تغییرات هورمون کورتیزول تحت شرایط استرس در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorynchus mykiss*)

منصور شریفیان

موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران ـ صندوق پستی ۶۱۱۶

تاریخ دریافت : دی ۱۳۷۶ تاریخ پذیرش : اردیبهشت ۱۳۷۷

چکیده

باتوجه به اینکه ترشح هورمون کورتیزول به عنوان اولین پاسخ در مقابل استرس می‌باشد لذا بعد از حدوث استرسهای ناشی از تزریق هورمونهای جنسی، میزان هورمون کورتیزول در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، خون ماهیان مورد آزمایش بوسیله تکنیک Radio Immuno Assay در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری گردید. در این تحقیق میزان هورمون کورتیزول خون ماهیان در دقایق ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ بعد از حدوث استرسهای ناشی از عملیات صید و القاء مصنوعی اندازه‌گیری شد که طی دقایق مذکور میزان این هورمون روند فزاینده داشت. در این مطالعه مولدین قزل‌آلای رنگین کمان در سه گروه دهنائی مورد تزریق HCG، GnRH، آنتاگونیست دوپامین و آب مقطر قرار گرفتند. میزان کورتیزول خون در سطح آماری $P<0/01$ اندازه‌گیری شد. در سطوح کورتیزول پلاسمای خون ماهیان مورد تزریق، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. لذا نوع ماده القاءکننده، عامل استرس‌زا تلقی نمی‌گردید. تحقیق حاضر مؤید آن است که عملیات القاء مصنوعی استرس‌زابوده و بشدت منجر به افزایش سطح کورتیزول خون ماهیان می‌گردد. لذا روشهای تکثیر نیمه‌طبیعی، از طریق مدیریت بر فاکتورهای اکولوژیک (خصوصاً نور و حرارت و...) به منظور همزمان نمودن زمان تخم‌ریزی در ماهیان و به حداقل رساندن استرسهای محیطی، به روش القاء مصنوعی ارجحیت دارد.

مقدمه

امروزه اثرات حاد و مزمن استرسها بر سیستم تولیدمثلی و سطوح هورمونی مهره‌داران عالی به اثبات رسیده است لیکن مطالعات پیرامون اثرات استرسهای مختلف بر سیستم تولید مثلی

ماهیان بسیار نادر می‌باشد.

محیط زندگی ماهی سیستمی است که در آن عواملی از قبیل کیفیت آب، سرعت جریان آب، شدت نور، مقدار نور، درجه حرارت و اثرات متقابل محیطی مطرح است. در این عرصه، انسان به منظور احیاء ذخائر و مدیریت منابع آبی و غیره در این سیستم از طریق تیمارنمودن ماهی، پرورش مصنوعی ماهی و دستکاری نمودن این موجود دخالت نموده و باعث ایجاد استرس می‌گردد.

پاسخ در مقابل استرس در واقع یک سلسله از عکس‌العملهای غیراختصاصی ترجیحی موجودات در مقابل استرسهای حادث شده می‌باشد در این پدیده، واکنشهای فیزیولوژیک و رفتاری موجود زنده نقش بسیار مهمی را ایفاء می‌نماید.

واکنشهای مذکور به سازگارشدن موجود با موقعیت جدید کمک می‌نماید. سازگاری ماهیان در بعضی موارد به گونه‌ای است که این موجودات با شرایط زیست محیطی (که برحسب ظاهر می‌تواند باعث مرگشان شود) از قبیل درجه حرارتهای زیاد و فشارهای زیاد اعماق اقیانوسها سازش می‌یابند لیکن لازمه این سازش تغییراتی است که در ترشح هورمونها، متابولیسم ماهی و رفتار ماهی صورت می‌پذیرد.

Selye در سال ۱۹۴۶ بیان نمود که سطوح کورتیکوستروئیدها و کاتیکول‌آمین‌ها در برابر تغییرات شدید محیطی و رفتارهای تهاجمی افزایش می‌یابد لذا سطوح هورمونی مذکور به عنوان پاسخ اولیه (Primary stress response) در برابر هیجانات محیطی مطرح می‌باشد. همچنین Spieler در سال ۱۹۷۷ به نتایج مشابهی در خصوص ماهی طلائی (*Carasius auratus*) رسید.

