اثر استرس حاد بر نوسانات کورتیزول و گلوکز ماهیان استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) تغذیه شده با سطوح متفاوت ویتامین های C و E

مصطفی تاتینا[۱]*؛ رضا طاعتی[۲]؛ محمود بهمنی[۳]؛ مهدی سلطانی[٤]؛ مهتاب قریب خانی[۵]

mostafa_tatina@yahoo.com

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بندرانزلی،گروه شیلات. بندرانزلی- ایران.

۲-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تالش، گروه شیلات. تالش- ایران.

۳- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت- ایران.

۴-گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران- ایران.

۵- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آستارا،گروه شیلات. آستارا- ایران.

تاریخ دریافت : دی ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش : اسفند ۱۳۹۰

چکیده

ویتامین ها ترکیبات آلی پیچیده ای هستند، که اهمیت حیاتی برای ماهیان داشته و کمبود آنها باعث اختلالات شدید در بدن می گردد. نه جیره غذایی شامل ترکیبی از مقادیر ۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم ویتامین C و ۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم ویتامین E در کیلوگرم غذا در ۲ تکرار و به مدت ۱۵ هفته جهت پرورش ماهیان استرلیاد در نظر گرفته شدند. تعداد ۲۷۰ عدد ماهی استرلیاد با وزن متوسط ۱۴/۲۸±۳۵۰/۹۲ گرم به ۱۸ تانک فایبرگلاس معرفی گردیدند. در پایان آزمایش تست استرس(شامل قرار گرفتن در معرض هوا، کاهش حجم آب و قطع هوادهی) انجام و ۳ عدد ماهی از هر تانک به طور تصادفی خونگیری شدند. نتایج نشان داد که پس از انجام تست استرس حداقل و حداکثر مقدار کورتیزول در تیمارهای (۹) E۴۰۰ C۴۰۰ mg/kg و (۴) E۱۰۰ C۰ mg/kg (اثر توام ویتامین ها) و به ترتیب معادل ۰/۳۱ ± ۲۵/۶۹ و ۰/۴۴ ± ۵۴/۲۲ نانوگرم در میلی لیتر ثبت گردید که دارای اختلاف معنی دار آماری بودند($P<۰/۰۵$). حداقل و حداکثر مقدار گلوکز پس از انجام تست استرس در تیمارهای (۹) E۴۰۰ C۴۰۰ mg/kg و (۲) E۰ C۱۰۰ mg/kg و به ترتیب ۰/۱۶ ± ۶۸/۴۹ و ۰/۳۸ ± ۹۸/۲۷ میلی گرم در دسی لیتر بود، که اختلاف معنی دار آماری را نشان داد($P<$ ۰/۰۵). با استناد به نتایج فوق می توان اظهار نمود که سطوح بالای ویتامین های C و E جیره و اثر متقابل آنها می توانند تاثیرات مثبتی در کاهش اثرات سوء استرس در ماهی استرلیاد داشته باشند.

کلمات کلیدی: استرس، کورتیزول، گلوکز، ویتامین C، ویتامین E، ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*).

***نویسنده مسئول**

).ir

۱.مقدمه

ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) کوچکترین گونه از خانواده تاس ماهیان محسوب می گردد، که زندگی کوتاهی دارد. در سالیان اخیر به دلیل آسیب دیدن محل های تخم ریزی مولدین در رودخانه ها جمعیت آن رو به کاهش و نسل آن رو به انقراض گذاشته است. این گونه برای جستجوی غذا و تخم ریزی مهاجرت داخلی در رودخانه انجام می دهد. غذای آن لارو حشرات، سخت پوستان، نرمتنان و کرم های کم تار است (۳۱).

یکی از ترکیبات ریز مغذی موجود در غذای آبزیان پرورشی ویتامین ها می باشند. اغلب ویتامین ها در بدن ماهی ها ساخته نمی شوند و باید از طریق غذا به بدن آنها وارد شوند. به همین خاطر در جیره غذایی ماهیان پرورشی مقادیر لازم و کافی از ویتامین ها باید در نظر گرفته شود تا ماهیان پرورشی دچار بیماری های کمبود ویتامینی نگردند. بنابراین برای رشد طبیعی و فعالیت های متابولیکی ماهیان وجود ویتامین ها لازم و ضروری است (۱۸). نیاز به ویتامین ها تحت تأثیر گونه ماهی، سن، سرعت رشد، اثرات متقابل مواد مغذی، سموم محیطی، وضعیت فیزیولوژیکی، سیستم پرورشی و عادات غذایی ماهی قرار دارد (۳۹).

یکی از ویتامین های بسیار مهم محلول در آب ویتامین C ($C_6H_8O_6$) است که به نام اسید اسکوربیک نیز شناخته می شود. اسید اسکوربیک(ویتامین C) در طبیعت فراوان بوده و اغلب جانداران و گیاهان قادرند این ترکیب شیمیایی را از اسید گلوکورونیک بیوسنتز کنند(۲۱،۱۹). ویتامین E($C_{22}H_{50}O_2$) را گروهی از ترکیبات توکوفرول ها تشکیل داده اند که آلفا توکوفرول مهم ترین آنهاست. ویتامین E درکنترل اعمال و وظایف دستگاه تناسلی نقش فعال ایفا می کند (۱۳). این ویتامین به عنوان یک آنتی اکسیدان زیستی قوی نظیر آنتی اکسیدان های داخل و خارج سلولی محلول در چربی در بدن جاندار عمل می کند (۲۷).

