/۱٥^{a}
	C_5	۱٦/۳۳ ± ۰/٦۷	۱۷ ± ۱	۲٥/٥ ± ۳/٥	۲۳/۲٥ ± ۱/۷٥	۲۱ ± ۰/۷۱
	C_{50}	۱٦ ± ۰/٥۸	۱۷/۳۳ ± ۰/۸۸	۲۳/۳۳ ± ۱/٤٥	۱۸/۱۷ ± ۲/۲٤	۲۰/۳۳ ± ۰/٦۷
لنفوسيت (%)	C_0	۸۱/٥ ± ۱/٥٥^{ab}	۷٥/۷٥ ± ۱/۱۱^{b}	۸٦ ± ۱/۲۹^{a,A}	۸۲ ± ۲/۰۸^{ab}	۸۸/۳۳ ± ۱/۲۰^{a,A}
	C_5	۸۲/٦۷ ± ۲/۰۳	۷۲ ± ۲	۸۰ ± ۲^{B}	۷٦/٥ ± ٤/٥	۷۹/۳۳ ± ٤/٦^{B}
	C_{50}	۸۰/۳۳ ± ۲/٦۱	۷۳/۳۳ ± ٥/٥٥	۸۷/٦۷ ± ۰/۳۳^{A}	۸٥ ±۲/۳	۷۹ ± ۲^{B}
نوتروفيل (%)	C_0	۱۰ ± ۱/۰٥^{c}	۱٦/٥ ± ۱/۷۱^{a}	۹/۷٥ ± ۰/۸٥^{ab,B}	۱۱/۳۳ ± ۳/٥۳^{a}	۷/۳۳ ± ۱/۲۰^{bc,B}
	C_5	۹ ± ۰/٥۸	۱٦/٥ ± ۲/٥	۱٤ ±۰^{A}	۱٥/٥ ± ۰/٥	۹/۳۳ ± ۲/٤۸^{AB}
	C_{50}	۱۰/۳۳ ± ۰/٦۷	۱۹/٦۷ ± ۲/٦	۸/٦۷ ±۰/۳۳^{B}	۱۱ ± ۲/۸۹	۱٥/۰۰ ± ۲/۰۸^{A}
ائوزينوفيل (%)	C_0	۷/٥ ± ۱/۷٦	۲/٦۷ ± ۰/۲۹^{B}	۲/۷٥ ± ۱/۱۱	٦/٦۷ ± ۱/٤٥	۳/٦۷ ± ۰/۸۸
	C_5	۷/۳ ± ۲/۹٦	۱۰ ± ۰^{A}	٤/٥ ± ۱/٥	٦/٥ ± ۳/٥	۹ ± ٦/۱٦
	C_{50}	۸ ± ۲/٥۱	۲/٦۷ ± ۰/۸۸^{B}	۲/٦۷ ± ۰/٦۷	٤ ± ۰/٥۸	۳/٦۷ ± ۰/٦۷
مونوسيت (%)	C_0	۱ ± ۰/۷۱^{ab}	۳/۲٥ ± ۱/۳۸^{a}	۱/٥ ± ۰/۲۹^{ab}	۰ ± ۰^{b}	۰/۲٥ ± ۰/۲٥^{ab}
	C_5	۱ ± ۰/٥۸	۱ ± ۰/٦	۱ ± ۰/٦	۱ ± ۰/٦	۲/۳۳ ± ۱/٤٥
	C_{50}	۱/۳ ± ۰/۸۸	٤/۳۳ ± ۲/۳۳	۱ ± ۰	۰ ± ۰	۲/۳۳ ± ۰/۸۸

* حروف A و B نشان دهنده اختلاف معني دار بين ميانگين هاي تيمارهاي مختلف است ($P<۰/۰۵$). حروف a، b و c نشان دهنده اختلاف معني دار بين ميانگين هاي يک تيمار در طول آزمايش است ($P<۰/۰۵$). ميانگين هاي داراي حداقل يک حرف مشترک در هر تيمار فاقد اختلاف معني دار هستند ($P>۰/۰۵$). داده ها به صورت ميانگين ± خطاي معيار ارائه شده اند (براي هر تيمار n= ٥).

