Archive of SID

مجله علمی شیلات ایران (DOI): 10.22092/ISFJ.2019.118093 سال بیست و هفت/ شماره ٦

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118093]

Downloaded from isfj.ir at 15:22 +0330 on Saturday February 23rd 2019

مقایسه تغییرات غلظت گلوکز خون در مولدین قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) قبل و بعد از خوراک دهی

محمدسعید گنجور[1*]، علیرضا قائدی[1]، ابوالحسن راستیان نسب[1]، محمد میثم صلاحی اردکانی[1]، سیدعبدالحمید حسینی[1]، عیسی فلاحت[1]

[*]ms.ganjoor@ifro.ir

۱-مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران.

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۷

لغات کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، گلوکز، سرم

برای بررسی سلامت و شرایط فیزیولوژیک یک ماهی، ابزارهای محدودی وجود دارد. یکی از این ابزارها، تجزیه اجزاء اصلی خون مثل قند خون است که تاثیر عواملی چون محیط، تغذیه، استرس و آلاینده ها را بر ماهی آشکار می‌سازد (Yousefian *et al*., 2011). گرچه قزل آلا یک ماهی گوشتخوار است، اما وجود مقادیر اندک کربوهیدرات در جیره غذایی او جهت فعالیت‌های متابولیسمی آن ضروری است. در هر حال اطلاعات کمی در خصوص مکانیسم های کنترل کننده هموستاز گلوکز در قزل آلا وجود دارد (Caamano *et al*., 2010).

تشخیص کمی و کیفی گلوکز در خون نقش مهمی در تشخیص و مدیریت بیماری های متابولیسمی و همچنین تحقیقات بیوشیمیایی دارد. گلوکز فراوانترین کربوهیدرات جریان خون و اصلی ترین سوخت و منبع انرژی برای بافت‌هاست. بنابراین، غلظت گلوکز خون تحت تاثیر عوامل متعددی است. پس از مصرف کربوهیدرات ها و جذب گلوکز توسط روده، سطح گلوکز خون بطور موقت افزایش می یابد. در پستانداران، آنزیم کبدی گلوکوکیناز بسرعت مقادیر اضافی گلوکز را از سیاهرگ باب کبدی از بین می‌برد و مقادیر گلوکز را در حد متوسط ۱۰ میلی مولار بر لیتر نگه می‌دارد. کبد اصلی ترین اندام در تنظیم مقادیر قند خون طی مرحله تغذیه و فستینگ (دوره عدم تغذیه– زمان بین دو وعده خوراک) است. علاوه بر فرآیندهای متابولیک، هورمون‌های متعددی شامل انسولین، گلوکاگون، هورمون رشد، کورتیزول، آدرنالین و نورآدرنالین بر هموستاز گلوکز موثر هستند (Burrin and Price, 1985). با توجه به نکات مهم مذکور، مهم است تا تحقیقی، برای پاسخ به چند سوال اجرا شود. آیا گلوکز خون ماهی بروش مورد استفاده برای انسان (کیت) قابل اندازه گیری است؟ غلظت گلوکز خون ماهی چقدر است؟ آیا سطح غلظت خون ماهی قبل و پس از تغذیه متفاوت است؟

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118093]
Downloaded from isfj.ir at 15:22 +0330 on Saturday February 23rd 2019

در این تحقیق، از مولدین پرورشی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مرکز تحقیقات ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج استفاده شد. منبع تامین آب مرکز یاسوج چشمه بود که در فاصله ۵۰۰ متری از مرکز قرار داشت و دارای آب با دمای ۱۲-۸ درجه سانتی‌گراد و اکسیژن ۸-۵ میلی‌گرم می‌باشد. از گله موجود که جمعیتی بالغ بر ۱۰۰۰ ماهی بود، ۲۰ مولد (مولدین ۳ ساله با میانگین وزنی ۱۷۰۰ گرم) به صورت تصادفی نمونه‌برداری و در آزمایشگاه مرکز مذکور مورد آزمایش قرار گرفتند. ۱۰ مولد قبل از خوارک دهی (ناشتا) و ۱۰ مولد ۲ ساعت بعد از خوراک دهی (۱ درصد وزن بدن با خوراک BFT) آزمایش شدند. خوراک و جیره غذایی مورد استفاده مطابق توصیه شرکت خوراک کیمیاگران-شهرکرد بود. نیمی از مولد ها نر و بقیه ماده بودند. مولدین با استفاده از پودر گل میخک (۳۵ گرم در ۲۰ لیتر آب) بیهوش شدند. این فرآیند تقریباً ۵ دقیقه زمان برد سپس بلافاصله خونگیری انجام شد.