Strange و همکاران در سال ۱۹۷۷ نشان دادند که اعمال دستکاری، حمل و تغییرات بستر و همچنین تغییرات درجه حرارت باعث افزایش گردش کورتیکوستروئیدها در گونه‌های مختلف آزاد ماهیان می‌شود.

Barton و همکاران در سال ۱۹۸۰ بیان نمودند که به دنبال افزایش سطوح کاتیکول آمین‌ها، سطوح هورمونی کورتیزول خون افزایش یافته و ارتقاء این هورمونها در طی چرخه‌های متابولیکی منجر به افزایش سطح گلوکز پلاسمای خون شده و موجبات افزایش اسیدهای چرب آزاد موجود در پلاسما را فراهم می‌کند. ذخائر هورمونی مذکور باعث افزایش شدت فعالیتهای متابولیک در طی دوران استرس می‌گردد. در یک دورهٔ طولانی اگر استرس ایجاد شده از ظرفیت

پذیرش موجود زنده تجاوز نماید منجر به ایجاد محدودیتهائی در رشد و تولید مثل خواهد شد. این شرایط سبب تحریک فعالیتهای عصبی غدد آندوکرینی شده و نهایتاً سیستم کورتیکوستروئیدها فعال گردیده و کاتکول آمین‌ها ترشح می‌شوند. اقداماتی نظیر محصور نمودن محیط زیست ماهی، حمل ونقل ماهی و دستکاری نمودن آن باعث تغییر در ترشحات غدد آندوکرینی و پاسخهای متابولیکی می‌شود.)

Montalambert و همکاران در سال ۱۹۷۸ گزارش نمودند که بعد از دستکاری و محصور نمودن اردک ماهی محدودیتهائی پیرامون پاسخهای تخمدانها در برابر هورمونهای محرک گنادتروپین ایجاد شده و این واکنشها سبب بسته شدن مجاری فولیکول می‌گردد.

استرسهای محیطی باعث می‌شوند تا عوامل کنترل کننده کورتیکوتروپین نظیر Corticotropin Releasing Factor از انتهای رشته‌های عصبی در قسمتهای خلفی و میانی هیپوتالاموس ترشح شود در نتیجه هورمون محرک سلولهای قشر فوق کلیوی یا (ACTH) ترشح و موجب فعالیت قسمت میانی سلولهای قشر فوق کلیوی شده و هورمون کورتیزول ترشح می‌شود. لذا هورمون کورتیزول بعنوان مهمترین هورمون منتج از شرایط استرس شناخته شده و قابل اندازه‌گیری می‌باشد (Fevolden *et al.*, 1991).

مواد و روشها

در ابتداء مولدین بوسیله توردستی (ساچوک) صید و سپس بداخل برانکاردهای محتوی ماده MS-222 منتقل گردیدند. پلاکهای پلاستیکی بوسیله سوزن بخیه به باله پشتی مولدین متصل و به صورت جداگانه توزین و زیست‌سنجی شدند. در این خصوص دامنه تغییرات طولی و اندازه دورسینه به ترتیب بین ۴۶ تا ۶۰ سانتیمتر و ۱۳ تا ۱۷ سانتیمتر بود.

بیست عدد ماهی از بین جمعیت ماهیان بصورت تصادفی انتخاب و عملیات خون‌گیری روزانه در ساعت ۱۰ صبح از ساقه دمی ماهیان انجام شد (نیم ساعت پس از صید). مشخصات ماهیان برروی لوله‌های آزمایش درج و نمونه‌های خون به‌منظور اندازه‌گیری میزان کورتیزول خون به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

براساس اوزان مولدین تزریق هورمونهای HCG (Human Chorionic Gonadotropin) با مقدار ماده مؤثر ۱۱۰۰ IU/Kg، GnRH (Gonadotropin Releasing Factor) با مقدار مؤثر