پارامترهای خونی به عنوان شاخص های شرایط فیزیولوژیکی یا پاسخ های استرس مزمن در ماهی نسبت به تغییراتی با منشأ داخلی یا خارجی مورد استفاده قرار می گیرند(۸،۱۱). از آنجا که پارامترهای خونی شرایط نامناسب ماهی را بسیار سریعتر از سایر پارامترها نشان می دهند و چون این پارامترها به تغییرات محیطی سریعاً پاسخ می دهند از آنها به طور وسیعی برای توصیف وضعیت سلامت ماهی و ارزیابی پاسخ های استرس و سازش های فیزیولوژیک موجود استفاده می شود(۱۰). استرس بهم خوردن هموستازی بدن تحت تاثیر محرک خارجی تعریف شده است و اولین مرحله پاسخ جانور به استرس تغییر در سیستم غدد درون ریز می باشد. به استرس هایی که عامل استرس زا در مدت کوتاهی بروز می دهد استرس های حاد اطلاق می شود و طبق تعریف عبارتند از استرس هایی که به سرعت شروع و خاتمه می یابند (نوسانات دما، اکسیژن و عامل حمل و نقل)(۳۷). کورتیزول و گلوکز شاخص های مناسب فیزیولوژیک جهت بررسی رخداد استرس در ماهیان می باشند و به هنگام وقوع استرس مقدارشان افزایش می یابد(۲۴، ۳۸). مناسب ترین شاخص های انواع استرس در ماهیان مطالعه توأم کورتیزول وگلوکز سرم خون می باشد (۴). اثرات سطوح بالای ویتامین C و منیزیم بر روی پاسخ های استرس در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)(۱۴)، اثرات جذب ویتامین C و E جیره بر روی پاسخ های استرس در ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*)(۳۰)، تاثیر مکمل های غذایی حاوی ویتامین های C و E بر روی پارامترهای خونی ماهی (*Arapaima gigas*) (۳) و شاخص های خونی ماهی *Piaractus mesopotamicus* تغذیه شده با جیره های حاوی مکمل های ویتامین C و E و مقاومت آنها در برابر *Aeromonas hydrophyla* مورد بررسی قرار گرفتند (۱۶). هدف از این مطالعه ارزیابی پارامترهای کورتیزول و گلوکز سرم خون ماهیان استرلیاد پرورشی (*Acipenser ruthenus*) تغذیه شده با سطوح متفاوت ویتامین های C و E در قبل و پس از استرس می باشد.

Archive of SID

۲. مواد و روش ها

این تحقیق در سال ۱۳۸۷ در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت انجام شد. به منظور سازگاری ماهیان با شرایط جدید پرورشی، تعداد ۲۷۰ عدد ماهی استرلیاد با وزن متوسط ۱۴/۲۸±۳۵۰/۹۲ گرم به ۱۸ عدد وان ۲ تنی فایبرگلاس در کنار یکدیگر و در یک محیط سرپوشیده با تراکم ۱۵ عدد در هر وان منتقل گردیدند. ماهیان جهت سازگاری با شرایط جدید محیطی(اکسیژن، دما و pH) به مدت ۱۵ روز با غذای کنسانتره متداول مورد استفاده برای تغذیه ماهیان خاویاری تغذیه شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا" تصادفی انجام گرفت. ترکیبی از سه سطح از ویتامین C (۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم از غذا) و سه سطح از ویتامین E(۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم از غذا) برای تهیه ۹ جیره شامل یک جیره شاهد(فاقد ویتامین های C و E) و ۸ جیره آزمایشی مورد استفاده قرار گرفتند(جدول ۱).

هر یک از جیره های آزمایشی برای غذادهی ماهیان در دو تانک بکار گرفته شدند. طول مدت آزمایش ۱۵ هفته در نظر گرفته شد. در پایان آزمایش، تعداد ۳ عدد ماهی از هرتانک بطور تصادفی انتخاب و خونگیری از سیاهرگ دمی واقع در پشت باله مخرجی با استفاده از سرنگ های ۵ سی سی انجام گرفت. سپس ماهیان پلاک زده و به تانک بازگردانده شدند بطوریکه هر ماهی حدود ۲ دقیقه خارج از آب و در معرض هوا قرار داشت. سپس عمق آب از ۳۵ سانتی متر به ۱۵ سانتی متر کاهش داده شد و هوادهی به تانک ها به مدت ۳۰ دقیقه قطع گردید. پس از گذشت ۶ ساعت از ماهیان پلاک دار مجدداً خون گرفته شد(۶، ۷). خون به داخل لوله های آزمایش شماره گذاری شده منتقل و به آزمایشگاه ارسال گردید. جدا سازی سرم از خون توسط سانتریفیوژ(مدل Labofuge 200 شرکت Heraeus sepatch ساخت آلمان) به مدت ۵ دقیقه در ۷۰۰۰ دور انجام گرفت. مقادیر هورمون کورتیزول با روش رایوایمنوایسی(RIA)

جدول ۱- ترکیبات جیره های غذایی مورد استفاده ماهیان استرلیاد در طول مدت پرورش

ترکیبات جیره/ شماره جیره (تیمار)	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹
آرد ماهی(٪)	۵۴	۵۴	۵۴	۵۴	۵۴	۵۴	۵۴	۵۴	۵۴
آرد گندم (٪)	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸
شیر خشک (٪)	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵
کنجاله سویا (٪)	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸
گلوتن ذرت (٪)	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵
روغن ماهی(٪)	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴
مخمر (٪)	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳
مخلوط مواد معدنی[۱] (٪)	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳
مخلوط مواد ویتامینی[۲] (٪)	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷
ویتامین E[۳](میلی گرم در کیلوگرم غذا)	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۴۰۰
ویتامین C[٤](میلی گرم در کیلوگرم غذا)	۰	۱۰۰	۴۰۰	۰	۱۰۰	۴۰۰	۰	۱۰۰	۴۰۰

[۱] مخلوط مواد معدنی (گرم در کیلوگرم مکمل):

Calcium Lactate, 327; K_2PO_4, 239.8; $CaHPO_4$. $2H_20$, 135.8; $MgSO_4$. $7H_20$, 132; Na_2HPO_4. $2H_2O$, 87.2; NaCl, 43.5; ferric citrate, 29.7; $ZnSO_4$. $7H_20$, 3; $CoCl_2$. $6H_2O$, 1; $MnSO_4$. H_2O, 0.8, KI, 0.15; $AlCl_3.6H_2O$, 0.15; $CuCl_2$, 0.1.