بحث

نتايج اين مطالعه نشان داد افزايش غلظت هورمون کورتيزول در هفته اول پس از کاشت در تمامي تيمارها احتمالاً به دليل اثرات استرس ناشي از جراحي بوده است. افزايش غلظت کورتيزول در طول آزمايش در تيمار شاهد مي تواند به دليل دستکاري هاي ناشي از جراحي، بيهوشي و يا بهبود زخم باشد. غلظت هورمون کورتيزول در ماهيان C_5 تا روز بيست و هشتم روند صعودي داشت اما چنين روند صعودي در ماهيان C_{50} مشاهده نشد به طوري که غلظت کورتيزول در اين تيمار از گروه آزمايشي

C_0 کمتر بود. عدم افزایش غلظت کورتیزول در تیمار C_{50} احتمالاً به دلیل فیدبک منفي دوز بالاي این هورمون بر محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- اینتررنال مي باشد که از ترشح کورتیزول جلوگیري کرده است (Hosoya *et al*., 2007) همچنین ممکن است به دلیل سرعت پاک شدن متابولیکي این دوز از هورمون از خون و جذب آن توسط اندام هاي هدف بوده باشد (Mommsen *et al*., 1999). فاکتورهاي متعددي نظیر استرس، شوري، بلوغ، سن، گونه و وضعیت تغذیه بر سرعت پاک شدن متابولیک هورمون تاثیر مي گذارند (Mommsen *et al*., 1999; Pottinger *et al*., 2000; Dziewulska-Szwajkowska *et al*., 2003). بنابراین به نظر مي رسد که سرعت پاک شدن کورتیزول از سرم خون فیل ماهي تحت تاثیر دوز هورمون کاشته شده قرار گرفته است بطوري که با افزایش دوز، این سرعت افزایش یافته و در نتیجه کورتیزول کمتري در سرم ماهیان تیمار C_{50} اندازه گیري شد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر مي رسد که دوز بالاي کورتیزول احتمالاً از طریق کاهش حساسیت گیرنده هاي کورتیکوستروئیدي در بافت اینتررنال و یا حتي غیر فعال سازي مولکول هاي پروتئیني پیام رسان، پاسخ دهي سلول هاي بین کلیوي را به کورتیزول کاشته شده، خونگیري و بیهوشي کاهش داده است، در نتیجه غلظت این هورمون در ماهیان C_{50} نسبت به گروه شاهد و C_5 کمتر اندازه گیري گردید. مطالعات صورت گرفته روي تیلاپیا (*Oreochromis mossambicus*) و سیم دریایي (*Sparus aurata*) تاییدي بر نتیجه فوق مي باشد (Balm *et al*., 1994; Barton *et al*., 2005). این مطالعه نشان داد کاشت هورمون کورتیزول در مقادیر مختلف سبب بروز اختلافاتي در شاخص هاي خوني مي شود اما این تغییرات در کوتاه مدت عمدتاً تحت تاثیر استرس ناشي از جراحي آندوسکوپي بوده ولي پس از آن، رهش آهسته هورمون باهدف القاي استرس مزمن در ماهیان، پارامترهاي خوني را تحت تاثیر قرار داده و حتي سبب سرکوبي تولید برخي پارامترهاي خوني مرتبط با سیستم ایمني گردید.