۲ µg/kg و آنتاگونیست دوپامین با مقدار ماده مؤثر ۲/۵ mg/kg و آب مقطر به میزان ۰/۵ CC/Kg به سه گروه ده تائی ماهی تزریق گردید. به فاصله ۳۰ دقیقه بعد از تزریق عمل خون‌گیری به میزان ۲cc از ساقه دمی انجام شد و نمونه‌های خون ماهی به داخل لوله‌های آزمایش (خشک و استریل) منتقل گردیدند. این لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه برای تشکیل لخته در دمای اتاق نگهداری و سپس به داخل سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه و سرعت (RPM) ۸۰۰ جهت جداسازی سرم خون قرار گرفتند (عریان ، ۱۳۷۳). بعد از جداسازی، سرم به وسیله پیپت مخصوص داخل لوله‌های آزمایش (Venject) خشک و استریل ریخته شده و درب آنها بوسیله پارافیلم مسدود گردید. لوله‌های آزمایش محتوی سرم خون بوسیله برچسب علامت‌گذاری و جهت انجام مراحل بعدی به داخل فریزر، به منظور انجماد هر چه سریعتر، منتقل گردیدند. در این مرحله از گروههای سه گانه مورد اشاره فوق بعد از حدوث استرس ناشی از تزریق هورمون (تقریباً به مدت ۳ ساعت بعد از خون‌گیری مقدماتی) ۵ عدد ماهی بصورت اتفاقی انتخاب و از این ماهیان در دقایق ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ بعد از تزریق خون‌گیری بعمل آمد و به طریق فوق‌الذکر خون این ماهیان جهت اندازه‌گیری کورتیزول به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه به وسیله روش Radio Immuno Assay با فاز جامد نمونه‌هائی که به دمای اتاق رسانیده شده بودند مطابق دستورالعمل خاص کیت سنجش کورتیزول میزان این هورمون تعیین گردید و میانگین مقادیر بدست آمده، با استفاده از روش Duplicate test، زمانی که نتایج به هم نزدیک بودند مورد قبول واقع می‌شدند.

مقایسه آماری (آزمون t) بین خون بیست عدد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در زمانهای قبل و بعد از تزریق هورمون و مقایسه آماری میزان کورتیزول خون ماهیان مولد قزل‌آلا براساس نوع هورمون تزریق شده بوسیله آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) مقایسه و میزان کورتیزول خون ماهیان براساس استرس ایجاد شده در زمانهای مختلف بدست آمد.

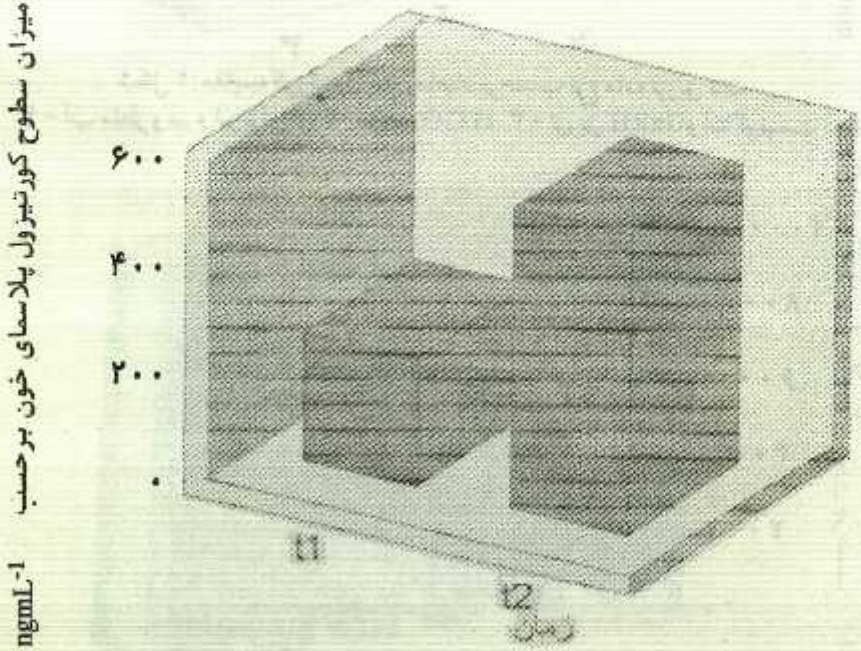
نتایج

تحقیق حاضر مؤید آن بود که عملیات القاء مصنوعی استرس‌زا بوده، بطوریکه مقایسه تغییرات سطوح کورتیزول خون ماهیان در زمانهای قبل و بعد از عملیات مذکور، (شکل ۱) بیانگر آن بود که ارتقاء سطوح کورتیزول خون ماهیان بعد از وقوع استرس ناشی از القاء مصنوعی بوده

