اثر استرس‌های حاد بر تغییرات کورتیزول، آنتی پروتئاز و پارامترهای خونی ماهیان طلائی (*Carassius auratus*)

سبحان رعنای اخوان*[۱]، خلیل اسلاملو[۲]، فرزین جمال زاد فلاح[۳]

۱، ۲- دانشگاه گیلان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، صومعه سرا، گیلان، ایران، صندوق پستی :۱۱۴۴

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

تاریخ دریافت: ۲۰ تیر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۱۰ آبان ۱۳۹۱

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تاثیر استرس‌های حاد متوالی بر روی وضعیت فیزیولوژیک و پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی ماهی طلائی *Carassius auratus* انجام شد. استرس حاد به کار گرفته شده در این آزمایش شامل ۳ دقیقه تعقیب ماهیان و به دنبال آن ۲ دقیقه در معرض هوا گذاشتن آن‌ها بود که این عمل بصورت ۳ مرحله در طول مدت یک روز به اجرا در آمد. علاوه بر این یک گروه از ماهیان به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد که هیچ گونه استرسی روی آن‌ها اعمال نشد. نمونه های خون از ماهیان استرس دیده و شاهد برای ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیک و ایمنولوژیک در فواصل زمانی ۱۲، ۴۸ و ۱۲۰ ساعت پس از آخرین استرس جمع‌آوری گردید. سطوح کورتیزول و گلوکز پلاسما در ماهیان استرس دیده به صورت معنی‌داری نسبت به ماهیان کنترل تا ۴۸ ساعت پس از استرس بالاتر بود که نشان دهنده تاثیر زمان استرس بر روی کورتیزول بود. پارامترهای هماتولوژیک و پروتئین کل پلاسما یا آلبومین و گلوبولین تفاوت معنی‌داری در بین دو تیمار و در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نداشت. فعالیت لایزوزیم پلاسما در ماهیانی که در معرض ۳ بار استرس قرار گرفته بودند به میزان قابل توجهی در ۱۲ و ۴۸ ساعت پس از استرس افزایش یافت و بالاتر از میزان آن در ماهیان گروه کنترل بود. از سوی دیگر فعالیت آنتی‌پروتئازهای پلاسما در بین دو گروه و زمان‌های مختلف نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری نداشت. این مطالعه نشان داد که استرس حاد ممتد می‌تواند سبب ایجاد استرس طولانی مدت در ماهیان طلائی شود و این گونه توانایی ایجاد تطابق با استرس حاد را ندارد.

کلمات کلیدی: ماهی طلائی (*Carassius auratus*)، استرس مداوم، کورتیزول، ایمنی غیر اختصاصی.

* عهده دار مکاتبات (✉). Sobhan_akhavan@yahoo.com

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]

مقدمه

به طور کلی ماهیان در پروسه آبزی‌پروری در معرض عوامل استرس زای حاد و مزمن زیادی مانند دستکاری، حمل و نقل، رقم بندی، تغییرات دمایی، تراکم بالای پرورشی و کیفیت پایین آب پرورشی قرار می گیرند که این عوامل می‌تواند سبب ایجاد تغییرات فیزیولوژیک در ماهیان شود. بنابراین، رشد، رفتار، آرامش و تولید مثل ماهیان به میزان بسیار زیادی می‌تواند تحت تاثیر عوامل بیماری زا قرار بگیرد (Conte, 2004). زمانی‌که ماهی در معرض عوامل استرسی قرار می‌گیرد، پاسخ اولیه سبب تحریک محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-فوق کلیه (HPI) و ترشح هورمون آدرنوکورتیکوئید (ACTH) و متعاقبا آزاد شدن کاتکول آمین ها به داخل جریان خون و افزایش سطوح کورتیزول می شود (Barton, 2002). سطوح بالای کاتکول آمین‌ها در پلاسما سبب تحریک تبدیل گلیکوژن ذخیره شده به گلوکز از طریق گلیکوژنز می‌شود که از اینرو سطوح بالاتر گلوکز به عنوان پاسخ استرسی ثانویه مشهود است (Mazeaud, *et al*., 1977).

استرس و یا تحریک کورتیزول تاثیر قابل توجهی بر سیستم ایمنی بدن دارد و به خوبی مشخص شده که سبب ایجاد تغییراتی در پاسخ‌های ایمنی ماهیان و همچنین سبب افزایش حساسیت‌پذیری به پاتوژن‌های طبیعی و کاهش مقاومت در برابر بیماری می‌شود (Pruett, 2003; Tort, 2011). تغییرات ایمنولوژیک ماهیان در شرایط استرسی می‌تواند تحت تاثیر نوع استرس (حاد یا مزمن)، گونه و وضعیت فیزیولوژیک قرار بگیرد (Tort, 2011). گزارش شده است که استرس حاد سبب تحریک برخی از پاسخ‌های ایمنی در ماهیان می‌شود (Jiang, *et al*., 2008; Tort, 2011). هر چند برخی اثرات مخرب استرس حاد بر سیستم ایمنی نیز به اثبات رسیده است (Costas, *et al*., 2011; Tort, 2011). از سوی دیگر، استرس‌های مزمن به طور عمده به صورت مخربی سبب تعدیل پاسخ‌های ایمنی در ماهیان می شوند (Vazzana, *et al*., 2002; Tort, 2011). با توجه به این‌که نتایج متناقضی در مورد اثرات استرس بر ایمنی هومورال در مطالعات مختلف ماهیان مشاهده شده است، اثرات استرس به عنوان یک تنظیم کننده ایمنی به صورت مشخص در ماهیان شناسایی نشده است و مطالعات بیشتری در این رابطه مورد نیاز است (Pruett, 2003). علاوه بر این، هیچ مطالعه مرتبطی در ارتباط با تغییرات ایمنولوژیک در ماهیانی که در معرض استرس‌های حاد متوالی قرار گرفتند وجود ندارد.