تغییرات پارامترهاي خوني به دنبال جراحي در این ماهي، اهمیت این پارامترها خصوصاً گلبول هاي سفید را در رابطه با مقابله علیه عوامل عفوني نشان مي دهد. مطالعات بر روي ماهیان استخواني نشان داده است که پارامترهاي خوني تحت تاثیر استرس هاي حاد و مزمن قرار مي گیرند (Barton and Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). در مطالعه حاضر نیز، استرس حاد ناشي از جراحي آندوسکوپي تغییرات افزایشي را در تعداد RBC، غلظت Hb و درصد Hct باعث شد. افزایش در RBC و غلظت Hb مي تواند به تحریکات عصبي–هورموني آدرنرژیک ناشي از استرس بر اندام هاي خون ساز مخصوصاً طحال مربوط گردد که باعث انقباض آن و رهاسازي بیشتر گلبول ها به داخل خون مي گردد (Nilson *et al*., 1984; Pulsford *et al*., 1994). در بین پارامترهاي خوني، غلظت Hb و Hct به یکدیگر مرتبط هستند، به طوري که با افزایش غلظت Hb، میزان Hct نیز افزایش یافت که مي تواند به دلیل کاهش حجم پلاسما، افزایش تعداد RBC و تورم گلبول هاي قرمز باشد(Witters *et al*., 1990; Pearson and Stevens, 1991). علاوه بر این، مطالعات مختلف نشان داده است افزایش پارامترهاي هماتولوژي، پاسخ هاي ثانویه اي به استرس هاي مزمن و حاد هستند که تحت تاثیر ترشح کورتیکوستروئیدها و کتکول آمین ها مي باشند (Barton and Iwama, 1991). این امر مي تواند به دلیل افزایش ظرفیت حمل اکسیژن خون به دلیل تقاضاي بیشتر بدن به انرژي جهت حفظ هموستازي باشد (Montero *et al*., 2001). در مطالعه حاضر مشاهده شد که جراحي آندوسکوپي به عنوان یک عامل استرس زا عمل کرده است و لوکوسیتوزیز (افزایش تعداد WBC) را در ماهیان القا کرده، بطوري که یک روند افزایشي در تمامي تیمارها پس از جراحي مشاهد شد. افزایش در تعداد WBC احتمالاً به دلیل تولید و رهاسازي گلبول هاي سفید خون از طحال به منظور مبارزه با عوامل عفوني ناشي از جراحي مي باشد (Barcellos *et al*., 2004).

با وجود اينکه در اکثر زمان هاي نمونه گيري اختلاف معني داري در تعداد WBC بين تيمارها مشاهده نشد اما تعداد اين سلول ها در ماهياني که تحت تيمار کورتيزول قرار گرفته بودند به مراتب بالاتر از تيمار شاهد بود. اين روند افزايشي در تيمار C_5 بيشتر از تيمار C_{50} بوده است که به نظر مي رسد دوز بالاي کورتيزول باعث سرکوبي سيستم ايمني و کاهش پرولیفراسيون (تکثير) لوکوسيت ها مي شود و يا اينکه تعداد اين سلول ها را بيشتر در بافت تيموس و بخش قدامي کليه تحت تاثير قرار داده است. همانطور که Maule و Schreck (۱۹۹۰) با مطالعه بر روي آزاد ماهي کوهو *Oncorhynchus kisutch* بيان نمودند که کورتيزول باعث افزايش تعداد لکوسيت ها در تيموس و بخش قدامي کليه مي شود.