[۲] مخلوط مواد ویتامینی (گرم در کیلوگرم مکمل):

Thiamin hydrochloride, 2.5; Riboflavin, 10; Calcium pantothenate, 25; Nicotinic acid, 37.5; Pyridoxine by hydrochloride, 2.5; Folic acid, 0.75; Inositol, 100; Ascorbic acid, 50; Chlorine chloride, 250; Menadione, 2; Retinol acetate, 1; Cholecalciferol, 0.0025; Biotin, 0.25; Vitamin B_{12}, 0.05.

[۳] ویتامین E: دی آلفا-توکوفرول، [٤] ویتامین C: ال-اسکوربیل-۲-پلی فسفات

Archive of SID

www.SID.ir

Radioimmunoassay با استفاده از دستگاه گاماکانتر مدل LKB ساخت فنلاند و بکارگیری کیت هورمونی Immunotech(ساخت فرانسه) و بر حسب نانو گرم در میلی لیتر اندازه گیری گردید. اندازه گیری گلوکز با روش آنزیماتیک GOD-POD انجام گرفت. بدین منظور از دستگاه اتوآنالایزر (مدل RA-1000، شرکت Technicon، ساخت آمریکا) و کیت های من (ایران) جهت سنجش میزان گلوکز بر حسب میلی گرم در دسی لیتر استفاده شد.

جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS 17 استفاده شد. ابتدا آزمون همگنی گروه ها با آزمون Smirnov-Kolmogornov انجام و سپس با توجه به همگن بودن داده ها برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آنالیز واریانس یک طرفه (One–Way ANOVA) و برای جداسازی گروه های همگن از آزمون LSD استفاده شد. اختلاف بین میانگین ها در تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۵٪ تعیین گردید.

۳. نتایج

با بررسی مقادیر کورتیزول قبل از انجام تست استرس مشخص گردید که حداقل آن در تیمار(۵) C۱۰۰mg/kg E۱۰۰ ۰/۳۶ ± ۱۸/۳۳ نانوگرم در میلی لیتر و حداکثر آن در تیمار (۴) E۱۰۰ C۰ mg/kg ۰/۱۰ ± ۴۶/۲۲ نانوگرم در میلی لیتر می باشد. پس از انجام تست استرس حداقل و حداکثر مقدار کورتیزول اندازه گیری شده در تیمارهای (۹) C۴۰۰ mg/kg E۴۰۰ و (۴) E۱۰۰ C۰ mg/kg و به ترتیب معادل ۰/۳۱± ۲۵/۶۹ و ۰/۴۴±۵۴/۲۲ نانوگرم در میلی لیتر ثبت گردید. اختلاف معنی دار آماری بین جیره های مختلف مشاهده شد (P<۰/۰۵)(جدول ۲ و شکل ۱).

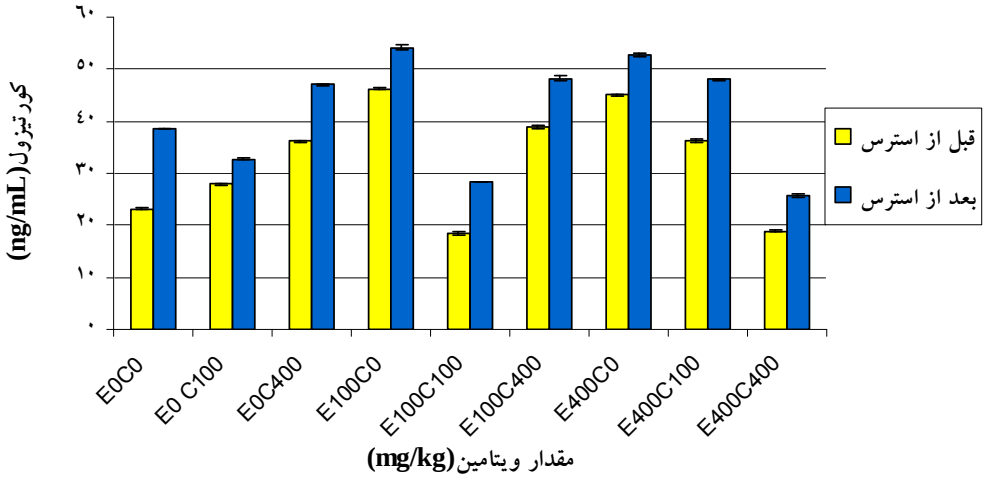
با بررسی مقادیر گلوکز قبل از انجام تست استرس مشخص گردید که حداقل آن در تیمار (۸) E۴۰۰ C۱۰۰mg/kg ۰/۲۱ ± ۳۳/۸۸ میلی گرم در دسی لیتر و حداکثر آن در تیمار (۵) E۱۰۰ C۱۰۰ mg/kg ۰/۳۳ ± ۴۳/۶۶ میلی گرم در دسی لیتر می باشد. پس از انجام تست استرس حداقل و حداکثر مقدار گلوکز اندازه گیری شده در تیمارهای (۹) C۴۰۰ mg/kg E۴۰۰ و (۲) E۰ C۱۰۰ mg/kg و به ترتیب ۰/۱۶ ± ۶۸/۴۹ و ۰/۳۸ ± ۹۸/۲۷ میلی گرم در دسی لیتر ثبت گردید. اختلاف معنی دار آماری بین جیره های مختلف مشاهده شد (P<۰/۰۵). (جدول ۳ و شکل ۲).