به دلیل افزایش تمایل به نگهداری ماهیان آکواریومی، صنعت پرورش ماهیان زینتی به صورت گسترده ای در سرتاسر دنیا رشد پیدا کرده است. ماهیان زینتی به صورت مرتب در معرض عوامل استرس‌زای حاد زیادی مانند تعقیب و گریز، تغییرات دمایی، دستکاری، رقم‌بندی و در معرض هوا قرارگرفتن در زمان پرورش، انتقال و فرایند فروش هستند (Lim, *et al*., 2003). از این‌رو، پاسخ‌های فیزیولوژیک و ایمنولوژیک این ماهیان و متعاقب آن سلامتی و حساسیت‌پذیری این ماهیان به عوامل بیماری‌زا می‌تواند به طور گسترده‌ای تحت تاثیر استرس قرار بگیرد. ماهیان طلائی، *Carassius auratus* از پر طرفدارترین و جالب‌ترین گونه‌ها در بین ماهیان زینتی است که نیز از ارزش بالایی به لحاظ اقتصادی در صنعت ماهیان زینتی برخوردار است (Lee and Newman, 1997). ماهی

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]

طلائی همچنین به صورت قابل توجهی در مطالعات فیزیولوژیک به عنوان مدل بیولوژیک شناخته می‌شود (Roberts and Loop, 2004) و نتایج مطالعات بر روی این گونه را می‌توان به طیف وسیعی از ماهیان تعمیم داد. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی اثرات طولانی مدت استرس‌های حاد متوالی بر تغییرات فیزیولوژیک و پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی ماهیان طلائی انجام شد.

مواد و روش‌ها

ماهیان

۱۸۰ ماهی طلائی نوجوان (بچه ماهی طلایی) با میانگین وزنی ۰/۷۲ ± ۲۲/۶۳ گرم (میانگین± SE) پرورش یافته در تانک‌های مستطیلی شیشه‌ای به ابعاد (سانتی‌متر ۳۵ × ۳۰ × ۵۰) و حجم آبگیری ۵۲ لیتر برای این مطالعه به کار گرفته شدند. ماهیان به صورت کاملاً تصادفی در ۱۸ تانک توزیع شدند به طوری که ۱۰ ماهی در هر تانک ذخیره گشت. اکسیژن محلول در طول مدت مطالعه به وسیله هوادهی و فیلتراسیون با استفاده از کمپرسور هوا تامین شد. ۲۰٪ آب هر تانک به صورت روزانه با آب کلرزدائی شده شهری تعویض شد. جهت سازگاری، ماهیان به مدت ۳ هفته در تانک‌ها پرورش یافتند و بر حسب اشتهای ظاهری روزانه دو بار در ساعت‌های ۷ و ۲۳ با جیره تجاری (Energy 4EF3001, Thailand، رطوبت ۱۲٪، پروتئین خام ۴۱٪، چربی خام ۶٪ و فیبر ۲٪) تغذیه شدند (در حدود ۳٪ وزن بدن). رژیم نوری به صورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. تغییرات پارامترهای کیفی آب در طول مدت مطالعه به صورت دما؛ ۰/۱۳ ± ۲۵/۳ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول؛ ۰/۷± ۶/۳ میلی‌گرم بر لیتر، آمونیاک؛ ۰/۰۱ ± ۰/۱۱ میلی‌گرم بر لیتر، نیترات؛ ۰/۰۰۷± ۰/۰۴، سختی؛ ۴/۸۴± ۱۹۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر و pH ۰/۰۷± ۷/۴ بود.

استرس حاد به کار گرفته شده و نمونه-برداری

پس از ۳ هفته آداپتاسیون، ماهیان در یک روز ۳ بار با فاصله ۸ ساعت در معرض استرس قرار گرفتند. استرس حاد به کار گرفته شده در هر زمان شامل ۳ دقیقه تعقیب و گریز و پس از آن ۲ دقیقه قراردادن ماهیان نگهداری شده در تور، در معرض هوا بود.

برای بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک و ایمنولو-ژیک ماهیان به استرس‌های متوالی، نمونه‌های خون به ترتیب پس از ۱۲، ۴۸ و ۱۲۰ دقیقه پس از آخرین زمان استرس‌دهی تهیه شد. برای هر زمان نمونه‌برداری سه تانک یا تکرار به صورت جداگانه به کار گرفته شد. علاوه بر این، نمونه‌های خون ماهیان استرس ندیده نیز در سه تانک برای هر زمان نمونه برداری به عنوان نمونه‌های کنترل به کار گرفته شد. بنابراین برای نمونه-گیری از هر تیمار در هر یک از زمان‌های نمونه برداری، از ماهیان ۳ تانک به صورت جداگانه استفاده شد.

ماهیان ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری گرسنه نگه داشته شدند. جهت جمع‌آوری نمونه‌های خونی، ۶ ماهی هر تانک به آرامی صید و با کمترین استرس و ایجاد مزاحمت برای سایر ماهیان با استفاده از ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پودرگل میخک بیهوش شدند. پس از بیهوشی، ۰/۸-۰/۶ میلی‌لیتر نمونه خون از سیاهرگ دمی با استفاده از سرنگ‌های هپارینه ۲ میلی‌لیتری جمع آوری شد. سپس نمونه‌های خون با دور g×۳۰۰۰ برای

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]

مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و پلاسمای جمع‌آوری شده از ۲ ماهی هر تانک با هم مخلوط شد، به طوری که سه نمونه پلاسما برای هر تکرار تهیه شد. نمونه‌های پلاسما در ۷۰- درجه تا زمان انجام آنالیز منجمد شد. علاوه بر این، ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه خون هپارینه از ۳ ماهی دیگر هر تکرار برای ارزیابی شاخص‌های هماتولوژیک جمع‌آوری شد.