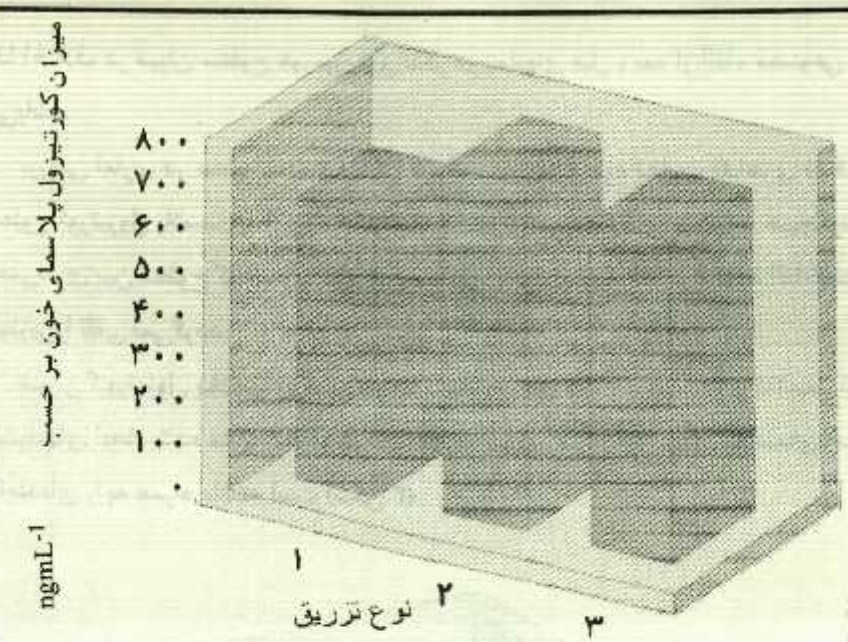
لذا اختلاف در میزان سطوح هورمون فوق‌الذکر در زمانهای قبل و بعد از القاء مصنوعی معنی‌دار می‌باشد.

بررسی آماری در سطح P<۰/۰۱ نشان داد که علیرغم وجود تفاوت ظاهری (شکل ۲) در سطوح کورتیزول پلاسمای خون ماهیان مورد تزریق در تیمارهای مختلف هیچگونه تفاوت معنی‌داری بین سطوح کورتیزول خون این ماهیان وجود نداشت. لذا نوع مادهٔ القاءکننده ماهی استرس‌زا تلقی نمی‌گردد.

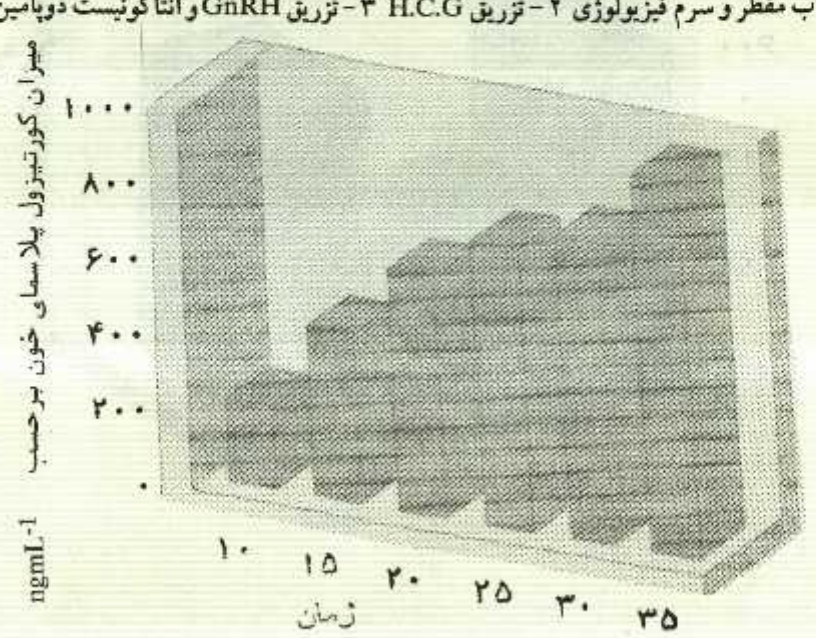
میزان کورتیزول پلاسمای خون در طی دقایق ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ بعد از حدوث استرسهای ایجاد شده نشان داد که در طی دقایق مذکور میزان کورتیزول پلاسمای خون روند فزاینده‌ای را به همراه داشته است (شکل ۳).