جدول۲: مقادیر کورتیزول قبل و بعد از استرس در ماهیان استرلیاد تغذیه شده با جیره های حاوی ویتامین های C و E (n=۵٤)

مقدار ویتامین (میلی گرم در کیلوگرم)	کورتیزول (نانوگرم در میلی لیتر)	
	قبل از استرس	بعد از استرس
تیمار ۱ E۰ C۰	۲۳/۲۴ ± ۰/۰۹ f	۳۸/۴۷ ± ۰/۰۱ e
تیمار ۲ E۰ C۱۰۰	۲۷/۸۸ ± ۰/۰۳ e	۳۲/۷۴ ± ۰/۲۵ f
تیمار ۳ E۰ C۴۰۰	۳۶/۱۰ ± ۰/۲۳ d	۴۷/۰۰ ± ۰/۱۸ d
تیمار ۴ E۱۰۰ C۰	۴۶/۲۲ ± ۰/۱۰ a	۵۴/۲۲ ± ۰/۴۴ a
تیمار ۵ E۱۰۰ C۱۰۰	۱۸/۳۳ ± ۰/۳۶ g	۲۸/۳۷ ± ۰/۰۸ g
تیمار ۶ E۱۰۰ C۴۰۰	۳۸/۹ ± ۰/۲۴ c	۴۸/۲۷ ± ۰/۳۸ c
تیمار ۷ E۴۰۰ C۰	۴۵/۱۴ ± ۰/۱۸ b	۵۲/۷۲ ± ۰/۳۷ b
تیمار ۸ E۴۰۰ C۱۰۰	۳۶/۲۹ ± ۰/۴۱ d	۴۷/۹۸ ± ۰/۱۲ c
تیمار ۹ E۴۰۰ C۴۰۰	۱۸/۸۹ ± ۰/۲۳ g	۲۵/۶۹ ± ۰/۳۱ h

اعدادی که در هر ستون دارای حروف غیر مشابه هستند، اختلاف معنی دار دارند (P<۰/۰۵).

Archive of SID

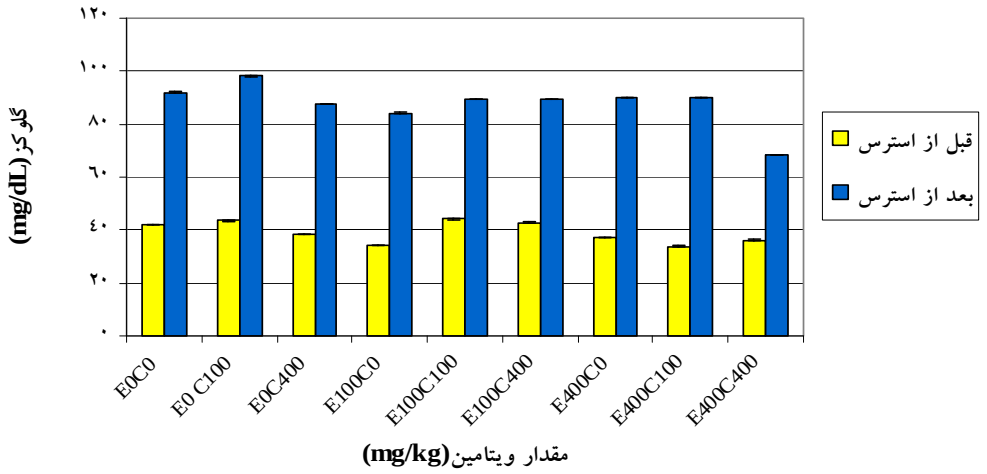


شکل۱: مقادیر کورتیزول قبل و بعد از استرس در ماهیان استرلیاد تغذیه شده با جیره های حاوی ویتامین های C و E

جدول۳: مقادیر گلوکز قبل و بعد از استرس در ماهیان استرلیاد تغذیه شده با جیره های حاوی ویتامین های C و E (n=۵۴)

مقدار ویتامین	گلوکز (میلی گرم در دسی لیتر)	
(میلی گرم در کیلوگرم)	قبل از استرس	بعد از استرس
تیمار ۱ E۰ C۰	۴۲/۰۱ ± ۰/۱۵ [b]	۹۲/۰۹ ± ۰/۲۳ [b]
تیمار ۲ E۰ C۱۰۰	۴۳/۶۶ ± ۰/۳۳ [a]	۹۸/۲۷ ± ۰/۳۸ [a]
تیمار ۳ E۰ C۴۰۰	۳۸/۳۱ ± ۰/۱۹ [c]	۸۷/۴۹ ± ۰/۱۳ [e]
تیمار ۴ E۱۰۰ C۰	۳۴/۳۵ ± ۰/۱۵ [f]	۸۴/۲۸ ± ۰/۰۶ [f]
تیمار ۵ E۱۰۰ C۱۰۰	۴۴/۳۱ ± ۰/۳۵ [a]	۸۹/۳۱ ± ۰/۱۵ [d]
تیمار ۶ E۱۰۰ C۴۰۰	۴۲/۶۸ ± ۰/۳۲ [b]	۸۹/۳۰ ± ۰/۱۴ [d]
تیمار ۷ E۴۰۰ C۰	۳۷/۲۳ ± ۰/۲۷ [d]	۹۰/۰۵ ± ۰/۱۷ [c]
تیمار ۸ E۴۰۰ C۱۰۰	۳۳/۸۸ ± ۰/۱۲ [f]	۹۰/۱۱ ± ۰/۱۵ [c]
تیمار ۹ E۴۰۰ C۴۰۰	۳۶/۳۰ ± ۰/۲۰ [e]	۶۸/۴۹ ± ۰/۱۶ [g]

اعدادی که در هر ستون دارای حروف غیر مشابه هستند، اختلاف معنی دار دارند (P<۰/۰۵).



شکل۲: مقادیر گلوکز قبل و بعد از استرس در ماهیان استرلیاد تغذیه شده با جیره های حاوی ویتامین های C و E

www.SID.ir

٤. بحث

پرورش ماهی در سیستم های پرورشی و محیط های مصنوعی منجر به قرارگرفتن ماهیان در معرض فاکتورهای استرس زای مختلفی گردیده است که در شرایط طبیعی مشابه این حالت برای آنها ایجاد نمی گردد. از نمونه های این استرس ها می توان به نوسانات دما و اکسیژن، مجاورت کوتاه مدت در معرض مواد سمی، حمل و نقل و ... اشاره نمود. واکنش جاندار نسبت به این استرس ها نیز بسیار سریع است(۳۷).

