مطالعه سطوح کورتیزول و پارامترهای خونی در مولدان ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) پرورشی درشرایط تکثیرمصنوعی با استفاده از GnRH

محمدیونس زاده[۱]*، محمود بهمنی[۲]، رضوان اله کاظمی[۳]، محمد پوردهقان[۴]، حسین فیض بخش[۵]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، مؤسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری رشت
۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری رشت
۳- مربی، مؤسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری رشت
۴- کارشناس، مؤسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری رشت
۵- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، مؤسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری رشت

Archive of SID

چکیده

شاخصهای استرس و ارتباط آن با موفقیت یا عدم موفقیت تکثیر ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) پرورشی تزریق شده با هورمون GnRH بررسی گردید. در این مطالعه ۱۱ عدد مولد ۸ ساله (شامل ۵ مولد ماده و۶ مولد نر) در بهار ۱۳۸۵ با هورمون GnRH تزریق شدند (در مولدان ماده به میزان ۱۰µg/kg به ترتیب با ۱۰٪ و۹۰٪ دُز طی دو مرحله با فاصله زمانی ۱۲ ساعت و در مولدان نر در یک مرحله به میزان ۱۵ µg/kg همزمان با تزریق دوم ماده‌ها). خونگیری در مولدان نر طی ۲ مرحله (۰ و۱۲ ساعت پس از تزریق) و در مولدان ماده طی ۳ مرحله (۰، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق) بمنظور بررسی شاخصهای هورمونی و خونی صورت گرفت. نتایج به دست آمده در مرحله تکثیر نشان داد سطوح هورمون کورتیزول، لنفوسیت وائوزینوفیل پس از تزریق در مولدان ماده اوولهٔ شده بالاتر از اوولهٔ نشده بود، در حالی که سطوح نوتروفیل در مولدان اوولهٔ نشده بالاتر بود. در ماهیان نر با اسپرم‌دهی مناسب و نامناسب اختلافی در سطوح کورتیزول، نوتروفیل، لمفوسیت و ائوزینوفیل مشاهده نشد(p>۰/۰۵).

کلید واژگان: مولدان ازون برون پرورشی، استرس، GnRH، اوولاسیون، اسپرم ریزی، پارامترهای خونی.

۱- مقدمه

ازون برون با نام علمی *Acipenser stellatus* از خانواده Acipenseridae و راسته Acipenseriformes می‌باشد. روشهای مدیریت عمومی شامل صید، دستکاری و حمل و نقل در کارگاه ماهیان می‌تواند پاسخهای استرس را به‌وسیله افزایش کورتیزول پلاسما در گونه‌های زیادی تحریک کند [۱].

استرس می‌تواند هماوری تولید مثلی را کاهش دهد و رفتار غیرنرمال و شکست در رشد نرمال را در بلند مدت باعث شود [۲].

* نویسنده مسؤول مقاله: تلفن: ۰۹۱۱۳۳۹۱۲۰۸، E-mail: babak_yooneszadeh@yahoo.com

www.SID.ir

سیستمهای پرورش ماهیان خاویاری متراکمند و عوامل استرسی مدیریتی مختلف مثل دستکاری، تراکم، حمل و نقل، بیوپسی و تحریک تخمریزی به وسیله هورمون را شامل می‌شوند. اگر پاسخهای استرس را بتوانیم در رویه‌های مدیریتی تفریخگاه و در جریان حمل و نقل ارزیابی کنیم، می‌تواند عوامل مختلف را تنظیم کند و آثار استرس را کاهش دهد[۱].

محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- اینترنرنال (HPI) پاسخهای استرس در ماهیان را هماهنگ می‌کند[۳، ۴]. تغییرات هماتولوژیکی به طور عمده به جنبش لکوسیتها وابسته است. الگوی تمایز لکوسیتها در پاسخ به افزایش غلظت کورتیزول ایجاد می‌شود که لکوگرام استرس نامیده می‌شود[۵].

با بالارفتن استرس در ماهیان مولد تولید هورمونهای جنسی کاهش می‌یابد و پدیده تکثیر دچار مشکل می‌شود؛ به عبارتی پس از وقوع استرسهای زیست محیطی و همچنین پاسخ محور HPI به دستکاری ماهیان به عنوان استرس حاد باعث اختلال در محور HPG و موجب کاهش در کارایی تولید مثلی در زمان تکثیر مصنوعی می‌شود[۶].

با توجه به اهمیت تکثیر ماهی ازون برون به منظور توسعه صنعت تاسماهی پرورشی در کشور، حفاظت از ذخایر ارزشمند ماهیان خاویاری، آگاهی از جنبه‌های ناشناخته مراحل تکوین گنادهای این گونه در شرایط پرورشی و تطابق گونه ازون برون با شرایط طبیعی، مهمترین جنبه‌های عملیاتی این تحقیق محسوب می‌شود، به طوری که تجزیه و تحلیل نشانه‌های خونی راهنمای با ارزشی در ارزیابی وضعیت زیستی آبزیان می‌باشد. برای مثال در اثر عوامل استرس‌زا، آلاینده‌ها، تغذیه، شرایط اکولوژیک و فیزیولوژیک، تغییرات عمده‌ای در ساختار خونی ماهیان از نقطه نظر نوسانهای سطوح هورمونها، پروتئینها و سایر ترکیبات اساسی رخ می‌دهد[۷].

بهمنی در سال ۱۳۷۸ اکوفیزیولوژی استرس از طریق اثر بر محورهای HPI، HPG، سیستم ایمنی و فرایند تولیدمثلی در تاسماهی ایرانی را بررسی کرد. همچنین بهمنی و همکاران (۱۳۸۳) مطالعه فیزیولوژیک نارساییها در تکثیر مصنوعی ماهیان ازون برون صید شده از حوضه جنوبی دریای خزر، یونس زاده و همکاران (۱۳۸۵) [۸] تأثیر به کارگیری GnRH بر روند رسیدگی جنسی ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*) پرورشی را مورد مطالعه قرار دادند. بایونووا و همکاران در سال۲۰۰۰ آثار استرس را بر مقادیر کورتیزول سرم در تاس ماهی روسی، ازون برون و فیل ماهی در شرایط مصنوعی و در سال ۲۰۰۶ سطوح کورتیزول و استرس در خون ماهیان ازون برون پرورشی در جریان رسیدگی نهایی به وسیله تحریک با LHRH-a را مورد تحقیق قرار دادند[۹، ۱۰].