به تدريج با بهبود زخم از هفته سوم يک روند کاهشي در تعداد WBC مشاهده شد بطوري که تعداد اين سلول ها در هفته چهارم به سطح قبل از استرس رسيد که نشان دهنده کاهش نياز به سلول هاي مقابله کننده با عوامل عفوني و بهبود زخم مي باشد. در مطالعه حاضر ميزان لنفوسيت ها قبل از جراحي ۲/۰۶ ± ۸۱/۵ درصد در فيل ماهيان سه ساله اندازه گيري شد که مشابه ميزان لنفوسيت هاي اندازه گيري شده بر روي فيل ماهي جوان (Bahmani *et al*., 2001; Rafatnejad *et al*., 2009)، تاس ماهي ايراني *Acipenser persicus* (Bahmani *et al*., 2001; Falahatkar *et al*., 2010) و تاس ماهي سيبري *Acipenser baerii* (Palikova *et al*., 1999) در شرايط طبيعي و بدون استرس است. اما در هفته اول بعد از کاشت هورمون، کاهشي در تعداد لنفوسيت ها (لنفوپنيا) در تمامي تيمارها مشاهده شد که بازگو کننده پاسخ ماهيان به استرس ناشي از جراحي آندوسکوپي مي باشد. به تدريج، اين ميزان در هفته هاي بعدي در تيمار شاهد افزايش يافت و به سطح اوليه خود بازگشت اما به علت رهش آهسته هورمون کورتيزول در تيمارهاي دريافت کننده هورمون به داخل خون، به تدريج لنفوپنيا در هفته هاي بعدي مشاهده گرديد که رخداد آن در تيمار C_5 سريعتر ازتيمار C_{50} بود. تغييرات ميزان لنفوسيت در تيمار شاهد مشابه مطالعه Pickering و همکاران (۱۹۸۲) بر روي قزل آلاي قهوه اي *Salmo trutta*است که در آن مطالعه تعداد لنفوسيت ها بعد از استرس دستکاري به صورت معني داري افزايش يافت اما ۲۴ ساعت بعد، ميزان آن به صورت معني داري کاهش و بعد از سه روز به سطح نرمال خود برگشت. در اين مطالعه، پديده لنفوپنيا در تيمار C_5 به مراتب شديد تر از تيمار C_{50} بود که احتمالاً به ترشح زياد کورتيزول از بافت اينتررنال و بالاتر بودن غلظت کورتيزول پلاسما در اين گروه مربوط مي شود. بروز پديده لنفوپنيا تحت تاثير استرس حاد و مزمن در گروه هاي مختلفي از ماهيان نظير فيل ماهي (Falahatkar *et al*., 2009)، آزاد ماهي کوهو (Benfey and Biron, 2000)، قزل آلاي قهوه اي (Espelied *et al*., 1996)، قزل آلاي جويباري *Salvelinus fontinalis* (Benfey and Biron, 2000) و گربه ماهي *Rhamdia quelen* (Barcellos *et al*., 2004) به اثبات رسيده است. بر اساس مطالعات انجام شده، به نظر مي رسد پديده لنفوپنيا بر اساس مکانيزم هاي مختلفي نمايان مي شود که از جمله اين موارد مي توان به کاهش تکثير لنفوسيت ها، پخش مجدد لنفوسيت ها در داخل بافت هاي لنفوئيدي و از بين رفتن لنفوسيت ها در نتيجه بروز پاسخ هاي سيتولوژيک سلول ها نسبت به افزايش کورتيزول اشاره نمود (Espelid *et al*., 1996; Verburg-van Kemenade et al., 1999; Harris and Bird, 2000). آپوپتوزيس سلولي القا شده توسط کورتيزول و يا عوامل استرس زا، از مکانيزم هايي است که در تنظيم و کارکرد سيستم ايمني موثر بوده و با کاهش لنفوسيت ها نقش مهمي در حفظ نسبتاً ثابت ذخيره لنفوئيدي در سراسر بدن ايفا مي نمايد (Weyts *et al*., 1997; Verburg-van Kemenade *et al*., 1999). کورتيزول با اتصال به گيرنده هاي خود در لنفوسيت ها اثرات خود را اعمال کرده و آپوپتوزيس را در اين سلول ها القا مي بخشد (Weyts *et al*., 1998a). به دنبال کاهش در تعداد لنفوسيت ها، پديده نوتروفيلا (افزايش در تعداد نوتروفيل) در تيمارها مشاهده شد بطوري که استرس ناشي از رهش

آهسته کورتيزول، به افزايش تعداد نوتروفيل ها در تمامي تيمارها در هفته اول منجر شد و به تدريج ميزان آن در تيمار شاهد کاهش يافت اما در تيمارهاي دريافت کننده کورتيزول همچنان روند افزايشي داشت. افزايش نوتروفيل ها مي تواند به نقش آنها در بروز پاسخ هاي التهابي و تجمع آن ها در نواحي آسيب ديده مربوط باشد.

بنابراين افزايش نوتروفيل ها در هفته اول بعد از جراحي آندوسکوپي احتمالا مربوط به نقش اين سلول ها در سيستم ايمني و التيام زخم مي باشد. به علاوه، از دلايل افزايش نوتروفيل در ماهيان دريافت کننده کورتيزول مي توان به اثر گلوکوکورتيکوئيدها بر افزايش مدت زمان بقاي نوتروفيل ها و کاهش آپوپتوزيس در آنها اشاره کرد (Weyts *et al*., 1998b). در مطالعه اي که بر روي گربه ماهي کانالي انجام شد مشاهده گرديد ۱۸ ساعت بعد از تزريق داخل وريدي کورتيزول، در اين ماهيان نيز پديده لنفوپنيا و نوتروفيلا مشاهده شد (Ellsaesser and Clem, 1987). در مطالعه حاضر، افزايشي در ميزان ائوزينوفيل ها به جز تيمار C_5 مشاهده نشد که مشابه مشاهدات Wagner و همکاران (۱۹۹۹) بر روي قزل آلاي رنگين کمان جراحي شده بود. افزايش ميزان ائوزينوفيل در تيمار C_5 احتمالا به غلظت بالاي کورتيزول در اين تيمار مربوط مي شود. بنابراين به نظر مي رسد که تعداد آن ها وابسته به سطوح هورموني باشد. در مطالعه حاضر اگرچه در هفته اول بعد از جراحي و کاشت هورمون، ميزان مونوسيت ها در تمامي تيمارها به جز C_5 افزايش يافت اما اختلاف مشاهده شده در خصوص اين نوع از گلبول سفيد معني دار نبود. با اين وجود، عدم افزايش در تيمار C_5 احتمالاً به دليل غلظت بالاي کورتيزول خون بوده است که باعث مونوسيتوپنيا در مقايسه با گروه شاهد و C_{50} شده است.