مناسب ترین شاخص های انواع استرس در ماهیان مطالعه توأم کورتیزول وگلوکز سرم خون می باشد(۴). همچنین ثابت شده است که کورتیزول در متابولیسم انرژی، تنظیم یونی و پاسخ به استرس نقش مؤثری داشته و با تحریک پدیده های گلیکولیز و تبدیل اسید لاکتیک به گلوکز در کبد طی پروسه شیمیایی از منابع پروتئین و چربی موجب افزایش گلوکز سرم خون می گردد(۴۵). تحت شرایط استرس(دستکاری، حمل و نقل و کمبود اکسیژن) ACTH مترشحه از هیپوتالاموس به قسمت قدامی کلیه وارد و با تحریک سلول های بین کلیوی سبب ترشح کورتیزول شده و در نهایت سبب افزایش کورتیزول موجود در خون می شود (۲۴، ۲۸، ۳۸). از سوی دیگر مطالعات نشان داده است که ویتامین های C و E می توانند در ماهی به عنوان تعدیل کننده های پاسخ های استرس ایفای نقش کنند (۲۳ و ۳۰). اثرات استرس می تواند از طریق استفاده از مکمل های حاوی مقادیر بالای ویتامین های C و E در غذای ماهیان کاهش پیدا کند (۲۳). همچنین هنگامی که یک استرس مزمن (افزایش تراکم، تغییرات دما، کمبود اکسیژن) به ماهیان وارد می شود ماهیان تغذیه شده با سطوح بالاتر ویتامین C ایمنی بالاتری از خود نشان داده و در نتیجه کارایی بهتری دارند (۲۹، ۴۱).

گلوکز پلاسما به عنوان یک شاخص مهم در پاسخ به عوامل مختلف استرس حاد یا مزمن مورد توجه قرار می گیرد (۱۵). از این رو اندازه گیری میزان گلوکز خون بعد از بروز استرس مشابه کورتیزول فاکتور مناسبی جهت ارزیابی شدت پاسخ های نورواندوکرینی در ماهیان محسوب می گردد(۳۳). سطوح گلوکز در هر زمان وابسته به فاکتورهای مختلفی مثل جیرهٔ غذایی، سن، تغذیه و فصل می باشد و از مهم ترین پاسخ های ثانویه در ارتباط با بالارفتن کورتیزول می باشد(۳۲). تحت شرایط استرس زا، کاتکول آمین ها با تأثیر برکبد سبب القاء گلیکولیز یا گلیکونئوژنزیز می شوند که این امر منجر به متابولیزه شدن گلوکز شده و در نتیجه میزان گلوکز سرم افزایش می یابد(۳۵).

نتایج بررسی حاضر نشان داد که کمترین میزان کورتیزول قبل از اعمال استرس در تیمار E۱۰۰ C۱۰۰mg/kg و بعد از اعمال استرس در تیمار E۴۰۰ C۴۰۰mg/kg مشاهده گردید. از سوی دیگر، بیشترین مقدار کورتیزول قبل و بعد از اعمال استرس در تیمار E۱۰۰ C۰ mg/kg مشاهده شد. همچنین کمترین میزان گلوکز قبل از اعمال استرس در تیمار E۴۰۰ C۱۰۰mg/kg و بعد از اعمال استرس در تیمار E۴۰۰ C۴۰۰ mg/kg مشاهده گردید. از سوی دیگر بیشترین مقدار گلوکز قبل از اعمال استرس در تیمار E۱۰۰ C۱۰۰ mg/kg و بعد از اعمال استرس در تیمار E۰ C۱۰۰ mg/kg مشاهده شد. این نتایج تاثیرات مثبت سطوح بالای ویتامین های C و E جیره و اثر متقابل آنها را در کاهش اثرات سوء استرس با توجه به نظریات مطرح شده فوق به اثبات می رساند. با این حال می توان گفت که سطوح پایین یک ویتامین (E یا C) و عدم وجود ویتامین دیگر (E یا C) در جیره نمی تواند از اثرات سوء استرس جلوگیری نماید و این امر وجود واکنش متقابل بین سطوح بالای ویتامین های C و E جیره را در جلوگیری از اثرات ناشی از عوامل استرس زا بیش از پیش آشکار می نماید. از سوی دیگر می توان بیان نمود که سطوح پایین ویتامین های E و C به تنهایی نقش چندانی در کاهش اثرات ناشی از استرس ها در این گونه نمی توانند داشته باشند. تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین نیز تایید کننده اثر استرس بر افزایش مقادیر کورتیزول و گلوکز سرم خون بوده است. با بررسی اکوفیزیولوژیک استرس از طریق اثر بر محورهای HPI و HPG سیستم ایمنی و فرایند تولید مثلی تاس ماهی ایرانی