از آنجا که تاکنون هیچگونه مطالعه در زمینه فیزیولوژی استرس روی ازون برون پرورشی انجام نگرفته است، هدف از این مطالعه بررسی موفقیت یا عدم موفقیت مولدان پس از تزریق هورمون GnRH و به دست آوردن اطلاعاتی در مورد پاسخ به استرس در مورد ماهیان ازون برون پرورشی است.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- ماهیان مورد مطالعه و مکان تحقیق

۱۱ عدد مولد ازون برون پرورشی ۸ ساله پرورش یافته در مؤسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، شامل ۵ عدد مولد ماده با میانگین وزنی ۸/۷۸±٦٥kg و میانگین طول کل

Archive of SID
www.SID.ir

۱۳۳±۱/٤۹cm و ٦عدد مولد نر با میانگین وزنی ٤/۳۵±/٤۷kg و میانگین طول کل ۳/۷۸cm± ۱۰۹/۷۵ که در مرحله بالای رسیدگی جنسی پس از بررسی ظاهری و هورمونی بودند، انتخاب شدند.

۲-۲- دستورالعمل تحریک هورمونی بلوغ نهایی

در این تحقیق از GnRH (نوع Ova-Fact III ساخت داروسازی ثامن) به عنوان عامل محرک بلوغ نهایی در مولدان ازون برون استفاده شد. تزریق به صورت عضلانی در عضله سومین پلاک پشتی انجام گرفت.

دوز مورد استفاده در مولدان ماده ۱۰µg/kg (در دو مرحله با نسبت ۱۰:۹۰) و در نرها ۱۵ µg/kg (یک مرحله و همگام با تزریق دوم ماده‌ها) بود. همچنین خونگیری از ماده‌ها (قبل از تزریق،۱۲ ساعت پس از تزریق همگام با تزریق دوم و۲۴ ساعت پس از تزریق اول) و نرها (قبل از تزریق و۱۲ ساعت پس از تزریق) صورت گرفت. تزریق در دمای۱±۲۰ درجه با نسبت جنسی ۱:۱ بود که پس از آن به حوضچه‌های مخصوص تکثیر با هوادهی مناسب با گردش آب بالا منتقل شدند.

۲-۳- چگونگی خونگیری و آماده سازی سرم

خونگیری از طریق سیاهرگ دمی[1] و از پشت باله مخرجی ماهیان مولد صورت گرفت. در هر مرحله از خونگیری با استفاده از سرنگهای 5cc مقدار 3cc خون به دست آمد. پس از تهیه سرم که با استفاده از سانتریفوژ با دور۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه (مدل Labofuge۲۰۰، ساخت شرکت Heraeus sepatech کشور آلمان) انجام گرفت، نمونه‌ها به منظور مطالعات سرولوژیک دردمای۲۰°C- نگهداری شدند[۱۱].

۲-٤- اندازه‌گیری سطوح کورتیزول سرم خون

تعیین مقادیر هورمون کورتیزول با روش RIA[2] [۶] با استفاده از دستگاه تمام اتوماتیک گاماکانتر مدل L.K.B ساخت کشور فنلاند و به کارگیری کیت هورمونی Immunotech (ساخت فرانسه) انجام پذیرفت.

۲-۵- تهیه گسترش خونی برای تعیین درصد لکوسیتها

به منظور تعیین مقادیر لکوسیتهای شاخص (لنفوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل) قطره کوچکی از خون ماهیان روی لام ریخته شد و با الکل متانول ثابت گردید. آنگاه با محلول گیمسا۱۰٪ به مدت۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شد [۶]. سپس با میکروسکوپ نوری مجهز به رایانه (مدل Nikon E٦۰۰، ساخت ژاپن) شمارش انجام شد.

۲-٦- روش مطالعه آماری

برای مطالعه و تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از انجام آزمایشها از روشهای آماری به وسیله نرم افزارهای SPSS و اکسل در سطح اطمینان ۰/۰۵ استفاده گردید.

۳- نتایج

در این بررسی روند تغییرات عوامل هورمونی و بیوشیمیایی در زمانهای مختلف تکثیر در مولدان ماده و نر (جدول ۱و۲) پس از تزریق هورمون GnRH سنجیده شد و نتایج زیر حاصل گردید:

1. Caudal vein

2. Radioimmunoassay

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱ مقادیر میانگین، حداقل و حداکثر شاخصهای هورمونی و خونی نسبت به وضعیت تکثیر در مولدان ماده ازون برون پرورشی در زمانهای مختلف تزریق

مرحله تزریق / وضعیت تکثیر		صفر تزریق			۱۲ ساعت پس از تزریق (همگام با تزریق دوم)			۲۴ ساعت پس از تزریق		
		میانگین (±SEM)	حداقل	حداکثر	میانگین (±SEM)	حداقل	حداکثر	میانگین (±SEM)	حداقل	حداکثر
کورتیزول (ng/ml)	تکثیر شده (n=۳)	۱۳/۷۴±۶/۳۷	۰/۰۲	۳۳	۴۶/۶۶±۶/۸۶	۳۰	۶۲	۱۸۷±۳۰/۸۹	۱۳۳	۲۴۰
	تکثیر نشده (n=۲)	۱۸±۵	۸	۲۸	۳۳/۵±۵/۳	۲۳	۴۴	۸۱/۵±۶۹/۵	۱۲	۱۵۱
نوتروفیل ٪	تکثیر شده (n=۳)	۳۲/۳۵±۴/۵	۲۴/۴	۴۶/۵	۳۹/۳۳±۱۰/۶۵	۲۷	۶۲	۵۵/۶۶±۳/۷۱	۵۱	۶۳
	تکثیر نشده (n=۲)	۴۱/۵۴±۰/۵	۴۰	۴۳	۶۹/۵۴±۷/۳	۵۵/۳	۸۳/۷۵	۸۱/۵±۳/۵	۷۸	۸۵
لنفوسیت ٪	تکثیر شده (n=۳)	۶۶/۳۶±۴/۴۳	۵۳	۷۳/۶	۵۹/۶۶±۱۰/۸	۳۶	۷۳	۴۰/۶۶±۳/۳۸	۳۴	۴۵
	تکثیر نشده (n=۲)	۵۶/۸±۰/۶	۵۴	۵۹/۶	۲۹/۶۲±۱۰	۱۵/۲۵	۴۴	۱۶/۷۵±۴/۲۵	۱۲/۵	۲۱
ائوزینوفیل ٪	تکثیر شده (n=۳)	۱±۰/۵	۰/۵	۲	۱±۰/۷	۰	۲	۳/۶۶±۰/۳۳	۳	۴
	تکثیر نشده (n=۲)	۱/۷۵±۱/۱	۰/۴	۳	/۸۵±۰/۱۳	/۷	۱	۱/۷۵±۰/۷۵	۱	۲/۵