جهت اندازه گیری قند از کیت اندازه گیری قند خون یعنی کیت گلوکز (به روش Colorimetric, End point, GOD-PAP Stable Liquid) ساخت شرکت من (تهران- ایران ; www.mancompany.com) تحت لیسانس ELITech Group به شماره سفارش ۶۱۳۰۰۳ استفاده شد. این کیت به روش آنزیمی (گلوکز اکسیداز) میزان گلوکز را اندازه گیری نمود. بدین منظور طبق بروشور موجود در کیت عمل شد. اما، تغییر جزئی در روش کار داده شد. طبق بروشور مواد واکنش دهنده به حجم ۳۰۰ میکرولیتر می‌رسید در حالی که کوت اسپکتوفتومتر ۲ میلی لیتر حجم داشت. لذا جهت انجام آزمایشات کلیه اجزاء واکنش دهنده به تناسب افزایش داده شد. به نحوی که مواد واکنش دهنده به حجم ۲۰۰۰ میکرولیتر رسید تا قابل کار با اسپکتوفتومتر شود. بنابراین، تغییرات بسیار مختصری در روش کار با کیت ها داده شد که بدین شرح است. جهت اندازه گیری قند خون میزان سرم، محلول استاندارد، آب مقطر و معرف بترتیب ۲۰، ۲۰، ۲۰ میکرولیتر و ۲ میلی لیتر بکار رفت.

از نمونه کنترل نرمال Human assay chemistry (control normal – Level 1) ساخت شرکت Biorexfars® (شیراز- ایران) بعنوان "سرم شاهد" استفاده شد. این ماده بصورت پودر لیوفیلیزه است که پس از تهیه بایستی رقت قند آن ۹۶-۷۰ میلی گرم در دسی لیتر خوانده شود. در غیر این صورت ایرادی در آزمون ها وجود خواهد داشت مثل کالیبره نبودن اسپکتوفتومتر یا نامناسب بودن کیت مذکور برای ماهی. همچنین، از سرم کالیبراسیون بایورکس (Calibration Serum) ساخت شرکت Biorexfars® (شیراز- ایران) بعنوان کالیبراتور بهره گرفته شد. این سرم بصورت لیوفیلیزه بود و از محلول آن بعنوان محلول استاندارد استفاده شد. محلول استاندارد در محاسبات عددی کیت ها و فرمول ها بکار می رفت. از دستگاه اسپکتوفتومتر Beckman® مدل DU520 که از نوع UV-Visible Spectophotometer بود جهت قرائت نمونه ها استفاده شد. سایر تجهیزات مورد استفاده عبارت بودند از: سانتریفیوژ یخچال دار Eppendorf مدل ۳۱۱۵ ساخت کشور آلمان و دستگاه حمام آب گرم با نام تجاری Memmert تیپ WNB14 ساخت کشور آلمان. سایر مواد لازم عبارت بود از: سرنگ ۲ و ۵ سی سی، دستکش لاتکس جراحی، سمپلر و سر سمپلر، پودر گل میخک جهت بیهوشی ماهی (۱۰۰-۵۰ گرم در ۲۰ لیتر آب)، دستمال کاغذی، آب مقطر، تیغ جراحی.

روش خونگیری:

به کمک سرنگ از سیاهرگ ساقه دمی خونگیری شد. بدین منظور سر سوزن سرنگ با زاویه ۴۵ درجه و با فاصله یک سانتی باله شکمی وارد بدن ماهی شد.