Archive of SID

SID.ir

(*Acipenser persicus*) دریافتند که استرس های صید، حمل و نقل و نگهداری باعث بالا رفتن هورمون کورتیزول و گلوکز می شود (۱). در گونه های تاسماهیان مقدار استرس در زمان های خاصی بالا رفته و به اوج می رسد و دوباره بعد از گذشت چندین ساعت به حالت اولیه خود بر می گردد (۷). کورتیزول پلاسما در ماهی *Scaphirhynchus albus* و تاس ماهیان هیبرید *Scaphihynchus albus*× *Platohynchus shovelnose* یک ساله طی ۶ ساعت نگهداری در شرایط نامساعد از ۳ نانوگرم در میلی لیتر به ۱۴-۱۳ نانوگرم در میلی لیتر رسید (۶). همچنین محققین اثرات صید، دستکاری و انتقال به آزمایشگاه را بر روی ماهی *Hemigymnus melapterus* مورد بررسی قرار دادند. آنها اظهار کردند که میانگین کوتیزول در ماهی های خونگیری شده در زیر آب ۳ نانوگرم در میلی لیتر بود اما هنگامی که در معرض صید، دستکاری و انتقال به آزمایشگاه قرار گرفتند به ۴۰ نانوگرم در میلی لیتر رسید. آنها مدت زمان این عوامل استرس زا را ۴-۲ ساعت بیان نمودند (۱۷). در آزمایشی که بر روی ماهی *Scaphirhynchus albus* و تاس ماهیان هیبرید انجام شده، دریافتند که گلوکز پلاسما ۲۰ ٪ در تاس ماهیان هیبرید نگهداری شده در شرایط استرس افزایش یافت (۶). در بررسی استرس های بالا و پایین نگهداری بر روی ماهی قزل آلای رنگین کمان بیان شده که در استرس های بالا ۲ ساعت بعد مقدار کورتیزول به ۱۳/۲± ۱۶ نانوگرم در میلی لیتر می رسد در حالی که در استرس های پایین بعد از ۶ ساعت مقدار کورتیزول به ۷/۷ ± ۴۳/۲ نانوگرم در میلی لیتر رسید که نشان دهنده این است که استرس های بالا باعث افزایش کورتیزول در ساعت های اولیه می شود و مقدار گلوکز در هر دو نوع استرس بالا بود در استرس های پایین نگهداری گلوکز پس از ۲۴ ساعت به ۴۴/۵ ±۳۲۶ میلی گرم در دسی لیتر رسید و مقدار آن در استرس های بالا در این زمان به ۱۳/۲± ۱۵۶ میلی گرم در دسی لیتر رسید (۴۲). در آزاد ماهی ساکای (*Oncorhynchus nerka*) میزان اولیه گلوکز خون ۱/۳ میلی گرم در میلی لیتر بوده است ولی پس از استرس (نگهداری در شرایط اسارت) به مدت ۳۰ دقیقه به حد ۱۴۲ میلی گرم در میلی لیتر افزایش یافت (۲۵). در تحقیقی که بر روی برخی از گونه های خانواده کپور ماهیان و آزاد ماهیان انجام دادند، اعلام نمودند استرس به هر دلیلی در تغییر پارامترهای خونی و سرمی مؤثر می باشد (۴۴). در ماهیان خاویاری همانند ماهیان استخوانی، افزایش سطح کورتیزول و گلوکز سرم بعنوان شاخصی در پاسخ به استرس در نظرگرفته می شود (۷، ۱۱). در مطالعه ای، با تأثیر استرس بر تاسماهی آدریاتیک (*A. naccarii*) مشخص شد که میزان کورتیزول از ۱۸/۷ ± ۳۲ نانوگرم در میلی لیتر به ۴۳/۸± ۴۳ نانوگرم در میلی لیتر در دمای ۱۷درجه سانتی گراد رسید (۱۱). مطالعه ای بر روی اثر انواع مختلف استرس شامل صید ، شنای اجباری و در معرض هوا قرار دادن ماهیان ازون برون (*A.stellatus*) و تاسماهی روسی (*A. gueldenstaedtii*) انجام شده و به این نتیجه رسیدند که مقدار کورتیزول پس از قرار دادن در تور به مدت ۱۰-۵ دقیقه به ۶/۰۶± ۹۸/۲ نانوگرم در میلی لیتر رسیده و ۳۰ دقیقه بعد این مقدار به ۱۷۱/۲ نانوگرم در میلی لیتر می رسد . این در حالی است که مقدار گلوکز از ۰/۹± ۱/۹ به ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر رسید(۷).

تحقیقات انجام شده نشان از معنی دار بودن اثر ویتامین های C و E در برخی موارد و بی اثر بودن آنها در موارد دیگر در پاسخ به استرس دارد. با بررسی تاثیر استرس بر روی بچه فیل ماهیان (*Huso huso*) دریافت که کمترین استرس در ماهیانی که با جیره های غذایی حاوی ۲۰۰mg/kg ویتامینC تغذیه شده بودند مشاهده شد و بیشترین استرس در ماهیان گروه شاهد که فاقد ویتامین C در جیره بودند ملاحظه گردید(۲). محققین با بررسی سطوح مختلف ویتامین های C و E جیره بر روی استرس گرما در ماهیان جوان (*Notemigonus crysoleucas*) بعد از ۱۷ هفته پرورش دریافتند ماهیانی که فاقد ویتامین E در جیرهٔ غذایی خود بودند بقا کمتری بعد از قرارگرفتن در معرض استرس

Archive of SID

SID.ir

دمای آب (°C ۳۷-۳۶) نسبت به آنهایی که با جیره های حاوی مکمل های ویتامین E تغذیه شده بودند، داشتند(۱۲). مطالعات نشان داده است که مصرف ویتامین C پاسخ به استرس در ماهی را کاهش می دهد بطوریکه مقادیر پایین نسبت به مقادیر بالای ویتامین نمی تواند از اثرات استرس جلوگیری نماید(۳۶).

