

اثر متقابل سطوح ویتامین C و تغییرات اکسیژنی و دمایی روی کورتیزول و گلوکز خون تاسماهی سبیری (*Acipenser baerii*)

یعقوب پورغلام^۱، حسین خارا^{۲*}، محمود محسنی^۳

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲- گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۳- موسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران، صندوق پستی: ۴۱۶۳۵-۳۴۶۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۱

چکیده

ویتامین‌ها ترکیبات آلی پیچیده‌ای هستند، که اهمیت حیاتی برای ماهیان داشته و کمبود آنها باعث اختلالات شدید در بدن می‌گردد. در این بررسی سطوح مختلف ویتامین C از نوع ال-آسکوربیل-۲- پلی فسفات شامل: فاقد ویتامین C (تیمار ۱)، ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار ۲)، ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار ۳)، ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار ۴)، ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار ۵) و ۱۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار ۶) در سه تکرار و به مدت ۸ هفته جهت پرورش بچه تاسماهی سبیری در نظر گرفته شد. در ادامه برای انجام آزمایشات تنش اکسیژنی و دمایی از هر تیمار ۱۸ ماهی به طور تصادفی بعد از پلاک‌زنی به داخل آکواریوم‌های معجزا منتقل شدند. بعد از مدت ۴ ساعت قرارگیری در حالت تنش اکسیژنی (هیپوکسی به مقدار ۱/۵-۱ میلی‌گرم بر لیتر، نرموکسی ۸-۷ میلی‌گرم بر لیتر، هیپراکسی ۲۰-۱۹ میلی‌گرم بر لیتر) و تنش دمایی (دمای پایین ۱۱-۱۰ درجه سانتی‌گراد، دمای نرمال ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد و دمای بالا ۳۱-۳۰ درجه سانتی‌گراد) از ماهیان جهت تعیین اثرات استرس بر سطوح کورتیزول و گلوکز از آنها خونگیری بعمل آمد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطوح مختلف ویتامین C بر سطوح کورتیزول در شرایط مختلف دمایی و اکسیژنی مشاهده نگردید ($P > 0/05$). اما با افزایش مقدار ویتامین C در تمامی تیمارها سطوح کورتیزول در شرایط تنش در خون ماهی کاهش یافت اما اختلاف معنی‌داری دیده نشد. سطوح گلوکز بجز در تنش اکسیژنی بالا که اختلاف معنی‌داری را در سطوح مختلف ویتامین C از خود نشان داد ($P < 0/05$)، در باقی حالات تنش‌زا، فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($P > 0/05$). ولی با افزایش سطوح ویتامین C نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید که مقدار کمتری گلوکز مصرف شده است و این نتایج بیانگر این موضوع می‌باشند که با افزایش مقدار ویتامین C نسبت به گروه شاهد ماهیان مقاومت بهتری را در مقابل شرایط تنش از خود نشان دادند. با استناد به این نتایج می‌توان بیان نمود که مقادیر بالای ویتامین C می‌تواند در کاهش اثرات سوء استرس در بچه تاسماهی سبیری، نقش مثبتی را ایفاء نماید.

کلمات کلیدی: استرس، گلوکز، کورتیزول، ویتامین C، تاسماهی سبیری.

مقدمه

صنعت آبرزی پروری از صنایع مهم در حال توسعه بوده و هر ساله بر میزان تولیدات آبرزی پروری در دنیا افزوده می‌شود. به طور معمول آبریان در محیط‌های بسته همچون استخرهای خاکی، بتونی، قفس‌ها و یا فایبرگلاس پرورش داده می‌شوند و سعی در بالا بردن تراکم آبریان در واحد سطح در واحد سطح، یکی از مهمترین علل پیشرفت و افزایش تولید این صنعت است. بی شک بالا بودن تراکم پرورش اثر معکوسی بر وضع سلامت و بهداشتی ماهی خواهد گذاشت و این وضعیت سبب ایجاد شرایط نامناسب و استرس‌زا و نیز افزایش حساسیت ماهی به عوامل بیماری‌زا می‌شود. بنابراین، می‌توان با اتخاذ شیوه‌هایی بقاء و رشد مناسب ماهیان را در چنین شرایطی حفظ کرد و استفاده از مواد محرک ایمنی در جیره غذایی می‌تواند مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی را با تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی افزایش دهد (Grutter et al., 2000). ویتامین‌ها مهمترین مواد مغذی هستند که سیستم ایمنی ماهی را تحریک می‌کنند و ویتامین C به عنوان یک ماده مغذی ضروری در آبرزی پروری مطرح است که برای حفظ فیزیولوژی از قبیل رشد نرمال، ایمنی بدن و تکثیر جانوران مختلف از قبیل ماهی مورد نیاز است (Ellis et al., 2002; Cataldi et al., 1998). این ویتامین محلول در آب است و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند. اغلب ماهیان به دلیل فقدان آنزیم ال-گلوکونولاکتون قادر به بیوسنتز این ویتامین نیستند، بنابراین، به مقدار کافی باید در جیره غذایی وجود داشته باشد (Billard et al., 2001). مطالعات نشان داده است که ویتامین C از تأثیرات منفی استرس جلوگیری می‌کند و نقش حفاظتی این ویتامین در برابر