روش تهیه سرم:

خون گرفته شده از ماهی بلافاصله در میکروتیوب درب دار ریخته شد و پس از انعقاد به مدت ۱۰-۵ دقیقه در سانتریفوژ با دور ۵-۳ هزار دور رسوب داده شد و سپس به کمک سمپلر، سرم رویی از گلبولهای رسوب یافته جدا گردید و در تیوب مستقلی ریخته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118093]
Downloaded from isfj.ir at 15:22 +0330 on Saturday February 23rd 2019

تجزیه و تحلیل داده ها:

مقایسه قند خون دو گروه مولد (ناشتا و تغذیه شده) با استفاده از روش t-test با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

نتیجه نخست آنکه کیت مذکور برای اندازه گیری قند خون ماهی مناسب بود چرا که دستگاه اسپکتوفتومتر اعداد قابل قرائت و تقریباً هم دامنه را نشان داد. در ضمن، صحت این کار به کمک محلول کنترل نرمال و سرم کالیبراسیون بایورکس تایید شد. دوم، نتایج حاصل از بررسی غلظت قند خون ماهی ها بود که در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. غلظت قند خون مولدین

Table 1: Sugar concentration in blood of broodstocks.

تیماراول		تیمار دوم	
غلظت قند خون مولدین قبل خوراک دهی (ناشتا).		غلظت قند خون مولدین تغذیه شده	
میانگین غلظت گلوکز	* ۹۲/۲ ± ۱۴	میانگین غلظت گلوکز	۱۸۹/۲ ± ۱۷/۲

* میانگین ± انحراف معیار.

میانگین غلظت قند خون ماهی ها قبل و بعد خوراک ۹۷ میلی گرم بر دسی لیتر تفاوت داشت، که این تفاوت فاحش و تقریباً دو برابر بود. حداکثر غلظت قند خون ناشتا (۱۰۶ میلی گرم در دسی لیتر) از حداقل غلظت قند خون ماهی ها بعد از خوراک (۱۶۷ میلی گرم در دسی لیتر)، کمتر بود. آنالیز آماری به کمک نرم افزار SPSS نشان داد که میانگین قند خون تیمار اول (ماهیان ناشتا) ۹۲/۲ میلی‌گرم بر دسی لیتر و انحراف معیار آن ۱۴/۰۰ بوده است در حالی که میانگین قند خون تیمار دوم (ماهیان تغذیه شده) ۱۸۹/۲ میلی‌گرم بر دسی لیتر و انحراف معیار آن ۱۷/۲۱ بوده است. بر اساس آزمون لوین مشخص شد واریانس های دو تیمار (Sig=0.646) با هم برابر بوده است. نهایتاً آنکه نتیجه آزمون-تی معین نمود که میانگین غلظت قند خون در دو تیمار تفاوت معناداری ($p<۰/۰۵$) با هم دارند و از آنجایی که حد بالا و پایین دو تیمار منفی بود، تایید گردید که میانگین قند خون گروه دوم از گروه اول بیشتر بوده است.

در این مطالعه که بر روی مولدین قزل آلای رنگین کمان پرورش یافته در استخرهای بتنی در استان کهگیلویه و بویر احمد انجام شد میانگین گلوکز خون، قبل و بعد خوراک دهی بترتیب ۹۲/۲ و ۱۸۹/۲ بود که تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند. این در حالی است که تحقیق انجام شده در استان خوزستان مقدار گلوکز خون قزل آلای پرورشی در استخرهای خاکی ۱۲۹-۶۳ میلی گرم (کمینه ۲۹ و بیشینه ۱۶۵) گزارش شده است (خواجه و پیغان، ۱۳۸۶) که داده های این دو تحقیق نزدیک به یکدیگرند، البته در مطالعه حاضر صرف نظر از شرایط وزنی و سنی تفاوت و شباهتهایی در تحقیق وجود داشت، مثل تفاوت در منطقه جغرافیایی و حتی نوع استخرها. با توجه به تحقیقات متعدد انجام شده بر قند خون قزل آلای رنگین کمان، مشخص است که سن و وزن ماهی مستقیماً بر رقت قند خون ماهی تاثیر دارند (محمدنژاد، ۱۳۹۳؛ خواجه و پیغان، ۱۳۸۶). برای مثال، در تحقیق محمدنژاد برای ماهیان ۵-۱۰، ۵۰-۱۰۰، ۳۰۰-۵۰۰ و ۶۰۰-۸۰۰ گرم بترتیب (گرد شده) ۱۲۳، ۸۴، ۶۳ و ۳۵ میلی گرم بر دسی لیتر قید شده است. همچنین در تحقیق خواجه و پیغان، میانگین میزان قند خون برای ماهیان ۲۰، ۶۰، ۷۱، ۷۶، ۴۰، ۶۰، ۹۱ و ۱۱۰ روز (سن) بترتیب (گرد شده و از حد بالا و پایین صرفنظر شده است) ۶۳، ۱۱۰، ۱۰۴، ۹۲، ۱۱۷، ۱۰۴، ۱۲۹، ۸۸ و ۱۰۴ گزارش شده است.