سنجش پارامترهای هماتولوژیک

جهت اندازه‌گیری هماتوکریت (Hct) لوله‌های موئینه هپارینه با نمونه‌های خون پر شد و پس از آن با خمیر مخصوص بسته و به وسیله سانتریفیوژ میکرو-هماتوکریت با سرعت g ×۷۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مقدار حجم سلولی یا هماتوکریت هر نمونه‌ی خون محاسبه شد (Barros, *et al*., 2002). میزان هموگلوبین (Hb) هر نمونه‌ی خون به وسیله‌ی کیت مخصوص شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) و به روش رنگ سنجی با طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتوفتومتر، میزان جذب نور ثبت و غلظت هموگلوبین محاسبه شد (Drobkin, 1945).

شاخص‌های استرس

اندازه‌گیری کورتیزول پلاسما با روش آزمایشگاهی Radioimmunoassay (RIA) انجام گردید. کورتیزول با واحد ng/ml و با کیت Immunotech ساخت فرانسه اندازه‌گیری شد (Olsen, *et al*., 1995). گلوکز با کیت Greiner ساخت آلمان بر مبنای واکنش رنگ سنجی حاصل از تجزیه قند به کینون ایمین و سنجش مقدار آن با واحد میلی‌گرم در دسی لیتر و با دستگاه اتوآنالایزر (Technicon RA-1000, USA) انجام گرفت. اندازه‌گیری با طول موج ۵۰۰ نانومتر و در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد (Wedemeyer, *et al*., 1990).

پروتئین کل، آلبومین و گلوبین

کمیت پروتئین کل پلاسما با استفاده از کیت (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد پروتئین تعیین شد (Bradford, 1976). آلبومین پلاسما بر اساس شیوه رنگ سنجی در ۶۲۰ نانومتر تعیین شد (Nicholson, *et al*., 2000) (QuantichromTM BCG Albumin Assay Kit). علاوه بر این، محتوای کل گلوبین با تفریق آلبومین از کل پروتئین به دست آمد (Kumar, *et al*., 2005).

پاسخ‌های ایمنی

فعالیت آنتی پروتئازهای پلاسما

فعالیت کلی آنتی پروتئاز با استفاده از پتانسیل پلاسما برای ممانعت از فعالیت تریپسین محاسبه شد (Magnadottir, *et al*., 1999). به طور خلاصه، ۲۰ میکرولیتر از پلاسما در دمای ۲۲ درجه در میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه با ۲۰ میکرولیتر محلول استاندارد تریپسین (BAEE, 5 mg ml^{-1}) انکوباسیون شد. متعاقب آن ۲۰۰ میکرولیتر از فسفات بافر ۰/۱ مولار و ۲۵۰ میکرو لیتر از آزوکازئین ۲٪ (w/v) اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه انکوباسیون شد. پاسخ آن با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک (TCA) که به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه انکوباسیون شده بود و پس از آن به مدت ۵ دقیقه با دور g ×۶۰۰۰ سانتریفوژ شده بود، متوقف گشت

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]

میزان شدت نوری محلول رویی در طول موج ۴۳۰ nm توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت می گردد.

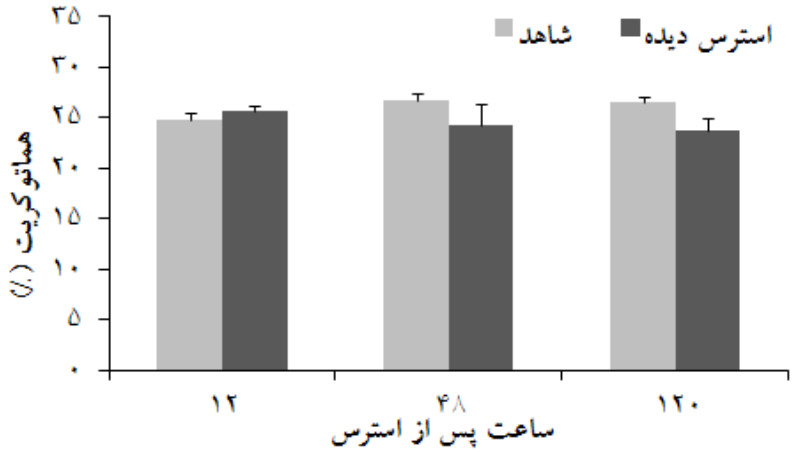
آنالیز آماری

نرمال بودن داده‌ها به کمک آزمون Kolmogorov-Smirnov و همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون Levene's مورد سنجش قرار گرفت. مقایسه بین تیمارها به وسیله آنالیز واریانس دو طرفه و در صورت وجود اختلاف از آزمون Tukey's برای تعیین تفاوت‌های معنی‌داری بهره گرفته شد. تفاوت‌ها زمانی که $P\leq ۰/۰۵$ بود، معنی داری در نظر گرفته شد. کلیه اعداد مطالعه به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد. همچنین کلیه آنالیزها به وسیله نرم افزار SPSS (نسخه ۱۵، شیکاگو، آمریکا) انجام گرفت.