جدول۲ مقادیر میانگین، حداقل و حداکثر شاخصهای هورمونی و خونی نسبت به وضعیت تکثیر در مولدان نر ازون برون پرورشی در زمانهای مختلف تزریق

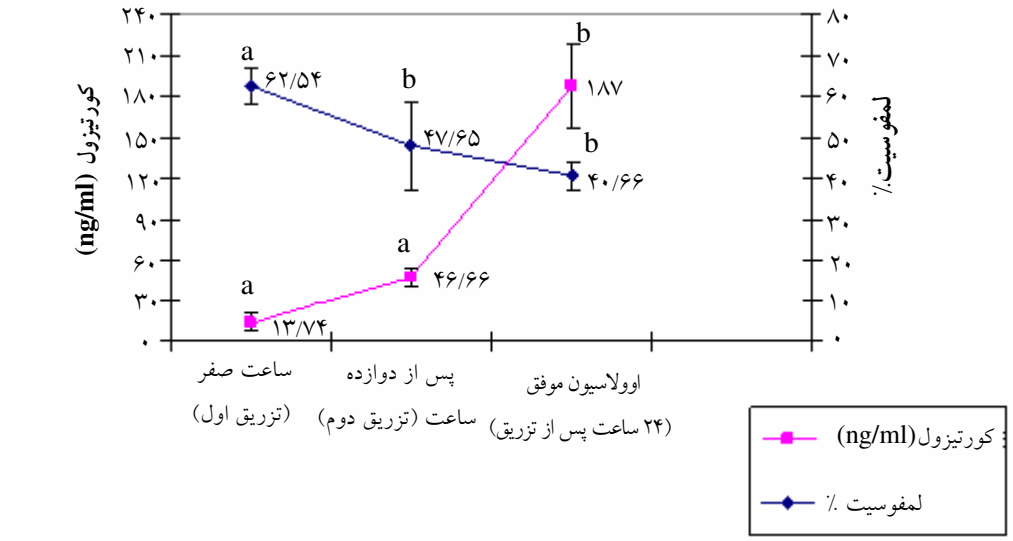
مرحله تزریق / وضعیت تکثیر		صفر تزریق			اسپرم دهی (دوازده ساعت پس از تزریق)		
		میانگین (±SEM)	حداقل	حداکثر	میانگین (±SEM)	حداقل	حداکثر
کورتیزول (ng/ml)	اسپرم‌دهی مناسب (n=۳)	۷/۰۴±۳/۳	۰/۰۴	۱۰/۷	۱۳۷±۲۲/۱۲	۱۱۱	۱۸۱
	اسپرم‌دهی نامناسب (n=۳)	۱۶/۱۳±۱۰	۰/۱۱	۳۹	۱۲۲±۱۸/۶	۷۳	۱۶۵
نوتروفیل ٪	اسپرم دهی مناسب (n=۳)	۲۳/۶۶±۱/۲۷	۲۳	۲۴	۵۶±۸/۰۸	۴۰	۶۶
	اسپرم دهی نامناسب (n=۳)	۱۸/۸۶±۱/۵	۱۶/۵	۲۲/۶	۵۴/۶۶±۸/۰۸	۳۷	۶۵
لنفوسیت ٪	اسپرم دهی مناسب (n=۳)	۷۴/۶۶±۱/۶۱	۷۲	۷۷	۴۳/۴۶±۸/۳۶	۳۳	۶۰
	اسپرم‌دهی نامناسب (n=۳)	۷۹/۷۶±۲	۷۵/۶	۸۲/۲	۴۴/۶۶±۸/۶۸	۳۵	۶۲
ائوزینوفیل ٪	اسپرم دهی مناسب (n=۳)	۱/۶۶±۰/۵۱	۰	۴	۰/۴۳±۰/۳۳	۰	۱
	اسپرم دهی نامناسب (n=۳)	۱/۴۳±۰/۵۹	۰/۳	۲	۰/۶۶±۰/۲۹	۰	۱

براساس نتایج به دست آمده، هورمون کورتیزول و سطوح ائوزینوفیل ۲۴ ساعت پس از تزریق در ماده‌های اوولـه شده (۱۸۷±۳۰/۸۹ng/ml)، (٪۳/۶۶±۰/۳۳) در مقایسه با اوولـه نشده (۸۱±۶۹/۵ng/ml)، (٪۰/۷۵±۰/۷۵) اخـتلاف معنـاداری نـشان داد (p<۰/۰۵)(نمودارهـای ۳ و۴). همچنـین سـطوح نوتروفیل در مولدان اوولـه نشده (٪۸۱/۵±۰/۳۳) در ۲۴ ساعت پس از تزریق تغییـرات زیـادی را در مقایـسه بـا اوولـه شـده (٪۵۵/۶۶±۳/۷۱) نشان داد(نمودارهای۵ و۶).