تحقیق حاضر بیانگر آن است که در ماهی قزل آلا همچون جانوران خون گرم، میزان غلظت گلوکز خون تحت تاثیر عامل محیطی مخصوصاً تغذیه قرار می گیرد و دچار تغییر می گردد. این نتیجه توسط زعفریان و همکارانش (۱۳۹۵) ارائه شده آنها اظهار نمودند گرسنگی دو هفته ای در بچه ماهی آزاد دریای خزر سبب کاهش ۲۰ درصدی در غلظت قند خون می شود. تغذیه نقش بسیار مهمی بر رقت قند خون دارد و می تواند مقادیر آنرا تا دو برابر افزایش دهد. بنابراین مهم است که مشخص شود چه مدت پس از تغذیه ماهی، خونگیری و آزمایش قند انجام شده است. در

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118093]

Downloaded from isfj.ir at 15:22 +0330 on Saturday February 23rd 2019

مقالات شیلاتی دیده شده است که به ناشتا بودن یا نبودن ماهی ها اشاره نشده است. توصیه مهم آنکه، در پژوهش هایی که میزان گلوکز خون سنجش می شوند، حتماً زمان تغذیه و فاصله زمانی بین تغذیه و آزمایش قند قید شود. شاید یکی از دلایلی که سبب شده است تا محققان مختلف میزان غلظت گلوکز خون را متفاوت گزارش کنند، وضعیت ناشتا و یا تغذیه شدن ماهی بوده باشد. پیشنهاد می گردد برای یکسان سازی "آزمایش قند خون" در قزل آلا و استاندارد بودن تحقیقات، آزمایش قند خون در ماهی یا ترجیحاً ۸ ساعت بعد از آخرین خوراک دهی (در وضعیت ناشتا) و یا ۲ ساعت بعد از خوراک دهی (در حالت حداکثر غلظت قند خون) انجام شود و این مهم در تحقیقات رعایت و در مقالات قید شود.

یکی از تلاش هایی که در زمینه تغذیه ماهیان انجام می شود افزایش سهم کربوهیدرات در جیره غذایی آنهاست. اما این تلاش برای برخی از ماهیان مثل قزل آلای رنگین کمان سبب عارضه ای به نام "مقاوت به گلوکز" می شود (Polakof, 2011; Moon, 2001; Wilson, 1994). در این عارضه، پس از مصرف طولانی جیره با کربوهیدرات فراوان میزان قند خون ماهی برای طولانی مدت بالا می ماند. به عبارت علمی تر، هیپرگلیسمی رخ میدهد (Bergot, 1979; Palmer and Ryman, 1972). امروزه سعی می شود جیره های ارزان اما مفید برای قزل آلا طراحی شود. یکی از نکات قابل توجه تحقیق فعلی این است که به کمک اندازه گیری گلوکز خون، می‌توان روند تغییرات گلوکز خون ماهی را ارزیابی نمود. همانگونه که در این تحقیق آمده است، مقدار قند خون پس از تغذیه ماهیان تفاوت زیادی را نمایان ساخت. بنابراین، پیشنهاد می‌شود از این روش برای پایش کیفی انواع جیره غذایی بهره گیری شود. به کمک این روش می توان اثر جیره غذایی بر افزایش قند در طولانی مدت را بررسی نمود و در صورت بروز هیپرگلیسمی، آنرا تشخیص داد.

منابع

خواجه، غ.ح. و پیغان، ر.، ۱۳۸۶. بررسی برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورش یافته در استخرهای خاکی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۲۶۲(، شماره ۳۳)،: صفحات ۱۹۷-۲۰۳.