نتيجه گيري

اين مطالعه نشان داد استرس مزمن ناشي از رهش آهسته هورمون کورتيزول بعد از جراحي آندوسکوپي بر روي پارامترهاي فيزيولوژيک و هماتولوژيک خصوصاً موارد مرتبط با سيستم ايمني ماهي اثر گذار است بطوري که بيشترين تاثير آن در ماهيان C_5 مشاهده شد. به نظر مي رسد علي رغم پاسخ هاي استرسي محدودتر ماهيان خاوياري نسبت به ماهيان استخواني، اين ماهيان نيز به لحاظ فيزيولوژيک تحت تاثير استرس هاي مختلف قرار مي گيرند. بنابراين توصيه مي گردد پس از تعيين جنسيت، ماهيان تحت مراقبت هاي ويژه اي نظير تغذيه با جيره هاي خاص، نگهداري در شرايط مطلوب و با حداقل استرس و دستکاري قرار گيرند. مطالعات آتي در خصوص اندازه گيري ساير شاخص هاي مرتبط، همچنين تعيين کميت و کيفيت بيان ژن هاي درگير در اين سيستم، يافته هاي جديدي را آشکار خواهد ساخت.

تشکر و قدرداني

از مسئولان و کارکنان مزرعه پرورش ماهيان خاوياري مروارید قروق تالش و مساعدت فراوان آقاي مهندس محمد حسين طلوعي (از اداره کل شيلات گيلان) در اجراي اين پروژه تشکر مي گردد. از رهنمودهاي ارزشمند پروفسور Serge Doroshov (از دانشگاه Davis کاليفرنيا) سپاسگزاري مي شود. همچنين از همکاري آقاي مهندس رعناي اخوان در تمامي مراحل اجرايي پروژه قدرداني مي گردد. از مساعدت آزمايشگاه دکتر آشتياني که در آناليز نمونه هاي خون ما را ياري رساندند تشکر مي گردد. هزينه هاي مربوط به اين طرح تحقيقاتي توسط صندوق پژوهشگران کشور(به شماره طرح ۸۹۰۰۰۹۰۳) تامين گرديده است. لذا از همکاري اين سازمان نيز تشکر و قدرداني مي گردد.