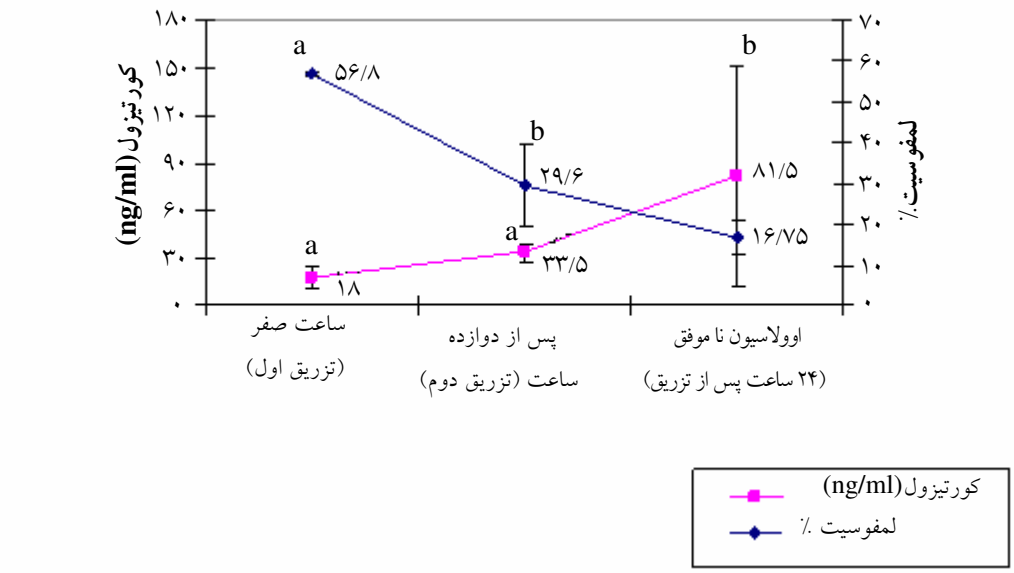
سـطوح لنفوسـیت نیـز در مولـدان اوولـه نـشده (٪۱۶/۷۵±۴/۲۳) در ۲۴ ساعت پس از تزریق تغییرات زیـادی را در مقایـسه بـا اوولـه شـده(٪۴۰/۶۶±۳/۳۸) نـشان داد (نمودارهای ۱ و۲).

Archive of SID

www.SID.ir

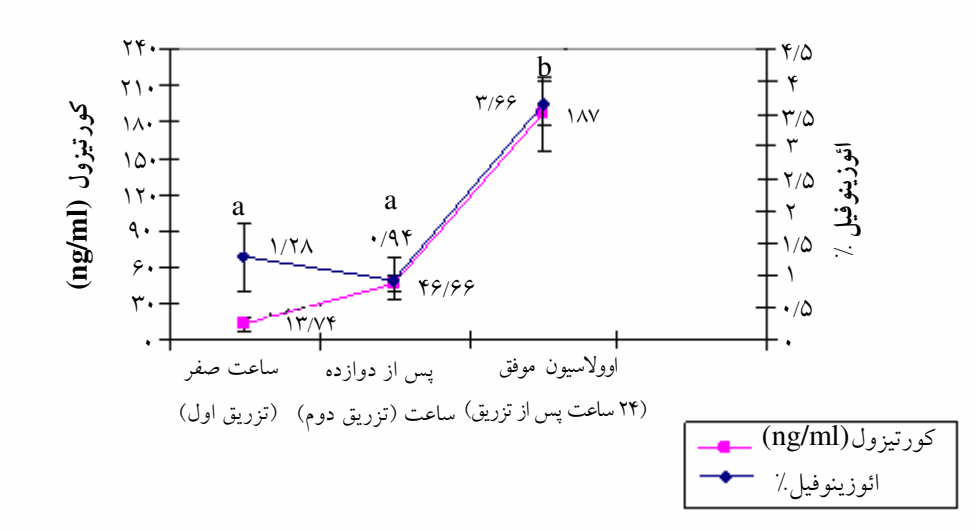


نمودار۱ تغییرات کورتیزول و لنفوسیت در ساعتهای مختلف تزریق درمولدان ماده ازون برون پرورشی اوولە شده

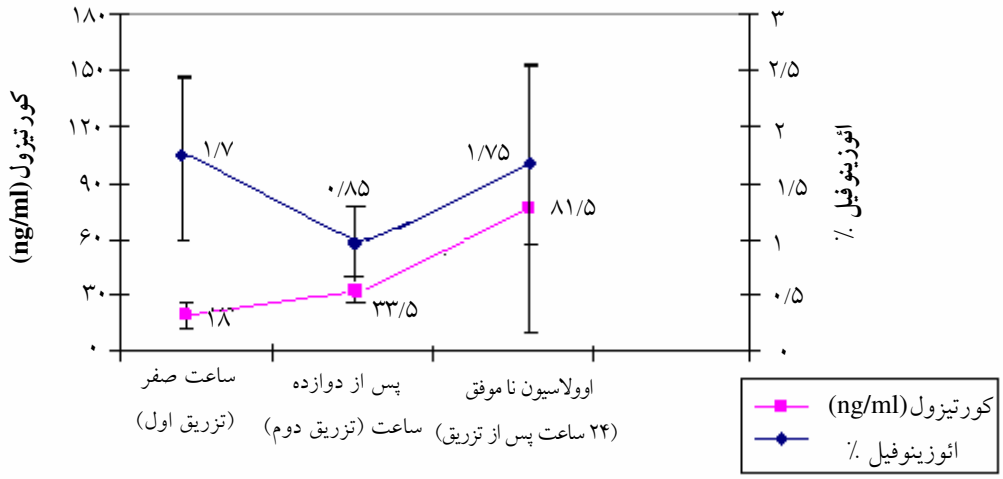


نمودار۲ تغییرات کورتیزول و لنفوسیت در ساعتهای مختلف تزریق در مولدان ماده ازون برون پرورشی اوولە نشده