استرس می‌تواند به دلیل جلوگیری از تبدیل اسیدهای چرب غیر اشباع به استرهای کلسترول باشد که ترکیب مهمی در ساخت کورتیزول هستند و به این طریق از افزایش کورتیزول در بدن جلوگیری می‌کند (Dabrowska et al., 1991). مطالعات نشان داده است که ویتامین C می‌تواند باعث افزایش مقاومت ماهی در برابر تنش‌های محیطی گردد. تحقیقات همچنین نشان داده است که ویتامین C بر روی پارامترهای خونی مؤثر است (Barton et al., 1991; Hazon et al., 1997; Keefe, 2001).

هدف از این مطالعه بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامین C بر سطوح شاخص‌های گلوکز و کورتیزول بچه تاسماهی سبیری در شرایط تنش اکسیژنی و دمایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به مدت ۸ هفته در موسسه تحقیقات ماهیان خاویاری دریای خزر انجام شد. در این تحقیق ۶ جیره آزمایشی یکسان ولی حاوی سطوح مختلف ویتامین C، ۰ mg/kg (تیمار ۱=شاهد)، ۱۰۰ mg/kg (تیمار ۲)، ۲۰۰ mg/kg (تیمار ۳)، ۴۰۰ mg/kg (تیمار ۴)، ۸۰۰ mg/kg (تیمار ۵)، ۱۶۰۰ mg/kg (تیمار ۶) تهیه گردید. تعداد ۳۶۰ قطعه بچه تاسماهی سبیری با وزن متوسط $29/8 \pm 1/66$ گرم و متوسط طول $33/08 \pm 8/8$ سانتی‌متر انتخاب و به ۱۸ عدد تانک با حجم آبی ۵۰۰ لیتر معرفی شدند. در هر وان ۲۰ عدد ماهی رهاسازی گردید.

پس از انجام زیست‌سنجی و با انجام محاسبات آماری مشخص شد که هیچگونه اختلاف معنی‌داری از نظر وزن و طول بین ماهیان وجود ندارد. 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 تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) انجام گرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS17 استفاده شد. ابتدا آزمون همگنی گروه ها با آزمون Kolmogorov-Smirnov 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.

برای تعیین توده زنده هریک از وانها هر ۱۵ روز یکبار ۱۰۰ درصد ماهیان هر وان با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم توزین و با دقت میلیمتر طول آنها در

فرم های مخصوص ثبت شدند. ۲۴ قبل از زیست سنجی تغذیه قطع می شد. برای ساخت غذا ابتدا ترکیبات جیره به صورت کاملاً آرد درآمده و به مدت ۲۰ دقیقه توسط دستگاه میکسر با یکدیگر مخلوط شدند. سپس به مخلوط حاصل نمک، مخلوط ویتامینی، مکمل ویتامینی و ویتامین C از نوع ال-اسکوربیل-۲- پلی فسفات (ساخت شرکت Science) با خلوص ۹۶ درصد اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه با یکدیگر مخلوط شدند. با استفاده از دستگاه چرخ گوشت به صورت پلت هایی با طول ۸ میلیمتر و قطر ۲ میلیمتر تهیه شدند. غذاهای به میزان ۲ درصد وزن توده زنده، بصورت دستی و در سه نوبت در ساعات (Ellis et al., 2002; Bayunova et al., 2002) انجام شد. جیره با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم توزین شده و در سطح وانها توزیع گردید.