References

- Bahmani, M., Kazemi, R., Donskaya, P., 2001. A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). Fish Physiology and Biochemistry 24, 135-140.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Souza, C., Rodrigues, L.B., Fioreze, L., Quevedo, R.M., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Lacerda, L.A., Terra, S., 2004. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. Aquaculture 237, 229-236.
- Barreto, R.E., Volpato, G.L., Pottinger, T.G., 2006. The effect of elevated blood cortisol levels on the extinction of a conditioned stress response in rainbow trout. Hormones and Behavior 50, 484-488.
- Barry, T.P., Lapp, A.F., Kayes, T.B., Malison, J.A., 1993. Validation of an ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout and lake trout. Aquaculture 117, 351-363.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticostreroids. Integrative and Comparative Biology 42, 517-525.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annuual Review of Fish Diseases 10, 3-26.
- Barton, B.A., Bollig, H., Hauskins, B.L., Jansen, C.R., 2000. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albus*) and hybrid pallid × shovelnose (*S. albus* × *platornychus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. Comparative Biochemistry and Physiology 126, 125-134.
- Barton, B.A., Ribas, L., Acerete, L., Tort, L., 2005. Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. Aquaculture Research 36, 172-179.
- Barton, B.A., Rahn, A.B., Feist, G., Bollig, H., Schreck, C.B., 1998. Physiological stress responses of the freshwater chondrostean paddlefish (*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. Comparative Biochemistry and Physiology 120, 355-363.
- Benfey, T.J., Biron, M., 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Aquaculture 184, 167–176.
- Bronzi, P., Ceapa, C., Chebanov, M.S., Gessner, J., Kolman, R., Pourkazemi, M., Rosenthal, H., Williot, P., 2009. World sturgeon aquaculture, an overview. 6th International Symposium on Sturgeon, October 25-30, Wuhan, China.
- Chen, W., Sun, L., Tsai, C., Song, Y., Chang, C., 2002. Cold-stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in tilapia. General and Comparative Endocrinology 126, 90-100.
- Conte, F.S., Doroshov, S.I., Lutes, P.B., Strange, E.M., 1988. Hatchery manual for the white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson) with application to other north American Acipenseridae. University of California Cooperative Extension Service Publication 3322, Oakland, California.
- Dziewulska-Szwajkowsk, D., Łozińska-Gabska, M., Adamowicz, A., Wojtaszek, J., Dzugaj, A., 2003. The effect of high dose of cortisol on glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase activity, and glucose and fructose-2, 6-bisphosphate concentration in carp tissues (*Cyprinus carpio* L.). Comparative Biochemistry and Physiology 135B, 485-491.
- Ellsaesser, C.F., Clem, L.W., 1987. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. Journal of Fish Biology 28, 511-521.
- Espelid, S., Løkken, G.B., Steiro, K., Bøgwald, J., 1996. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). Fish and Shellfish Immunology 6, 95-110.
- FAO. 2010. Yearbooks of fishery statistics. Downloaded from www.fao.org on Aug 27, 2012.
- Falahatkar, B., Tolouei, M.H., Falahatkar, S., Abbasalizadeh, A., 2011. Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured dgreat sturgeon *Huso huso*. Aquaculture 321, 273-279.
- Falahatkar, B., Poursaeid, S., Shakoorian, M., Barton, B., 2009. Responses to handling and confinement stressors in juvenile great sturgeon *Huso huso*. Journal of Fish Biology 75, 784-796.
- Falahatkar, B., Poursaeid, S., Efatpanah, I., Meknatkhah, B., 2010. Effect of photoperiod on growth, physiological and hematological indices in Persian sturgeon *Acipenser persicus*. Aquaculture America, March 3-5, San Diego, California.
- Falahatkar, B., 2010. Primary and secondary stress responses of great sturgeon following gonad biopsy. Aquaculture Europe, October 5-8, Porto, Portugal.