شکل ۱: مقایسه میزان کورتیزول خون ماهیان در زمانهای قبل و بعد از القای مصنوعی
۱ – میزان کورتیزول پلاسمای خون قبل از القای مصنوعی
۲ – میزان کورتیزول پلاسمای خون بعد از القای مصنوعی



شکل ۲ : مقایسه کورتیزول خون ماهیان برحسب نوع ماده تزریق شده
۱ - آب مقطر و سرم فیزیولوژی ۲ - تزریق H.C.G ۳ - تزریق GnRH و آنتاگونیست دوپامین



نمودار ۳: مقایسه میزان سطوح کورتیزول خون ماهیان در دقایق ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ بعد از حدوث استرس ناشی از القاء مصنوعی.

بحث

زمانیکه ماهی تحت تأثیر تغییر شرایط محیطی ناگهانی قرار می‌گیرد حالت استرس برای ماهی ایجاد می‌گردد و محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - آدرنال فعال شده و به دنبال ترشح ACTH (Adeno Corticotropin Hormone) ترشح کورتیزول خون ماهی افزایش می‌یابد. هورمون مذکور در این حالت می‌تواند طی مکانیسم‌های پس خوران (feed back) اثرات ممانعت کننده خود را بر روی محورهای HPG (Hypothalamus Pituitary Gonada) و HPI (Hypothalamus Pituitary Internal) اعمال نماید و یا به عبارت دیگر تمرکز فاکتورهای مغزی برروی تغییرات شرایط محیطی و فعالیتهای سازشی بدن موجب گردیده تا تأثیرات محرکه‌های فعال کننده مغزی بر روی غدد جنسی کاهش یابد. اثرات ممانعت کننده فاکتورهای محیطی می‌تواند سبب توقف مراحلی چند از سیستم تولید مثلی شود در این میان اثرات بازدارنده فاکتورهای محیطی بر روی مراحل گامت‌زائی (Gametogenesis) و بلوغ تخمکها (Oocyte maturation) و رهاسازی تخمکها (Ovulation) و رفتارهای تخم‌ریزی (Spawning behaviour) شایان ذکر می‌باشد (عریان ، ۱۳۷۳).

در این راستا افزایش هورمون کورتیزول که به عنوان مهمترین هورمون منتج از شرایط استرس می‌باشد صرفاً به‌منظور ارتقاء قدرت پایداری ماهی در برابر استرس حادث شده، می‌باشد که در این میان کورتیزول علاوه بر نقش مزبور، برمتابولیسم کربوهیدرات، پروتئین و... اثر گذاشته و فعالیت بدن را با تغییر شرایط بیرونی سازگار می‌نماید.

Pickering & Christie در سال ۱۹۸۱ بیان نمود میزان کورتیزول پلاسمای خون ماهیان قزل‌آلا در شرایط طبیعی کمتر از $5\ ngmL^{-1}$ می‌باشد لذا هر گونه افزایش در این مقدار بمنزله استرسهای حادث شده بر روی ماهی می‌باشد.