www.SID.ir

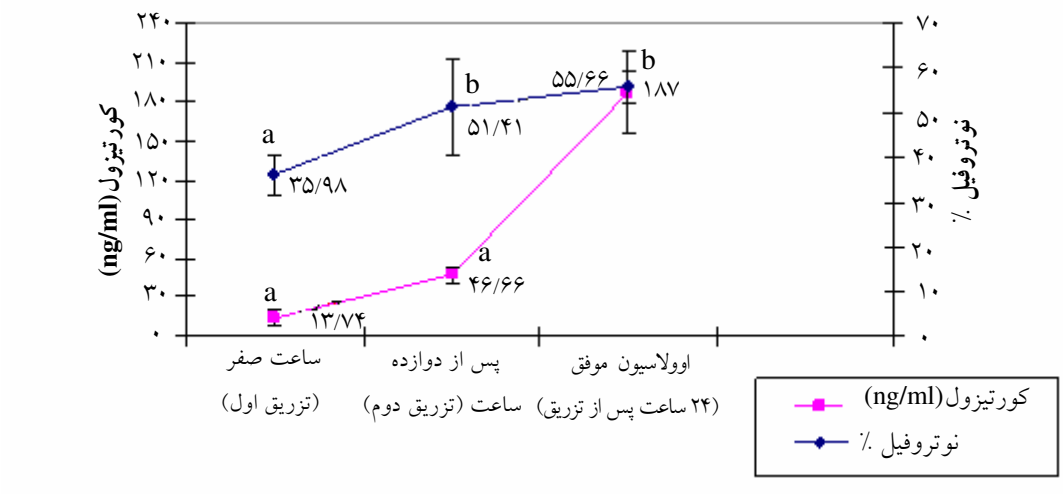


نمودار ۳ تغییرات کورتیزول و ائوزینوفیل در ساعتهای مختلف تزریق درمولدان ماده ازون برون پرورشی اوواله شده

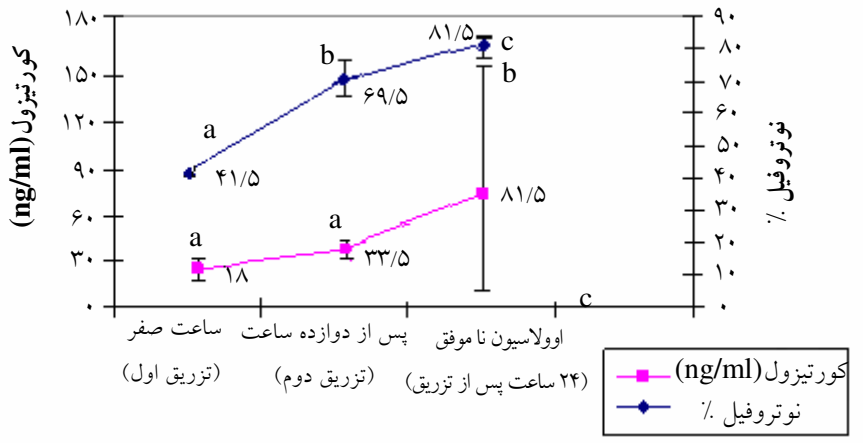


نمودار۴ تغییرات کورتیزول و وائوزینوفیل در ساعتهای مختلف تزریق در مولدان ماده ازون برون پرورشی اوواله نشده

www.SID.ir



نمودار۵ تغییرات کورتیزول و ونوتروفیل در ساعتهای مختلف تزریق در مولدان ماده ازون برون پرورشی اوولە شده



نمودار ٦ تغییرات کورتیزول و نوتروفیل در ساعتهای مختلف تزریق در مولدان ماده ازون برون پرورشی اوولە نشده

www.SID.ir

بعد از تزریق در هر دو گروه مولدان نر و ماده یک روند صعودی در میزان کورتیزول مشاهده شد. این بالارفتگی در مولدان با تکثیر موفق بالاترین مقدار را نشان داد.

همچنین مقدار کورتیزول (۱۳۷±۲۲/۱۲ng/ml)، نوتروفیل (۵۶±۸/۰۸٪)، لنفوسیت (۴۳/۶۶±۳/۳۸٪)، ائوزینوفیل (۰/۶۶±۰/۳۳٪) در مولدان نر با اسپرم‌ریزی مناسب (n=۳) نسبت به اسپرم‌ریزی نامناسب (n=۳) (۱۲۲±۲۶/۷۲ng/ml)، (۵۴/۶۶±۸/۸۷٪)، لنفوسیت (۴۴/۶۶±۸/۸۷٪)، (۰/۴۳±۰/۲۹٪) اختلاف معناداری نشان نداد($p<0/05$).

نتایج حاصل مبین آن است که با تزریق هورمون GnRH یک روند افزایشی در میزان کورتیزول در مقایسه با ساعت صفر تزریق مشاهده شد (جدول۱ و۲).

نتایج نشان داد کورتیزول و شاخصهای خونی در مولدان نر ۱۲ ساعت پس از تزریق، یک روند افزایشی در مقدار کورتیزول، نوتروفیل و کاهشی در مقدار لمفوسیت، ائورینوفیل در اسپرم‌دهی مناسب و نامناسب نسبت به ساعت صفر تزریق داشتند. روند تغییرات در دو گروه مولدان نر (اسپرم‌دهی مناسب و نامناسب) شبیه به یکدیگر بودند. سطوح کورتیزول و درصد نوتروفیل در مولدان نر پس از تزریق GnRH افزایش و درصد لمفوسیت کاهش یافت (جدول ۲).

٤- بحث

سمنکووا و همکاران (۱۹۹۹) [۱۲] دریافتند که بین سطوح کورتیزول و کیفیت گامت ارتباط منطقی وجود دارد. مولدان ماده فیل ماهی با کیفیت تخمک نرمال (۸۰٪-۱۰۰) سطوح کورتیزول ۵۵/۷±۹/۹۹ng/ml بالاتری نسبت به مولدان ماده با کیفیت تخمک پایین۶/۹۶ ng/ml± ۳۱/۸ یا اووله نشده ۱۴/۹۹ng/ml± ۲۴/۵ دارند که با نتایج به دست آمده در این تحقیق- که کورتیزول در مولدان ماده اووله شده و نشده به ترتیب ۱۸۷±۳۰/۸۹ng/ml، ۸۱±۶۹/۵ng/ml بود- مشابه است. این امر تأییدکننده آن است مولدانی که اوولاسیون در آنها اتفاق افتاده کورتیزول بالاتری نسبت به اوولاسیون نشده‌ها دارند.