غلظت کورتیزول سرم عمومی ترین شاخص پذیرفته شده استرس است(۵). برخی محققین عقیده دارند سطوح بالای ویتامین C از بیوسنتز کورتیزول جلوگیری می کند (۴۳). محققین ثابت کرده اند که استرس نمونه برداری و اسارت می تواند با مکمل های ویتامین های C و E مدیریت شود (۴۰، ۴۶). مشخص شده است که ویتامین C در سنتز کورتیکواستروئیدها نقش دارد. در بسیاری از تحقیقات کاهش اثرات فیزیولوژیک استرس در ماهی با استفاده از سطوح مختلف ویتامین C نشان داده شده است(۲۶). نقش تغذیه با سطوح بالای این ویتامین در کاهش اثر استرس اینگونه می تواند توصیف گردد که هورمون های استرس توسط سلول های اینتررنال و کرومافین با همراهی مصرف بالای ویتامین C رها می شوند. بنابراین با تغذیه از سطوح بالای ویتامین C ذخیره بافتی این ماده قادر است سطح مناسب تغییرات هورمونی را فراهم کرده، عوامل درگیر در سیستم ایمنی ماهی را حفظ کرده و به ماهی اجازه رشد در شرایط مطلوب را بدهد. در شرایط استرس، مصرف ویتامین C در غده آدرنال و دیگر بافت ها افزایش یافته وغلظت ویتامین C در پلاسمای خون بطور موقت در بسیاری از شرایط استرس پایین می آید چرا که در مواقع استرس بعلت افزایش مصرف ویتامین C، سرعت تبدیل آن به اگزالات افزایش می یابد (۳۴). همچنین مشخص گردیده استفاده از ویتامین C باعث افزایش غلظت پلاسمایی آن و بهبود مصرف گلوکز کل بدن به واسطه ارتقای متابولیسم غیر اکسیداتیو گلوکز می گردد. مکان های اولیه عملکرد کورتیزول در آبشش ها و اپیتلیال روده می باشد که گیرنده ویژه در این بافت ها قرار دارند(۲۰). لذا وجود ویتامین ها در جیره و امکان جذب آنها از طریق روده می تواند در کاهش اثرات استرس مؤثر باشد. با توجه به نتایج محققین مختلف و تاثیر سطوح بالای ویتامین های C و E در کاهش اثرات استرس، استفاده از این سطوح ویتامینی با توجه به نقش اثبات شده ویتامین C و همچنین نقش ویتامین E در سنتز ویتامینC و حفاظت از آن می تواند موثر باشد. در تاسماهیان آنچنان که ماهیان استخوانی در معرض استرس هستند این ماهیان قدیمی زیاد تحت تأثیر استرس قرار نمی گیرند و پاسخ های اولیه و ثانویه استرس در ماهیان خاویاری در مقایسه با دیگر گونه های ماهیان استخوانی مقدار کمتری را نشان می دهد(۲۲). این پاسخ ها ناشی از طراحی فیزیولوژیک خوب (نداشتن محدودیت بی هوازی)، تاریخچه زندگی(شکارچی های طبیعی) (۲۲،۶) یا مشخصات مورفولوژیکی (پوشش خوب و محکم) (۹) هستند.

بنابراین آبزی پروری متراکم نیازمند مدیریت دقیق محیط پرورشی است و درک کامل فیزیولوژی ماهی نیز اثرات زیان آور استرس را به حداقل می رساند. استرس های تحمیل شده به ماهی از طریق آب ، غذا ، میکروارگانیسم ها و سایر عوامل منجر به تغییرات در تعادل اسمزی، توانایی خون در انتقال اکسیژن، هضم و جذب، سیستم عصبی و هورمونی ماهیان می شود که در نهایت منجر به کاهش مقاومت ماهی نسبت به عوامل عفونی و مرگ و میر ماهیان می شود. استفاده از ویتامین ها خصوصاً دو ویتامین بسیار مهم و ضروری C و E که نقش آنها به عنوان عوامل کاهش دهنده اثر استرس اثبات شده است می تواند در صورت کاربرد در جیره غذایی آبزیان پرورشی در شرایط مصنوعی از اثرات مضر استرس بکاهد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر محمد پور کاظمی ریاست محترم انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری و کارشناسان محترم بخش های فیزیولوژی و تکثیر و پرورش آقایان مهندس رضوان الله کاظمی، مهندس میر حامد سید حسنی، دکتر محمود

Archive of SID
www.SID.ir

محسنی، مهندس محمد پور دهقانی، مهندس ایوب یوسفی، مهندس علی حلاجیان، مهندس سهراب دژندیان، مهندس هوشنگ یگانه، مهندس جلیل جلیل پور و سایر پرسنل بخش تکثیر و پرورش صمیمانه تشکر می نماییم.

منابع

۱- بهمنی، م. ۱۳۷۸. بررسی اکوفیزیولوژی استرس از طریق اثر بر محور HPI وHPG سیستم ایمنی و فرآیند تولید مثل در تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) . رساله دکتری بیولوژی دریا دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۲۷۷ صفحه.

۲- فلاحتکار، ب.، ۱۳۸۴. اثرات ویتامین C جیره بر برخی شاخص های هماتولوژیک، بیوشیمیایی و رشد در فیل ماهی (*Huso huso*). رساله دکتری شیلات دانشگاه تربیت مدرس. ۸۴ صفحه.

3- Andrade, J.I.A., Ono, E.A., Menezes, G.C., Brasil, E.M., Roubach, R., Urbinati, E.C., Tavares-Dias, M., 2007. Influence of diets supplemented with vitamins C and Eon pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. Comparative Biochemistry and Physiology. 146: 576–580.

4- Barton, B. A. Weiner, C .S. Schreck, G. S. 1985. Effect of prior acid exposure on physiological responses of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* to acute handling stress. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 42: 410-417.

5- Barton , B. A., Iwama, G. K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual Review of Fish Diseases. 1: 3-26.

6- Barton, B. A. Bolling, H. Hauskins, B. L. Jansen, R. 2001. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albus*) and hybrid pallid×shovelnose (*S.albus×platorynchuse*) sturgeon exhibit low physiological; responses to acute handling and severe confinement. Comparative Biochemistry and Physiology.126:125-134.

7-Bayunova, L., Barannikova, I. and Semenkova, T., 2002. Sturgeon stress reactions in aquaculture. Journal of Applied Ichthyology. 18: 397-404.

8- Belanger, .J. M. Son, J. H. Laugero, K. D. Moberg, C. P. Doroshov, S. I. Lankford, S. E. Cech, J. R., 2001. Effects of short – term management stress and ACTH injection on plasma cortisol levels in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Aquaculture. 203:165-176.

9- Billard, R. and Lecointre, C., 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. Review in Fish Biology and Fisheries. 10: 355-392.

10- Blaxhall, P. C., 1972. The hematological assessment of the health of freshwater fish. Review of selected literature. Journal of Fish Biology.4: 593-604.

11- Cataldi, E. Di Marco, P. Mandich, A. Cataudella, S., 1998 . Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipender naccarii* (Pisces : Acipenseriformes) effects of temperature and stress. Comparative Biochemistry and Physiology.121: 351-354.

12- Chen, R. Lochmann, R. Goodwin, A. Praveen, K. Dabrowski, K. and Lee, K. J. 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). Aquaculture. 242: 553–569.