با استفاده از هورمونهای القاء کننده نظیر GnRH و HCG می‌توان دو تا سه هفته زمان تخمریزی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را به جلو انداخت لیکن اثرات ممانعت کننده ناشی از عملیات صید و القاء مصنوعی از طریق مکانیسمهای هورمونی یاد شده باعث ایجاد استرسهای شدید گردیده و موجبات کاهش در راندمان فرآیندهای تولید مثلی در ماهی می‌شود لذا روشهای تکثیر نیمه طبیعی از طریق مدیریت بر فاکتورهای اکولوژیکی (خصوصاً فاکتورهای نور و حرارت) بمنظور همزمان نمودن زمان تخمریزی و جلو انداختن زمان مذکور و همچنین به حداقل رساندن استرسهای محیطی بر روش القاء مصنوعی رجحان می‌یابد.

تشکر و قدردانی

از زحمات اساتید ارجمند سرکار خانم دکتر شهربانو عریان و آقای دکتر کاظم پریور که با راهنمائیهای ارزشمند خویش نگارنده را در انجام این تحقیق هدایت نموده‌اند تشکر می‌گردد.

منابع

عریان، ش.، ۱۳۷۳. فیزیولوژی ماهی - دانشگاه تربیت معلم. ۶۰ صفحه.

لیت ریتز، الف.، ۱۳۶۰. راهنمای تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا و ماهی آزاد. ترجمه : حسین عمادی. ماهنامهٔ آبزیان، تهران. ۲۱۲ صفحه.

Barton, B.A. ; Peter, R.E ; Paulencu, C.R. , 1980. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Oncorynchus mykiss*) at rest, and subjected to handling confinement, Transport, and stocking con. J. Fish. Aquat.sci. 37, pp.805-811.

Fevoldon, S.E. ; Rofstie, T. ; Rood, K.H. , 1991. Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 95. pp.53-69.

Montalembert, G. ; Bry, C. ; Billard, R. 1978. Control of reproduction in northern Pike. Spec. Publs Am. Fish. Soc. 11. pp.217-225.

Pickering, A.D. ; Christie, P. , 1981. Changes in the concentrations of plasma cortisol and thyroxine during sexual maturation of the hatchery rearod brown trout, *salmo trutta* L. Gen Comp. Endocn. 44 (in press).

Selye, H.1946. The general adaptation syndrome and disease of adaptation. J.elin Endocr. 69. pp.117-230.

Spieler, R.E , 1977. Short term serum cortisol concentration in gold fish (*Carasius auratus*) subjected to serial sampling and restriant. J. Fish. Res. Bd Can. 31. pp.1240-1242.

Strange, R.J. ; Schreck, C.b. ; Golden, J.T. , 1977. Corticoid stress rosponses to handling and temperature in salmonids. Fish. Soc. 106, pp.213-218.

Changes of Cortisol Hormone Caused by Stressing Rainbow Trout

Sharifian M.

I.F.R.O.

P.O.Box : 6116 Tehran, Iran

recived : January 1998 accepted : May 1998

ABSTRACT

Chronic and acute effects of stress on the reproductive system and hormonal balance in higher vertebrates is well documented, but the subject is little investigated on fish. Understanding the cources of stress to eleminate or minimize them, will contribute to designing culture systems, or methodes, based on the physiological requriments of fish. This will consequently enhance production of cultured fish. This study has investigated the effects of stress as a result of handling and induced spawning through injection of HCG (1100 IU/kg), GnRH (2 Ug/kg), dopamin antagonist (25 mg/kg) and distilled water (0.5 cc/kg). Taking into consideration that the secretion of cortisol is the first response to stress, therefor the level of cortisol in the blood of injected fish (rainbow trout spawners) was compared by using Radio Immuno-Assay technic. In three treatments cortisol level of blood after 10, 15, 20, 25, 30 and 35 minutes after stress was measured. The present study showed a significant increase in the level of cortisol in the blood of fish compared to uninjected control treatment. This increase was caused by stress related to handling and spawning.

There were no highly significant difference ($P<0.01$) in the cortisol level among the fish injected with HCG, GnRH and dopamin antagonist. The type of injecting material does not make a difference in the amount of stress and cortisol level. This research has concluded that handling and injection make a significant stress for the spawning fish. It is recommended to use ecological factors to persuade natural spawning without disturbance and injections.