نتایج

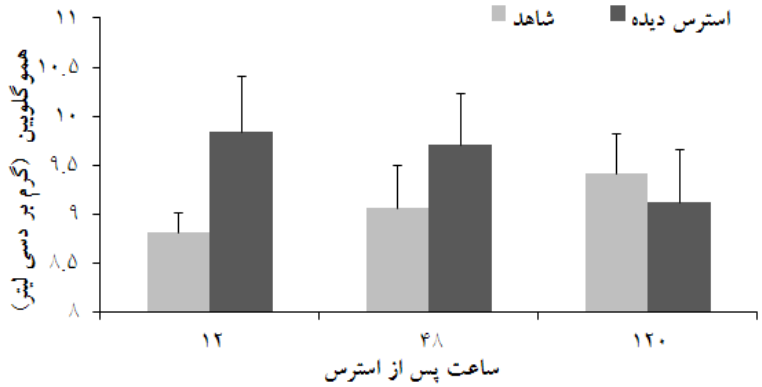
پارامترهای هماتولوژیک

به لحاظ هماتوکریت و هموگلوبین در بین ماهیان دو تیمار اختلاف معنی داری یافت نشد (شکل ۱و ۲). دامنه تغییرات هماتوکریت در ماهیان این مطالعه بین ۲۳/۸ درصد در ۱۲۰ ساعت پس از استرس در ماهیان استرس دیده تا ۲۶/۷۷ درصد در ماهیان تیمار کنترل در نمونه‌برداری ۴۸ ساعت مشاهده شد. به لحاظ هموگلوبین ماهیان استرس دیده مقادیر بالاتری را در نمونه‌های ۱۲ و ۴۸ ساعت به نمایش گذاشتند، اما مقادیر هموگلوبین در نمونه‌های ۱۲۰ ساعت در ماهیان کنترل بالاتر بود هر چند این اختلافات معنی‌دار نبود (شکل ۲).



شکل ۱: تغییرات هماتوکریت در ماهیان طلائی پس از قرار گرفتن در معرض استرس حاد در مقایسه با ماهیان استرس ندیده. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار

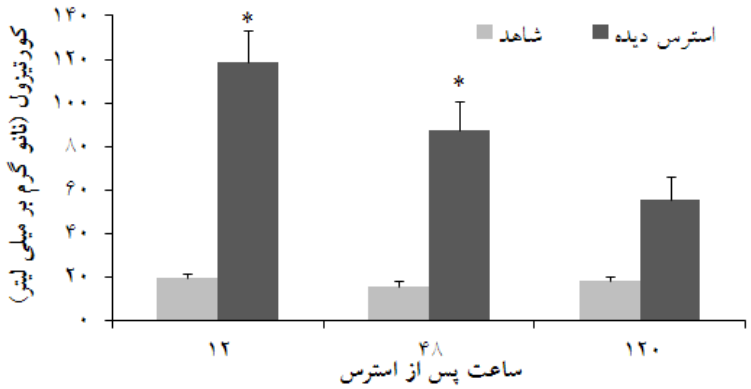
[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]



شکل ۲: تغییرات هموگلوبین در ماهیان طلائی پس از قرار گرفتن در معرض استرس حاد در مقایسه با ماهیان استرس ندیده. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار

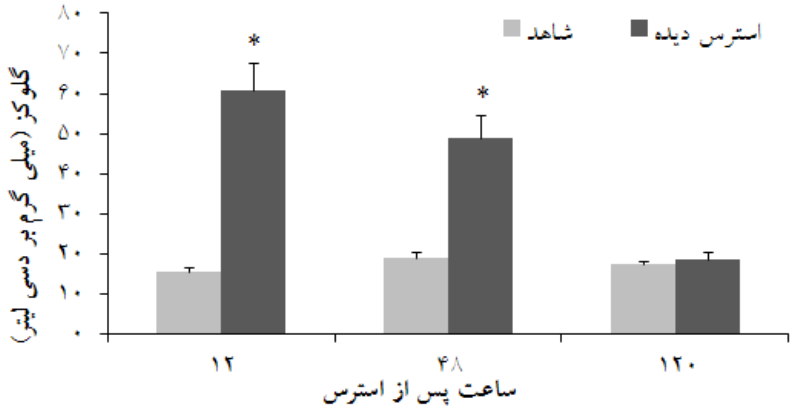
شاخص‌های استرس

میزان کورتیزول (شکل ۳) و گلوکز پلاسما (شکل ۴) اختلاف معنی‌داری را بین ماهیان استرس دیده و کنترل در ساعات ۱۲ و ۴۸ پس از استرس به نمایش گذاشت ($P<۰/۰۵$). این مقادیر در نمونه‌های ۱۲۰ ساعت پس از استرس نیز در ماهیان تیمار استرس دیده در مقایسه با کنترل بالاتر بود اما این اختلاف معنی دار نبود. دامنه تغییرات کورتیزول از ۱۵/۶۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر در ماهیان کنترل در نمونه‌های ساعت ۴۸ تا ۱۱۸/۷۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر در نمونه‌های ساعت ۱۲ ماهیان استرس دیده نوسان داشت. این در حالی بود که دامنه تغییرات گلوکز پلاسما از ۱۵/۳۳ میلی‌گرم بر دسی لیتر در ماهیان کنترل در نمونه‌های ساعت ۱۲ تا ۶۰/۹۱ میلی‌گرم بر دسی لیتر در نمونه‌های ساعت ۱۲ ماهیان استرس دیده نوسان داشت (شکل ۴).