- Harris, J., Bird, D.J., 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. Veterinary Immunology and Immunopathology 77, 163-176.
- Harris, P.D., Soleng, A., Bakke, T.A., 2000. Increased susceptibility of salmonids to the monogenean *Gyrodactylus salaris* following administration of hydrocortisone acetate. Parasitology 120, 57-64.
- Hosoya, S., Johnson, S.C., Iwama, G.K., Gamperl, A.K., Afonso, L.O.B., 2007. Changes in free and total plasma cortisol levels in juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) exposed to long-term handling stress. Comparative Biochemistry and Physiology 146A, 78-86.
- Hou, Y.Y., Suzuki, Y., Aida, K., 1999. Effects of steroid hormones on immunoglobulin M (IgM) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Physiology and Biochemistry 20, 155-162.
- Houston, A.H., 1990. Blood and circulation. In *Methods for Fish Biology.* Schreck C.B., Moyle, P.B. (eds). Bethesda, MD: American Fisheries Society, 273-334.
- Hurvitz, A., Jackson, K., Degani, G., Levavi-Sivan, B., 2007. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. Aquaculture 270, 158-166.
- IUCN. 2010. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org. Downloaded on 20 July 2010.
Kehlet, H.M.D., 1999. Surgical stress response: Does endoscopic surgery confer an advantage? World Journal of Surgery 23, 801-807.
- Martin, G.B., Oldham, C.M., Lindsay, D.R., 1981. Effect of stress due to laparoscopy on plasma cortisol levels, the preovulatory surge of LH, and ovulation in the ewe. Theriogenology 16, 39-44.
- Maule, A.G., Schreck, C.B., 1990. Modulation of the fish immune system by hormones. Journal of Aquatic Animal Health 2, 298-304.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries 9, 211-268.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. Fish Physiology and Biochemistry 20, 53-60.
- Morgado, I., Santos, C.R.A., Jacintoa, R., Power, D.M., 2007. Regulation of transthyretin by thyroid hormones in fish. General and Comparative Endocrinology 152, 189-197.
Nilson, S., Grove, D.J.I., 1984. Adrenergic and cholinergic innervations of the spleen of the cod (*Gadus morhua*). European Journal of Pharmacology 28, 135-138.
- Padgett, D.A., Marucha, P.T., Sheridan, J.F., 1998. Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. Brain, Behavior, and Immunity 12, 64-73.
- Palikova, M., Mares, J., Jirasek, J., 1999. Characteristics of leucocytes and thrombocytes of selected sturgeon species from intensive breeding. Acta Veterinaria Brno 68, 259-264.
- Pankhurst, N.W., Van Der Kraak, G., 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish. In: Fish stress and health in aquaculture. Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B., (eds). Cambridge, Cambridge University Press. 73-93.
- Pearson, M.P., Stevens, E.D., 1991. Size and hematological impact of the splenic erythrocyte reservoir in rainbow trout, *Onchorynchus mykiss*. Fish Physiology and Biochemistry 9, 39-50.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Christie, P., 1982. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time course study. Journal of Fish Biology 20, 229-244.
- Pottinger, T.G., Carrick, T.R., Appleby, A., Yeomans, W.E., 2000. High blood cortisol levels and low cortisol receptor affinity: Is the chub, *Leuciscus cephalus*, a cortisol-resistant teleost? Geneneral and Comparative Endocrinology 120, 108-117.
- Pulsford, A.L., Lemaire-Gony, S., Tomlinson, M., Collingwood, N., Glynn, P.J. 1994. Effects of acute stress on the immune system of the dab, *Limanda limanda*. Comparative Biochemistry and Physiology 109, 129-139.
- Quinn, G., Keough, M., 2002. Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge University Press, Cambridge, 305-309.
- Rafatnezhad, S., Falahatkar, B., Tolouei, M.H. 2008. Effects of stocking density on hematological, growth indices and fin erosion of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. Aquaculture Research 39, 1506-1513.
- Řehulka, J., 2000. Influence of astaxanthin on growth rate condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 190, 27–47.