بارانیکووا و همکاران (۱۹۹۷) در بررسی سطوح کورتیزول سرم تاسماهی روسی، ازون برون و فیل‌ماهی دریافتند به هنگام دوره مهاجرت تغذیه‌ای سطوح کورتیزول سرم خون تا مقدار ۲۲/۲ ng/ml کاهش و در دوره مهاجرت تولیدمثلی (آنادرموس) به ولگا تا مقادیر ۱۲۶/۱۵ افزایش می‌یابد، به طوری که در تاسماهی روسی ماده باGV مناسب تکثیر، مقادیر کورتیزول ۷۲/۵ ng/ml بود و نتایج بیانگر آن بود که کورتیزول هورمون اصلی تاسماهیان در دوره مهاجرت بلوغ جنسی است. همچنین مقادیر کورتیزول در مولدان ماده تاسماهی روسی در آغاز مهاجرت آنادرموس به میزان ۱۰۹/۷ng/ml و در مولدان ماده ازون برون به میزان ۱۷۰/۲ng/ml و در مولدان ماده فیل‌ماهی به میزان ١٦٥/٤ng/ml رسید [۱۳] که دلالت بر این موضوع دارد هورمون کورتیزول در زمان تولیدمثلی به علت سازگاری و مهاجرت ماهی با شرایط جدید بالاست. در حالی که چنین تغییراتی در ازون برون پرورشی مشاهده نشد. این امر را می‌توان به دلیل تطابق با شرایط پرورشی دانست.

بایونووا و همکاران (۲۰۰٦) با بررسی سطوح استروئیدهای جنسی و کورتیزول در خون ازون برون در جریان رسیدگی نهایی به وسیله تحریک با آنالوگ LH-RH-a دریافتند که بعد از تزریق LH-RH-a مقدار سطوح استروئیدهای جنسی و استرس قبل از اوولاسیون افزایش می‌یابد و سطوح T، کورتیزول پس از اوولاسیون کاهش می‌یابد. در نرها در شروع اسپرمیش به وسیله تحریک با LHRH-a یک بالارفتگی در سطوح کورتیزول و استروئیدهای جنسی(T) در ۸ ساعت پس از تزریق به ترتیب ۱۸۰ng/ml و ۲۷۰ng/ml مشاهده شد و در پایان اسپرم‌دهی هورمونهای جنسی و کورتیزول کاهش یافت. در حالی که در تحقیق انجام شده پس از اسپرم‌ریزی مقدار کورتیزول افزایش پیدا کرد. در استرلیاد، سطوح کورتیزول بعد از ۲۲ ساعت قبل از اوولاسیون، بعد از تزریق یک مرحله

Archive of SID
www.SID.ir

هیپوفیز و ۲۳ ساعت قبل از اوولاسیون و بعد از تزریق دوم GnRHa در ماده‌ها و در شروع اسپرم‌دهی در نرها ۹ ساعت بعد از استفاده از تزریق هیپوفیز و بعد از ۱۳ ساعت از تزریق LHRH-a بالا می‌رود [۱٤].

با توجه به نتایج دست آمده از مولدان ازون برون پرورشی، بیشترین مقدار کورتیزول در زمان اسپرم‌دهی مناسب ۱۳۷±۲۲/۱۲ng/ml و تکثیر موفق ۱۸۷±۳۰/۸۹ng/ml حاصل شد که با نتایج محققان دیگر مطابقت دارد.

در ماهیانی که از هیپوفیز برای تزریق استفاده شدند نسبت به گروه شاهد کورتیزول بالاتری را نشان دادند [۹، ۱۵] که نتایج به دست آمده با یافته‌های این تحقیق مطابقت دارد.

بایونووا و همکاران (۲۰۰٦) نشان دادند در مولدان نر ازون برون پرورشی بعد از انتقال به هچری سطوح هورمون کورتیزول بالا رفته و میزان هورمون تستوسترون و ۱۱ـ کتوتستوسترون کاهش می‌یابد، اما ارتباطی بین کورتیزول و سطوح استروئیدهای جنسی در مولدان ماده بعد از یک دوره نگهداری در استخرها و مولدان نر بعد از یک دوره نگهداری در مخزنها مشاهده نکردند. بعد از یک دوره نگهداری سطوح کورتیزول پایین اما سطوح T و KT-۱۱ بالا می‌رود. این نتایج نشان می‌دهد که شرایط نگهداری استرس‌زا نیست.

در مقایسه با دیگر گونه‌های ماهیان، پاسخهای اولیه و ثانویه استرس در تاسماهیان مقدار کمتری را نشان می‌دهد [۱٦-۱۸].

بهمنی و همکاران (۱۳۸۳) با بررسی کورتیزول در تکثیر مصنوعی ماهی ازون برون وحشی پس از تزریق GnRH، یک سیر صعودی را از ساعت صفر تزریق تا ۱۸ ساعت بعد از آن مشاهده کردند به طوری که مقدار آن قبل از تزریق ٦۰/۱۷±۱۲/۵۷ng/ml، ٦ ساعت پس از تزریق ۱۵۳/۸۳±۲٦/۳۲ ng/ml، ۱۲ ساعت پس از تزریق ۱۳۳/۸۲±۲٤/۷ng/ml و ۱۸ ساعت پس از تزریق ۲۰۲±٤۵/۲۱ng/ml مشاهده شد که مقدار کورتیزول در ۲٤ ساعت پس از تزریق در تحقیق حاضر در مرحله اوولاسیون شده (۱۸۷±۳۰/۸۹ ng/ml) نزدیک بود.

سطوح کورتیزول و شاخصهای خونی در این بررسی پس از تزریق GnRH تغییرات زیادی نشان داد. در این تحقیق مولدان ماده که تخمها به مرحله اوولـه رسیدند ائوزینوفیلها (۳/٦٦±/۳۳٪) در بالاترین مقدار نسبت به اوولـه نشده (۰/۷۵±/۷۵٪) بودند. درصد ائورینوفیلها در مولدان ماده در مرحله تکثیر بالاترین درصد بود و درصد نوتروفیل همگام با رسیدن به مرحله اوولاسیون سیر صعودی را نشان داد و در ماهیانی که دچار شیرشدگی شده بودند بالاترین درصد نوتروفیل را نشان داد. همگام با افزایش نوتروفیل (Nutrophilia) کاهش لمفوسیت (Lymphopenia) مشاهده شد. در مولدان نر همانند مولدان ماده درصد نوتروفیل سیر صعودی را در میزان اسپرم‌دهی طی کرد. این تغییرات در مولدان نر نسبت به ماده‌ها کمتر بود. در حالی که درصد ائورنیوفیلها در مولدان نر برخلاف مولدان ماده در زمان اسپرم دهی سیر کاهشی داشتند. به هر ترتیب، کاهش لمفوسیتها در استرس حاد و مزمن در ماهیان استخوانی شامل *Oncohrynchus kisutch* [۱۹]، ماهی آزاد*Salmo trutta* [۲۰، ۲۱]، گربه ماهی کانالی *Ictalurus puntactus* [۲۲]، کپور معمولی *Cyprinus carpio* [۲۳]، ماهی *Rhamdia quelen* [۲٤] وتاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* [۲۵] به اثبات رسید که با یافته های این تحقیق مطابقت دارد.