شکل ۳: تغییرات کورتیزول در ماهیان طلائی پس از قرار گرفتن در معرض استرس حاد در مقایسه با ماهیان استرس ندیده.
مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار
* نشان دهنده اختلاف معنی دار در بین ماهیان استرس دیده . ماهیان تیمار شاهد است

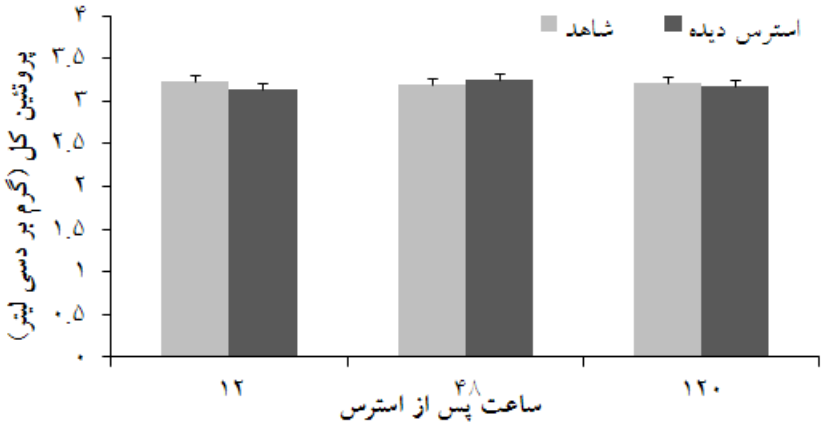
[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]



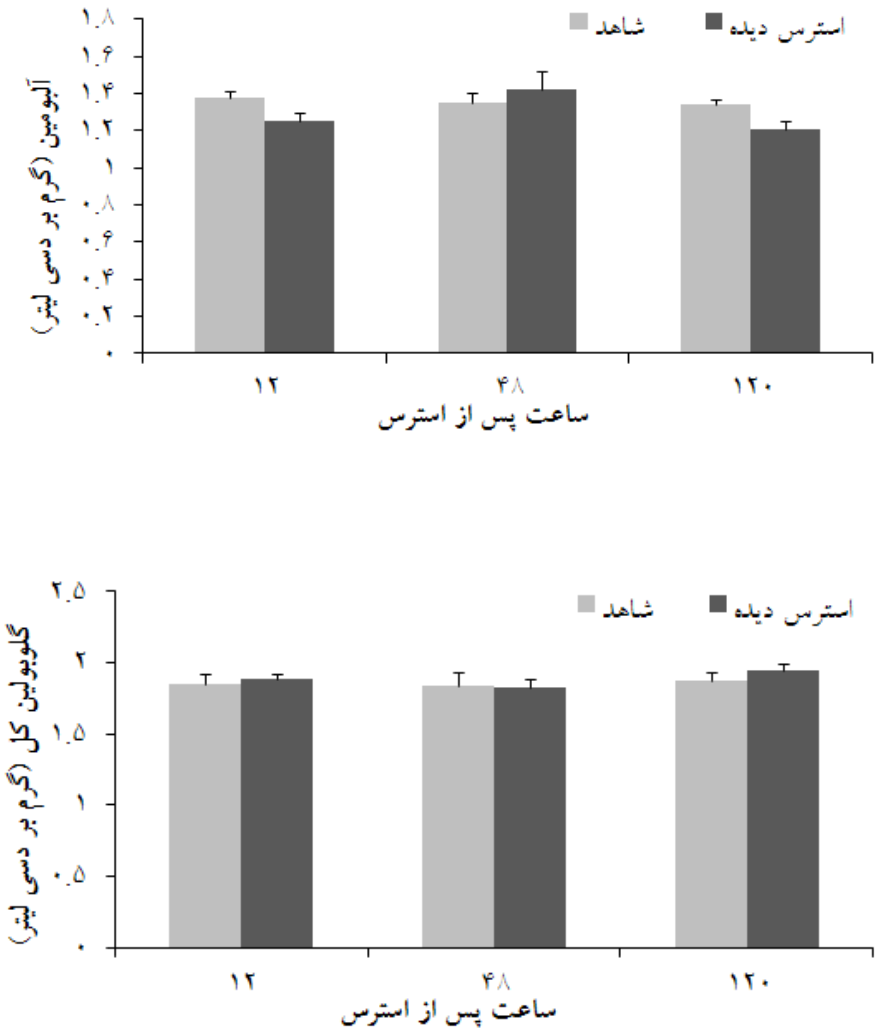
شکل ٤: تغییرات گلوکز در ماهیان طلائی پس از قرار گرفتن در معرض استرس حاد در مقایسه با ماهیان استرس ندیده.
مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار
* نشان دهنده اختلاف معنی دار در بین ماهیان استرس دیده . ماهیان تیمار شاهد است

پروتئین کل، آلبومین و گلوبین

به لحاظ پروتئین کل، آلبومین و گلوبین تفاوت معنی‌داری در بین ماهیان مطالعه مشاهده نشد و مقادیر دامنه‌ای بین ۳/۱۴- ۳/۲۵ گرم بر دسی لیتر به لحاظ پروتئین کل، ۱/۲۱-۱/۴۲ گرم بر دسی‌لیتر برای آلبومین و ۱/۸۳-۱/۹۵ گرم بر دسی‌لیتر برای گلوبولین داشت (شکل ۵).



[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]

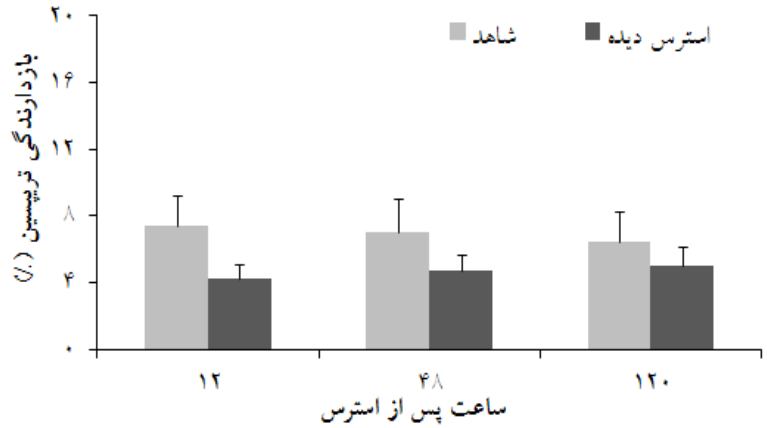


شکل ۵: تغییرات پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین کل در ماهیان طلائی پس از قرار گرفتن در معرض استرس حاد در مقایسه با ماهیان استرس ندیده. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار.