- Rey Vazquez, G., Guerrero, G.A., 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Tissue and Cell 39, 151–160.
- Sheridan, J.F., Padgett, D.A., Avitsur, R., Marucha, P.T., 2004. Experimental models of stress and wound healing. World Journal of Surgery 28. 327-330.
- Trudeau, V.L., Peter, R.E., Sloley, B.D., 1991. Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin- releasing hormone in goldfish. Biology and Reproduction 44, 951-960.
- Verburg-van Kemenade, B.M.L., Nowak, B., Engelsma, M.Y., Weyts, F.A.A., 1999. Differential effects of cortisol on apoptosis and proliferation of carp B-lymphocytes from head kidney, spleen and blood. Fish and Shellfish Immunology 9, 405-415.
- Vijayan, M.M., Flett, P.A., Leatherland, J.F., 1988. Effect of cortisol on the in vitro hepatic conversion of thyroxine to triiodothyronine in brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). General and Comparative Endocrinology 70, 312-318.
- Wagner, G.N., Stevens, E.D., Harvey-Clark, C., 1999. Wound healing in rainbow trout following surgical site preparation with a povidone–iodine antiseptic. Journal of Aquatic Animal Health 11, 373-382.
- Webb, M.A.H., Allert, J.A., Kappenman, K.M., Marcos, J., Feist, G.W., Schreck, C.B., Shackleton, C.H., 2007. Identification of plasma glucocorticoids in pallid sturgeon in response to stress. General and Comparative Endocrinology 154, 98-104.
- Wedemeyer, G.A., Gould, R.W., Yasutake, W.T., 1983. Some potentials and limits of the leucocrit test as a fish health assessment method. Journal of Fish Biology 23, 711-716.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. Physiological Reviews 77, 591-625.
- Weyts, F.A.A., Verburg-van Kemenade, B.M.L., Flik, G., Lambert, J.G.D., Wendelaar Bonga, S.E., 1997. Conservation of apoptosis as an immune regulatory mechanism: effects of cortisol and cortisone on carp lymphocytes. Brain, Behavior, and Immunity 11, 95-105.
- Weyts, F.A.A., Verburg-van Kemenade, B.M.L., Flik, G., 1998a. Characterisation of corticoid receptors in peripheral blood leukocytes of carp, *Cyprinus carpio* L. General and Comparative Endocrinology 111, 1-8.
- Weyts, F.A.A., Flik, G., Rombout, J.H.W.M., Verburg-van Kemenade, B.M.L., 1998b. Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. Developmental and Comparative Immunology 22, 563-572.
- Wildhaber, M.L., Papoulias, D.M., DeLonay, A.J., Tillitt, D.E., Bryan, J.L., Annis, M.L., 2007. Physical and hormonal examination of Missouri River shovelnose sturgeon reproductive stage: a reference guide. Journal of Applied Ichthyology 23, 382-401.
- Wildhaber, M.L., Papoulias, D.M., DeLonay, A.J., Tillitt, D.E., Bryan, J.L., Annis, M.L., Allert, J.A., 2005. Gender identification of shovelnose sturgeon using ultrasonic and endoscopic imagery and the application of the method to the pallid sturgeon. Journal of Fish Biology 67, 114-132.
- Witters, H.E., Van Puymbroeck, S., Van Den Sande, I., Vanderborght, O.L.J., 1990. Haematological disturbances and osmotic shifts in rainbow trout, *Onchorynchus mykiss* (Walbaum) under acid and aluminum exposure. Journal of Comparative Physiology 160, 563-571.
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical Analysis, 4th edn. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall.
- Zou, J.J., Trudeau, V.L., Cui, Z., Brechin, J., Mackenzie, K., Zhu, Z., Houlihan, D.F., Peter, R.E., 1997. Estradiol stimulates growth hormone production in female goldfish. General and Comparative Endocrinology 106, 102-112.

Physiological Responses in Cultured Great Sturgeon, *Huso huso*, Implanted by Cortisol Following Endoscopic Surgery

S. Poursaeid[1], B. Falahatkar*[1], B. Mojazi Amiri[2] and G. Van Der Kraak[3]
[1] Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, I.R. Iran
[2]Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. Iran
[3] Department of Integrative Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada
(Received: 10/04/2011 , Accepted: 09/01/2012)

Abstract
This study examined the effects of implanted cortisol (to imitate chronic stress) on the hematological responses and cortisol values of female great sturgeon, *Huso huso*, after an endoscopic operation. At the beginning of experiment, all the fish were examined using an endoscope to evaluate gonad development. Then, in order to mimic chronic stress following surgery, capsules of cocoa?? butter containing cortisol were intraperitoneally implanted to 3-year-old female fish in reproductive II stage (mean body weight 6759 ± 53.23 g). The implant doses were 0 (C_0; as control), 5 (C_5) and 50 mg cortisol /kg BW and there were five fish per treatment group. Blood samples were taken every week during the 28 days of the experiment to evaluate hematological responses and blood cortisol concentration. There were no significant changes in serum cortisol in C_{50} group during the experimental period, but an upward and significant trend in serum cortisol was observed in C_5 group. Also, cortisol levels in C_5 group were significantly higher than those of the control and C_{50} groups from second week after endoscopic surgery and implantation onwards. White blood cells increased after endoscopic procedure, but the response was lower in control fish than those receiving cortisol. Hemoglobin and hematocrit did not change with treatment or time. Significant differences were observed in the percentage of lymphocyte and neutrophil cells in the second and fourth weeks after implantation, so that lymphopenia and neutrophilia were observed following cortisol implantation. The present study revealed that exposing fish to chronic stressors after an endoscopic operation decreased the immune response and had an immunosuppressive effect. Also, these results suggest that great sturgeon exhibit a low response to slow release of cortisol compared to teleostean fishes.

Keywords: Chronic stress, Endoscopy, Blood cells, Cortisol, Great sturgeon (*Huso huso*)

*Corresponding author: Tel: +981823223599 Fax: +981823223600 E-mail: falahatkar@guilan.ac.ir