افزایش نوتروفیل (نوتروفیلیا) و کاهش لمفوسیت (لمفوپنیا) در ۱۸ ساعت به دنبال تزریق کورتیزول در ماهی *Ictalurus puntactus* مشاهده شد[۲۲].

سطوح کورتیزول و تعداد نوتروفیلها در سیستم جریان خون ماهیان استخوانی با هم رابطه مثبت دارد[۵]. این امر با نتایج به دست آمده در این مطالعه مطابقت دارد؛ به عبارتی بالارفتن کورتیزول در مولدان نر و ماده باعث افزایش درصد نوتروفیل و کاهش لمفوسیت شد به طوری که پس از تزریق این تغییرات نسبت به زمان صفر تزریق بالاترین مقدار را نشان داد. کورتیزول کاهش تعداد لمفوسیت B، T را منجر می شود[۱۹،۲۱].

Archive of SID

www.SID.ir

در گربه ماهی کانال *Ictaluruss punetatus* دچار استرس شده، نوتروفیل حدود ۳۰٪ لکوسیتها و در گربه ماهی فاقد استرس سطوح آنها حدود ۴٪ بود[۲۲]. در این تحقیق بالاترین درصد نوتروفیل در مولدان اوله نشده (۳/۵٪±۸۱/۵) دیده شد که نسبت به اوله شده (۳/۷۱٪±۵۵/۶۶)، اسپرم‌دهی مناسب (۸/۰۸٪±۵۶) و اسپرم‌دهی نامناسب (۸/۸۷٪±۵۴/۶۶) اختلاف معناداری نشان داد.

بهمنی و همکاران (۱۹۹۹) در تحقیقی روی فیل ماهیان پرورشی و تاسماهی ایرانی در گروههای سنی ۱، ۲ و۶ ساله میانگین نوسان سطوح ائورنیوفیلها را ۶/۶ تا ۱۳/۷٪ گزارش کردند[۲۶]. مطالعه انجام شده به وسیله پالی‌کُوا و همکاران (۱۹۹۹) روی فیل ماهی، ازون برون و تاسماهی سیبری نیز نوسان آنها را ۳ تا ۴/۶٪ نشان می‌دهد[۲۷].

در زمان تولیدمثلی درصد نوتروفیلها و ائوزینوفیلها در مولدان ماده ازون برون نسبت به نرها بالاتر بود. در حالی که درصد لمفوسیتها در ماهیان نر بالاتر بود. این نتایج مشابه تحقیقات محققان دیگر است [۲۸].

با توجه به نتایج به دست آمده و مقایسه آن با تحقیقات انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که کورتیزول و شاخصهای خونی به عنوان شاخصهای تأثیرگذار تکثیر در موفقیت یا عدم موفقیت تولیدمثل مؤثرند و محورHPG را تحت شعاع قرار می‌دهند.

کورتیزول لکوسیتوزیز را در نرهای رسیده و لکوپینیا را در افراد غیررسیده تحریک می‌کند. لکوسیتوزیز با افزایش ائوزینوفیل و کاهش لمفوسیت در سیستم خونی همراه است. لکوپینیا ممکن است تغییراتی در پراکنش لکوسیتها ایجاد کند. بیشترین آثار کورتیزول و اجزای مشخص استرس لکوگرام در ماهیان، کاهش لمفوسیتها (لمفوپینیا) و بالارفتن نوتروفیل (نوتروفیلیا) است[۵، ۲۲، ۲۹].

تفسیر آثار استرس روی سیستمهای ایمنی کاری مشکل است. به هر ترتیب پاسخهای ایمونولوژیکی به استرس به عملکرد هورمونهای مختلف وابسته است. این تداخل در ارتباط با یکدیگر است، ارتباط این هورمونها اغلب پیچیده است، اما در موارد زیادی تغییرات در سطوح هورمون پلاسما در ارتباط با تغییرات وضعیت ایمنی و سلامت ماهیان می‌باشد که این وضعیت برای سیستم آبزی پروری مهم است.

۵- سپاسگزاری

از تمام کارکنان بخش تکثیر و فیزیولوژی مؤسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان که در این پروژه همکاری داشتند، نهایت سپاس و قدردانی را دارم.

٦- منابع

[1] Belanger J. M., Son J. H., Laugero K. D., Moberg G.P., Doroshov S.I., Lankford S.E.; Effects of short-term management stress and ACTH injections on plasma cortisol levels in cultured white sturgeon, Acipenser transmontanus; Aquaculture; 2001; 203, 165-175.

[2] Moberg G. P.; Stress induced pathologies in fish: the cost of stress; NOAA Tech. Rep., NMFS; 1992; 111, 131-134.

[3] Donaldson E. M.; The pituitary– interregnal axis as an indicator of stress in fish; In: Pickering A.D. (Ed.); Stress and fish. Academic Press, New York; 1981; 11- 47.

[4] Barton B. A.; Stress in finfish: past, present and future-a historical perspective; In: Iwama G.K., Pickering A. D., Sumpter J. P., Schreck C.B.(EDs.); Fish Stress and Health in Aquaculture; Cambridge Univ. Press, New York, NY; 1997; 1-33.

[5] Wojtaszek J., Szwajkowska D.D., Gabska M.L., Adamowicz; Hematological Effects of High Dose of Cortisol on the Carp (Cyprinus carpio L.):

Archive of SID
www.SID.ir

[12] Semenkova T. B., Bayunova L. V., Boev A.A., Dybin V.P.; «Effect of stress on serum cortisol levels of sturgeon in aquculture»; *J. Appl. Ichthyol*; 1999; 15, 27-272.