فعالیت آنتی پروتئازهای پلاسما

به طور کلی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مطالعه به لحاظ فعالیت آنتی پروتئازهای پلاسما یافت نشد (شکل ۶). هر چند مقادیر بازدارندگی فعالیت تریپسین در کلیه زمان‌های نمونه‌برداری در ماهیان کنترل نسبت به ماهیان استرس دیده بالاتر بود (شکل ۶).

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]



شکل ٦: تغییرات فعالیت آنتی پروتئازی پلاسما در ماهیان طلائی پس از قرار گرفتن در معرض استرس حاد در مقایسه با ماهیان استرس ندیده. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار

بحث

در این مطالعه کورتیزول و گلوکز پلاسما به عنوان شاخص‌های استرس مورد سنجش قرار گرفتند. اطلاعات در مورد اثر استرس‌های متوالی و پشت سر هم بر پاسخ فیزیولوژیک ماهیان محدود است. در اغلب مطالعات پیشین در ماهیان استخوانی، افزایش در مقدار کورتیزول و گلوکز پلاسما ۱ تا ۶ ساعت پس از یک بار قرارگیری در معرض عامل استرس‌زای حاد مشاهده شد، علاوه بر این، مدت زمان ریکاوری و بازگشت به حالت معمول برای این پارامترها بین ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از استرس بود (Olsen, *et al.*, 2003; Milla, *et al.*, 2010; Costas, *et al.*, 2011). با این وجود، در مطالعه حاضر به بررسی اثرات استرس حاد متوالی بر روی پاسخ‌های استرسی اقدام شده است. در مطالعه حاضر، سطوح کورتیزول پلاسما ماهیان طلائی ۵ برابر در ماهیانی که ۳ بار در یک روز استرس دیده بودند ۱۲ ساعت پس از استرس بالا رفت. این امر درحالی بود که میزان کورتیزول ماهیان کفشک *Solea senegalensis* و سیم دریایی *Sparus aurata* در حدود ۵۰ برابر ۱ ساعت پس از قرارگیری در معرض استرس حاد افزایش یافته بود (Arends, *et al.*, 1999; Costas, *et al.*, 2011). میزان گلوکز نیز در مطالعه حاضر مشابه کورتیزول تا ۴۸ ساعت پس از استرس در ماهیان استرس دیده بالاتر بود، با این حال، میزان کورتیزول و گلوکز در ماهیان استرس دیده پس از ۵ روز به میزان اولیه خود بازگشت و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. مقادیر بالای کورتیزول و گلوکز پس از مدت زمان طولانی از استرس در برخی از گونه-های ماهیان در پاسخ به استرس‌های مزمن مشاهده شده است (Barcellos, *et al.*, 1999; Barcellos, *et al.*, 2009). اما در مطالعه حاضر این افزایش با شدت بیشتری رخ داد، که این امر را می‌توان به استرس‌های شدید متوالی نسبت داد. مشابه نتایج این مطالعه، سطوح کورتیزول و گلوکز پلاسما ۲ روز پس از استرس حمل و نقل به حداکثر مقدار خود در ماهی سوف *Perca fluviatilis* رسید (Aceretea, *et al.*, 2004)، علاوه بر این بالاترین میزان کورتیزول و گلوکز پلاسما در ماهیان آزاد اطلس ۲۴ ساعت پس از استرس حمل و

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]

نقل مشاهده شد (Iversen, *et al.*, 1998). در مقابل، کورتیزول پلاسما ماهیان آزاد اطلس که به صورت روزانه در معرض استرس دستکاری قرار گرفته بودند در طول ۴ هفته بدون تغییر باقی مانده بود (Fast, *et al.*, 2008). در مطالعه حاضر مقایر بالای گلوکز پلاسما در ماهیان استرس دیده پس از مدت زمان طولانی از استرس قابل توجه است. به طور کلی، مقادیر بالای گلوکز پلاسما به دنبال استرس در پاسخ به هورمون‌های استرسی، به طور خاص اپی نفرین و نوراپی نفرین به جریان خون آزاد می شود (Wendelaar Bonga, 1997). همچنین افزایش میزان گلوکز پلاسما را به فرایند گلیکوژنز کبد یا عضلات نیز می‌توان نسبت داد (Milligan, 1996). بنابراین، مقادیر بالای گلوکز به مدت طولانی در این مطالعه را می‌توان به موجودی بالای گلوکز در بافت‌ها و پاسخ به آزادسازی کتکول آمین‌ها و تقاضای زیاد انرژی در ماهیانی که با استرس متوالی مواجه بودند نسبت داد.

پارامترهای هماتولوژیک معمولاً برای ارزیابی وضعیت سلامت و بررسی نمودن تغییرات فیزیولوژیک در ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. به لحاظ پارامترهای هماتولوژیک در بین ماهیان دو تیمار اختلاف معنی‌داری یافت نشد. در بسیاری از مطالعات پیشین، افزایش در مقادیر هماتوکریت و هموگلوبین ۳ ساعت پس از یک بار استرس مشاهده شد (Suski, *et al.*, 2007; Olsen, *et al.*, 2008)، که این امر به عنوان یک استراتژی برای بهبود ظرفیت حمل اکسیژن در شرایطی که تقاضا برای انرژی بالاست، می‌باشد (Montero, *et al.*, 2001). پارامترهای هماتولوژیک ماهیان کاد اطلس گرسنه ۱ ساعت پس از استرس حاد افزایش یافت، اما به کمتر از میزان ماهیان شاهد در ۱۲ ساعت پس از استرس رسید (Olsen, *et al.*, 2008) Caruso و همکاران (Caruso, *et al.*, 2002) کاهش در میزان هماتوکریت و هموگلوبین ماهی اسبله را ۳ روز بعد در معرض گذاری ماهیان با استرس به صورت روزانه به مدت ۱ هفته مشاهده نمودند.

شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهیان شاخص‌های با ارزشی برای ارزیابی عملکرد فیزیولوژیک ماهیان هستند. پروتئین‌ها نقش کلیدی در سیستم‌های فیزیولوژیک و ایمنولوژیک دارند و جزئی با اهمیت از ترکیبات سرم ماهیان هستند (Kumar, *et al.*, 2005). در مطالعه حاضر مقادیر پروتئین کل، آلبومین و گلوبین تفاوت معنی‌داری در بین ماهیان مطالعه نداشت. این در حالی بود که میزان گلوبولین در ماهیان کاد اطلس ۲۴ ساعت پس از قرار گیری در معرض استرس تراکم افزایش یافت (Marlowe, *et al.*, 2009). همچنین میزان پروتئین کل پلاسما در ماهیان کفشک *Solea senegalensis* پس از ۲۴ ساعت از قرارگیری در معرض استرس در معرض گذاری هوا کاهش یافته بود (Costas, *et al.*, 2011) و این کاهش در ماهیان سیم دریایی قرمز قرار گرفته در معرض استرس دستکاری نیز مشاهده شد (Biswas, *et al.*, 2006). دلیل عدم اختلاف معنی‌دار در مطالعه حاضر را می‌توان مقاومت بدنی ماهیان به این نوع استرس و ذخایر زیاد انرژی موجود در ماهیان دانست.

فعالیت آنتی‌پروتئازهای سرم میزبان که شامل α1-antiprotease، α2-antiplasmin و α2-macroglobulin می‌شود و به عنوان آنتی آنزیم شناخته می‌شوند که دارای توانایی به تاخیر انداختن یا ممانعت از هجوم پاتوژن‌ها به بدن از طریق ترشح آنزیم پرتئولیتیک هستند (Magnadottir, 2006). در مطالعه

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]

حاضر فعالیت آنتی‌پروتئاز پلاسما پس از استرس متوالی حاد تغییر معنی‌داری نداشت، هر چند در کلیه ساعات نمونه‌برداری میزان آن در ماهیان استرس دیده در مقایسه با ماهیان کنترل کمتر بود. به خوبی مشخص شده است که فعالیت آنتی پروتئازی به طور گسترده‌ای در ارتباط با مصونیت بخشیدن و یا انتقال بیماری‌هاست (Magnadottir, 2006). اما هیچ اطلاعاتی در ارتباط با اثر استرس بر فعالیت آنتی پروتئازی در ماهیان وجود ندارد که این امر ضرورت انجام مطالعات آینده در این امر را به اثبات می‌رساند. با وجود عدم اختلاف معنی‌دار، میزان فعالیت آنتی پروتئاز ماهیانی که در معرض ۳ بار استرس متوالی قرار گرفته بودند پس از ۱۲ و ۴۸ ساعت به صورت چشمگیری کمتر از ماهیان تیمار شاهد بود. مطالعات بسیاری نتایجی مشابه با نتایج این تحقیق در باره برخی از پارامترهای ایمنی مشاهده نموده‌اند که در آن‌ها سرکوب پاسخ‌های ایمنی پس از استرس حاد مشاهده شد (Sunyer and Tort, 1995; Tort, 2011).

این مطالعه نشان داد که ماهیان طلائی هیچ‌گونه سازش و تطابقی با استرس حاد نداشتند و استرس متوالی می تواند سبب ترشح کورتیزول به مدت طولانی و تغییرات فیزیولوژیک گردد. به گونه‌ای که میزان کورتیزول و گلوکز حتی ۴۸ ساعت بعد از آخرین استرس به صورت معنی‌داری بیشتر از میزان تیمار شاهد بود. به طورکلی، پیشنهاد می‌شود که استرس حاد در ماهیان طلائی و یا ماهیان زینتی دیگر در طول پروسه حمل و نقل، پرورش و فروش کاهش یابد. نتایج این مطالعه ضرورت انجام مطالعات آینده در مورد اثر استرس حاد متوالی بر پارامترهای ایمنی، مقاومت نسبت به بیماری‌ها و بیان ژن را به اثبات می‌رساند.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از آقایان ملکی، محمدپور و استواری و همچنین از پرسنل محترم آزمایشگاه‌های دکتر فدایی و امین که در انجام این تحقیق نهایت همکاری را داشتند، تقدیر و تشکر به عمل آورند.