زعفریان، آ.، یگانه، س.، اورجی، ح. و خلیلی، خ.، ۱۳۹۵. بررسی اثرات گرسنگی و تغذیه مجدد بر روی متغیرهای خونی، سرمی و تجزیه تقریبی بدن بچه ماهی آزاد دریای خزر (Salmo trutta caspius). مجله علمی شیلات ایران، ۲۵(۱):۱۶۱-۱۷۴. DOI: ISFJ.2017.110231/۱۰,۲۲۰۹۲.

محمدنژاد شموشکی، م.، ۱۳۹۳. بررسی مقایسه ای برخی از پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل آلای رنگین کمان در اندازه های مختلف. مجله علمی پژوهشی زیست شناسی دریا، دانشگاه آزاد اهواز، سال ۶۶(۲۳): شماره ۲۳، صفحات ۳۹-۴۷.

Bergot, F., 1979. Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Comparative Biochemistry and Physiology, part A 64: 543–547.

Burrin, J.M. and Price, C.P., 1985. Measurement of blood glucose. Annals of Clinical Biochemistry, 22: 327-342. DOI: 10.1177/000456328502200401.

Caamano, R.I., Perez-Maceria, J. and Aldegunde, M., 2010. Homeostasis of glucose in the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum): the role of serotonin. The Journal of Experimental Biology, 213: 1813-1821. DOI: 10.1242/jeb.035444.

Moon, T.W., 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? Comparative

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118093]

Downloaded from isfj.ir at 15:22 +0330 on Saturday February 23rd 2019

Biochemistry and Physiology, part B 129: 243–249. DOI: 10.1016/S1096-4959(01)00316-5.

Palmer, T.N. and Ryman, B.E., 1972. Studies on oral glucose intolerance in fish. Journal of Fish Biology 4: 311–319. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1972.tb05680.x.

Polakof, S., Moon, T.W., Aguirre, P., Skiba-Cassy, S. and Panserat. S., 2011. Glucose homeostasis in rainbow trout fed a high-carbohydrate diet: metformin and insulin interact in a tissue-dependent manner. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 300: 166–174. DOI: doi10.1152/ajpregu.00619.2010.

Wilson, R.P., 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. Aquaculture, 124: 67–80. DOI: 10.1016/0044-8486(94)90363-8.

Yousefian, M., Sheikholeslami, A.M. and Dawood, K., 2011. Serum biochemical parameter of Male, Immature and female Persian Sturgeon (*Acipencer persicus*). Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(5): 476-481.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118093]

Downloaded from isfj.ir at 15:22 +0330 on Saturday February 23rd 2019

Comparison blood glucose assay of rainbow trout broodstocks (*Oncorhynchus mykiss*) before and after feeding

Ganjoor M.S.[1*], Ghaedi A.[1], Rastian-nassab A.[1], Salahiardekani M.M. [1], Hossaini S.A. [1], Falahat E. [1]

[*]ms.ganjoor@ifro.ir

1-Shahid Motahary Cold water Fishes Genetic and breeding Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Yasoj, Iran.

Abstract:

In this research, measurement of serum blood glucose of cultured rainbow trout (Broodstocks) had done in two different treatments. First treatment consists of fish which were fast, and second treatment had feed. Each treatment includes 10 fish (50% male, 50% female). Blood extracted from caudal vein of each fish by a syringe. Then, serum separated with centrifugation. The amount of serum glucose measured by a kit (Man® Company, Iran). The kit worked based on glucose oxidase method. The average of blood glucose in fasting treatment, was 92.2±14 mg/dl while the average of feed treatment was 189.2±17.2 mg/dl. Statistical analysis had done by SPSS software. Comparison of mean blood sugar concentration between two treatments by t-test showed significant difference between two treatments ($p<0.05$). The final conclusions showed that fish feeding gives change in blood glucose concentration. It is appeared that, bleed of fish for measurement of the serum glucose needs to do 8 hours after feeding for future research and accuracy tests and standardization of tests.

Keywords: Rainbow trout, Glucose, Serum

***Corresponding author**

www.SID.ir