13- Ciereszko, A. Dabrowski, K., 2000. Effect of ascorbic acid supplement in vitro on rainbow trout sperm viability. Aquaculture International. 8: 1-8.

14- Dabrowska, H. K., Dabrowski, K. Meyer-Burgdorff, W.H. and Gunter, K.D. 1991.The effect of large doses of vitamin C and magnesium on stress responses in common carp (*Cyprinus carpio*). Comparative Biochemistry and Physiology 99: 681–685.

15- Ellis, T. North, B. Scott, A. Bromage, N. R. Porter, M. and Gad, D. 2002. The

Archive of SID

SID.ir

relationship between staking density and the welfare of farmed rainbow trout. Journal of Fish Biology.6: 493-531.

16- Garcia, F., Pilarski, F. Onaka, E. M. Moraes F. R. and Martins, M. L. 2007. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture. 271: 39–46.

17- Grutter, A. S. and Pankhurst, N. J. 2000. The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. Journal of Fish Biology. 57: 391-401.

18- Halver, J. E., 1980. The vitamins In: ADCP (Eds). Fish Feed Technology, ROMs, FAO, ADCD/REP/80/11-65-1-108P.

19- Halver, J. E., 2002. The vitamins. In: Halver, J. E., Hardy, R. W. (Eds.), Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, CA, pp: 61–141.

20- Hazon, N. and Balment, R. J., 1997. Endocrinology. In: Evans, D. H. (ed), The Physiology of Fishes. CRC Press. pp: 441-463.

21- Keefe, T., 2001. Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in Aquaculture Feeds .ASA Technical Bulletin. 48:1-9.

22- Keiffer, J. D., 2000. Limits to exhaustive exercise in fish comparative biochemistry and physiology.126: 161-179.

23- Kolkovski, S., Czesny, S. Yackey, C. Moreau, R. Cihla, F. Mahan D. and Dabrowski, K. 2000. The effect of vitamins C and E in (n-3) highly unsaturated fatty acids-enriched Artemia nauplii on growth, survival, and stress resistance of fresh water walleye *Stizostedion vitreum* larvae. Aquaculture Nutrition. 6: 199–206.

24- Kubilay, A. and Vlukay, G. , 2002 . The effect of acute stress on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Turkish Journal of Zoology. 26: 249-254.

25- Kubokawa, K. Watanabe, T. Yoshioka, M. and Iwata, M. 1999. Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. Aquaculture. 172: 335-349.

26- Li, M. H. and Robinson, E. H., 1999. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. Journal of Applied Aquaculture. 9 (2):53-79.

27- Lim, C. and Webster, C. 2001. Nutrition and Fish Health. Food Products Press (imprint of The Haworth Press Inc.), New York, pp. 1–365.

28- Mc Cormic, S. D. Odea, M. F. Moeckel, M. A. and Bjornsson, B. T., 2003. Endocrine and physiological changes in Atlantic salmon smolts following hatchery release. Aquaculture. 222:45-57.

29- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Vergara, J.M. and Tort, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. Aquaculture. 171: 269–278.

30- Ortuno, J., Esteban, M.A. and Meseguer, J. 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Fish and Shellfish Immunology. 14: 145–156.

31- Peterson, D. Vecsei P. and Hochleithner, M. 2006. Threatened fishes of the world: *Acipenser ruthenus Linnaeus*, 1758 (Acipenseridae). Environmental of Biology Fishes. 43:223-225.

32- Pottinger, T. G., 1998. Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in angler keepnets. Journal of Fish Biology. 53: 728 – 742.

33- Pottinger, T. G. and Carrick, T. R. 1999. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress responsiveness in female rainbow trout. Aquaculture. 175: 351-363.

Archive of SID

www.SID.ir

34- Rivers, J. M., 1987. Safety of high level of vitamin C ingestion. Annals of New York Academic of Sciences. 498: 445 – 453.

35- Rotland, J. and Tort, L., 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red oorgy previously subjected to crowding stress. Journal of Fish Biology. 51: 21-28.

36- Sandens, K., Waagbo, R., 1991. Effects of dietary vitamin C and physical stress on head kidney and liver ascorbic acid , serum cortisol , glucose and hematology in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fisk. Dir. Skr. Ser. Emaring. 1: 41 – 49.

37- Schreck, C.B .1990. In: Adams, S.M (ed) Biological indicators of stress in fish. American Fisheries Symposium & Bethesda, Maryland, USA. pp: 9-28.

38- Schreck, C. B. Contreaas – Snchez, W. and Fitzpatrick, M. I. 2001. Effects of stress on fish reproduction. Gamete Quality and progeny. Aquaculture. 197: 3-24.

39- Sena, S. D. and Trever, A., 1995. Fish nutrition in aquaculture. Chapman & Hall Aquaculture Series. London. 320P.

40- Shiau, S-Y, Hsu, T-S., 1999. Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*×*Oreochromis aureus*, with L-ascorbyl-2-monosulphate-Rna and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg. Aquaculture.17: 317-326.

41- Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, L., Hernández, A., Ceulemans, S., Coutteau, P., Padros, F., 2004. Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. Aquaculture. 229:55–65.

42- Trenzado, C. E. Carrick, T. R. and Pottinger, T. G. 2003. Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for deferring to stress cortisol responsiveness to stress. General and Comparative Endocrinology. 133: 332-340.

43- Wedemerye, G., 1969. Stress-induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fishes. Comparative Biochemistry and Physiology. 29: 1247-1251.

44- Wedemeyer, G. A. Barton, B. A. and Mcleay, D. J. 2000. Stress and acclimation. In : Schreck C. B. and Moyle, P. B. (Eds). Methods for fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda , Maryland, USA. pp: 451-489.

45- Wendelaar Bonga, S. E., 1993. Endocrinology. In: Evans, D. H. (ed), The Physiology of Fishes. CRC press. pp: 469 – 503.

46- Woodward, W., 1994. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with special emphasis on quantitative estimates for salmonids. Aquaculture. 124:133-168.

Archive of SID

www.SID.ir