منابع

1. Aceretea, L., Balascha, J. C., Espinosab, E., Josab, A., Tort, L., 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. Aquaculture, 237, 167-178.
2. Arends, R. J., Mancera, J. M., Munoz, J. L., Wendelaar Bonga, S. E., Flik, G., 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. J Endocrinol, 163, 149-157.
3. Barcellos, L. J. G., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Santos da Rosa, J. G., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., 2009. Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. Aquaculture, 288, 51-56.
4. Barcellos, L. J. G., Nicolaiewsky, S., de Souza, S. M. G., Lulhier, F., 1999 Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. Aquacult Res, 30, 437-444.
5. Barros, M. M., Lim, C., Klesius, P. H., 2002. Effect of iron supplementation to Cottonseed meal diets on growth performance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J Appl Aquacult, 10 (65), 86-92.
6. Barton, B. A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteriods. Integrative and omparative Biology, 42, 517-525.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]

7. Biswas, A. K., Seoka, M., Tanaka, Y., Takii, K., Kumai, H., 2006. Effect of photoperiod manipulation on the growth performance and stress response of juvenile red sea bream (*Pagrus major*). Aquaculture 258, 350-356.
8. Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein. Anal Biochem, 72, 248-258.
9. 9. Caruso, D., Schlumberger, O., Dahm, C., Proteau, J. P., 2002. Plasma lysozyme levels in sheatfish *Silurus glanis* (L.) subjected to stress and experimental infection with *Edwardsiella tarda*. Aquacult Res, 33, 999-1008.
10. Conte, F. S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. Appl Anim Behav Sci, 86 205-223.
11. Costas, B., Conceição, L. E. C., Aragão, C., Martos, J. A., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J. M., Afonso, A., 2011. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: Effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. Aquaculture 68-76.
12. Drobkin, D. R., 1945. Crystallographic and optical properties of human hemoglobin: a proposal for the standardization of hemoglobin. Am J Med Sci, 209, 268-270.
13. Fast, M. D., Hosoya, S., Johnson, S. C., Afonso, L. B., 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. Fish Shellfish Immunol, 24, 194-204.
14. Iversen, M., Finstad, B., Nilssen, K. J., 1998. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (Salmo salar L.) smolts. Aquaculture, 168, 387-394.
15. Jiang, I.-F., Kumar, V. B., Lee, D.-N., Weng, C. F., 2008. Acute osmotic stress affects Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) innate immune responses. Fish Shellfish Immunol, 25, 841-846.
16. Kumar, S., Sahu, N. P., Pal, A. K., Choudhury, D., Yengkokpam, S., Mukherjee, S. C., 2005. Efffect of dietary carbohydrate on heamatology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. Fish Shellfish Immunol, 19, 331-334.
17. Lee, J. S., Newman, M. E. 1997. Aquaculture, Inc. Interstate Publishers, İllinois IL, USA.
18. Lim, L. C., Dhert, P., Sorgeloos, P., 2003. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. Aquaculture Research, 34, 923-935.
19. Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology, 20, 137-151.
20. Magnadottir, B., Jonsdottir, H., Helgason, S., Bjornsson, B., Jørgensen, T. Ø., Pilstrom, L., 1999. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): The effects of environmental temperature. Comp Biochem Physiol B, 122, 173-180.
21. Marlowe, A. C., Caipang, I., Monica, F., Brinchmann, V., 2009. Short-term crowding stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune response. Aquaculture, 295, 110-115.
22. Mazeaud, M. M., Mazeaud, F., Donaldson, E. M., 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. Trans Am Fish Soc, 106, 201-212.
23. Milla, S., Mathieu, C., Wang, N., Lambert, S., Nadzialek, S., Massart, S., Henrotte, E., Douxfils, J., Mélard, C., Mandiki, S. N. M., Kestemont, P., 2010. Spleen immune status is affected after acute handling stress but not regulated by cortisol in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. Fish & Shellfish Immunology, 28, 931-941.
24. Milligan, C. L., 1996. Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. Comp Biochem Physiol, A, 113, 51-60.
25. Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J. M., Izquierdo, M. S., 2001 Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (Sparus aurata) juveniles. Fish Shellfish Immunol, 11, 473-490.
26. Nicholson, J. P., Wolmarans, M. R., Park, G. R., 2000. The role of albumin in critical ilness. Br J Anaesth, 85(4), 599-610.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]

27. Olsen, R. E., Sundell, K., Hansen, T., Hemre, G. I., Myklebust, R., Mayhew, T. M., Ringø, E., 2003. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. An electron microscopical study. Fish Physiol Biochem, 26, 211-221.
28. Olsen, R. E., Sundell, K., Ringø, E., Myklebust, R., Hansen, T., Karlsen, Ø., 2008. The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Aquaculture, 280, 232-241.
29. Olsen, Y. A., Einarsdottir, I. E., Nilssen, K. J., 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar,* prevents plasma cortisol increase during stress. Aquaculture, 134, 155-168.
30. Pruett, S. B., 2003. Stress and the immune system. Pathophysiology 9, 133-153.
31. Roberts, C. M., Loop, M. S., 2004. Goldfish color vision sensitivity is high under light-adapted conditions. J Comp Physiol A, 190, 993-999.
32. Sunyer, J. O., Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. Vet Immunol Immunopathol, 45 333-345.
33. Suski, C. D., Cooke, S. J., Danylchuk, A. J., O'Connor, C. M., Gravel, M. A., Redpath, T., Hanson, K. C., Gingerich, A. J., Murchie, K. J., Danylchuk, S. E., Koppelman, J. B., Goldberg, T. L., 2007. Physiological disturbance and recovery dynamics of bonefish (*Albula vulpes*), a tropical marine fish, in response to variable exercise and exposure to air. Comparative Biochemistry and Physiology, A, 148 664-673.
34. Tort, L., 2011. Stress and immune modulation in fish. Dev Comp Immunol, 35 1366-1375.
35. Vazzana, M., Cammarata, M., Cooper, E. L., Parrinello, N., 2002. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. Aquaculture 210, 231-243.
36. Wedemeyer, G. A., Barton, B. A., McLeay, D. J., 1990. Stress and acclimation. In: Schreck, C.B., Moyle,P.B. (Eds.), Methods for Fish Biology. American Fisheries, Bethesda, MD, 301-309.
37. Wendelaar Bonga, S. E., 1997. The stress response in fish. Physiol Rev, 77, 591-625.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.2.3.7]