[13] Barannikova I .A ., Bayunova I .v., Saenko I.I.; Dynamics of sex steroids of sturgeon (*Acipensre gueldenstaedti* Brandt) with various gonad states an the begnning of anadromous migration into Volga; vapors Ichtiologii; 1997; 37, 400-407.

[14] Barannikova I. V., Bayunova L. V., Kolmakov N.N., Semenkova T.; The Dynamics of Steroid Hormones in Blood under Hormonal Stimulation of Maturation in the Northern Dvina Sterlet (Acipenser ruthenus); Voprosy Ichthyologii; (In Russian); 2005; 45, 131-139.

[15] Semenkova T.; surgeon stress reaction inaquculture; *J. Appl .Ichthyol*; 2002; 18: 397-404.

[16] Baker D. W., Wood A. M., Litvak M. K., Kieffer J. D.; «Haematology of juvenile *Acipenser oxyrinchus* and *Acipenser brevirostrum* at rest and following forced activity»; *journal of fish Biology*; 2005; 66, 208-221.

[17] Keiffer J. D., Wakefield A. M., Litvak M. K.; «Juvenile exhibit reduced physiological responses to exercise»; *Journal of Experimantal Biological*; 2001; 204, 4281- 4289.

[18] Milligan C.L.; Metabolic recovery from exhausive exercise in rainbow trout; comparative Biochemistry and physiology; 1996; 113A. 51-60.

[19] McLeay D.J.; Effect of cortisol and dexamethasone on the pituitary-interrenal axis and abundance of white blood cells types in juvenile coho salmon, Onchorhynchus kisutch; Gen. Comp. Endocrinol; 1973; 21, 441-450.

[20] Espelid S., Lokken G.B., Steiro K., Bogwald J.; Effect of cortisol and stress on the immune system Cortisol Effect on the Carp Blood; Gen. Comp. Endocrinol; 2002; 125, 176-183.

[۶] بهمنی م.؛ «بررسی اکوفیزیولوژیک استرس از طریق اثر بر محور HPI, HPG سیستم ایمنی و فرایند تولیدمثل در تاسماهی ایرانی(*Acipenser persicus*)»؛ *رساله دکترا دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات*؛ ۱۳۷۸؛ ۲۷۴ ص.

[۷] بهمنی م.، کاظمی ر.، وهابی ی.، حلاجیان ع.، ملکزاده ر.، محسنی م.، مجازی امیری ب.؛ مطالعه فیزیولوژیک جهت بررسی نارسائیها در القای تکثیر مصنوعی ماهی ازون برون (Acipenser stellatus)؛ مؤسسه تحقیقات شیلات ایران؛ ۱۳۸۳؛ ۷۷ص.

[۸] یونسزاده م.، بهمنی م.، کاظمی ر.، یاوری و.، پوردهقانی م.، فیض بخش ح.، یوسفی ا.، حلاجیان ع.، دژندیان س.، زارع ر.، ناطقی ا.؛ «تأثیر بکارگیری GnRH بر روند رسیدگی جنسی ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*) پرورشی»؛ *مجله علمی- تخصصی دانشگاه آزاد اسلامی ،واحد آزاد شهر*؛ سال اول، پیش شماره ۱، ۱۳۸۵؛ صص ۹-۱۶.

[9] Bayanova L. V., Barannikova I. A., Dyubin V. P., Semenkova T. B.; cortisol and sex steroids profiles in stellate sturegeon female during maturation under pituitary preparation treatment in aquculture; In: proceedings of the 6th Int.symp.On Repr.Physiol.Of Fish; Eds; Norberg B., Kjesbi O.S., Tarranger G.I., Anderssonis E., Steffunson O.; July 4-9, 1999, Bergen, Norway, Bergen; 2000; p.418.

[10] Bayunova L., Canario A.M., Semenkova T., Dybin V., Svordlova D., Trenkler I.; «Sex steroids and cortisol levels in the blood of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* pallas) during final maturation induced by LH-RH-analogue»; *J. Appl. Ichthyol*; 2006; 22, 334-339.

[11] Pottinger T. G., Carrick T. R.; A comparison of glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress vespon sivenss in female rainbow trout; Aquculture; 1991; 175: 351-363.

Archive of SID

www.SID.ir

with emphasis on immunosuppressive effect; Aquaculture; 2004; 237, 229-236.

[۲۵] بهمنی م.؛ گزارش آموزش کوتاه مدت فیزیولوژی تولید مثل تاسماهیان؛ مؤسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، رشت؛ ۱۳۸۱؛ ۴۸ ص.

[26] Bahmani M., Kazemi R., Donskaya P.; A comparative study of some haematological features in young reared sturgeon; Fish Physiology and Biochemistry; 1999; 24, 135-140.

[27] Palikova M., Mares J., Jivasek J.; Characteristics of leuko cytes and thrombocytes of selected sturgeon species from in tensive breeding ACTA. Brono; 1999; 68: 259-264.

[28] Orun L., Dorucu M., Yazlak A.; «Haematological parameters of Three cyprinid Fish species from karakaya Dam Lake, Turkey»; *Journal of Biological Sciences*; 2003; 3(3): 320-328.

[29] Pickering A. D., Pottinger T. G.; Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effect of chrouic elevation of plasma cortisol; fish physiol and Biochem; 1989; 7: (253-258).

in Atlantic salmon (Salmon salar L); Fish Shellfish Immunol; 1996; 6, 95-110.

[21] Pickering A. D.; Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, Salmo truttaL; Gen. Comp. Endocrinol; 1984; 23, 163-175.

[22] Ellsaesser c., Miller N .W., Lobb C.J., Clem L.W.; A new metod for the cytochemical staining of cells immobilized in agarose: His tochemistry; 1984; Vol. 80, 559-562.

[23] Weyts F. A. A., Verburg-van Kemenade B.M.L., Flik G., Lambert J.G.D., Wendellar Bonga S.E.; Conservation of apoptosis as an immune regulatory mechanism: effect of cortisol and cortisone on carp lymphocytes. Brain Behav. Immun; 1997; 11, 95-105.

[24] Barcellos L. J. G., Kreutz L. C., Souza C. D., Rodrigues L. B., Fioreze I., Quevedo R. M., Cericato J., Lacerda A., Terra S.; Hematological changes in jundia (Rhamdia Guelen Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management,

Archive of SID

www.SID.ir