جدول ۱: ترکیبات جیره های غذایی مورد استفاده در آزمایش

جیره						
۶	۵	۴	۳	۲	۱	ترکیبات جیره
۵۴	۵۴	۵۴	۵۴	۵۴	۵۴	آرد ماهی (%)
۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	آرد گندم (%)
۵	۵	۵	۵	۵	۵	شیر خشک (%)
۸	۸	۸	۸	۸	۸	کنجاله سویا (%)
۴	۴	۴	۴	۴	۴	روغن ماهی (%)
۵	۵	۵	۵	۵	۵	گلوتن ذرت (%)
۳	۳	۳	۳	۳	۳	مخمر (%)
۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	مخلوط مواد معدنی* (%)
۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	مخلوط مواد ویتامینی* (%)
۰	۳/۵	۵/۵	۳/۵	۱/۵	۰	B9 (میلی گرم در کیلوگرم)
۱۶۰۰	۸۰۰	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۰	Vit C* (میلی گرم در کیلوگرم)

*مخلوط مواد معدنی (هر گرم شامل): Iron, 5 mg ; Zinc, 15mg ; Copper, 3 mg ; Manganese, 20 mg ; Calcium lactate, 327 mg ; NaCl, 43. 5 mg ; Potassium Iodate, 0. 3 mg

* مخلوط مواد ویتامینی (هر گرم شامل): Vitamin A , 5000 I. U ; Vitamin D₃ , 500 I. U; Vitamin E , 3 mg; Vitamin K₃ , 1. 5 mg ; Vitamin B₁ , 1 mg ; Ca. pantothenate , 4 mg ; Vitamin B₃ , 15 mg , Vitamin B₆ , 0. 3 mg.

* ویتامین C : stay-C ساخت شرکت Science. ال-اسکوربیل-۲- پلی فسفات.

در پایان هفته هشتم پرورش برای انجام آزمایشات تنش اکسیژنی و دمایی تعداد ۱۰۸ ماهی از کل تیمارها (از هر تیمار ۱۸ ماهی) یا به عبارت دیگر برای هر تنش از هر تکرار یک ماهی از مجموع ۶ تیمار به طور تصادفی بعد از پلاک زنی به داخل آکواریوم‌های مجزا انتقال داده شد. جهت افزایش اکسیژن از کپسول هوا و برای افزایش دمای آب از بخاری مخصوص آکواریوم و برای کاهش دمای آب از قطعه‌های یخ استفاده گردید و برای حالت نرمال اکسیژن و دما نیز مبنای بر اساس میانگین دما و اکسیژن طول دوره پرورش در نظر گرفته شد.

برای تیمارهای اکسیژنی، هیپوکسی به مقدار ۱/۵-۱ میلی گرم بر لیتر، نرموکسی ۸-۷ میلی گرم بر لیتر، هیپراکسی ۲۰-۱۹ میلی گرم بر لیتر و برای تنظیم تیمارهای حرارتی، دمای پایین ۱۱-۱۰ درجه سانتی-گراد، دمای نرمال ۲۴-۲۲ درجه سانتی-گراد و دمای بالا ۳۱-۳۰ درجه سانتی-گراد تنظیم شد (Bayunova *et al.*, 2002). طول مدت تنش‌های ایجاد شده ۴ ساعت بوده که یک ساعت نخست آن برای رساندن به دما و اکسیژن مورد نظر صرف گردید (باقرزاده لاکانی، ۱۳۹۱). پس از پایان آزمایش از ماهیان خونگیری جهت تعیین سطوح کورتیزول و گلوکز بعمل آمد 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) 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-1000 RA شرکت Technicon (ساخت آمریکا) و کیت های من (ایران) جهت سنجش میزان گلوکز بر حسب میلی گرم در دسی لیتر استفاده شد.

نتایج

مقایسه سطوح گلوکز و کورتیزول در شرایط

استرس‌های افزایش و کاهش اکسیژن:

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه و آزمون دانکن به منظور مقایسه میزان گلوکز و کورتیزول خون ماهیان بین تیمارها در استرس‌های افزایش و کاهش اکسیژن اختلاف معنی داری در سطوح کورتیزول مشاهده نشد ($P > 0/05$).

اما با کاهش اکسیژن اختلاف معنی داری در سطوح گلوکز خون ماهیان مشاهده گردید به گونه‌ای که کمترین میزان گلوکز در خون ماهیان تغذیه شده از تیمار ۲ حاوی ۱۰۰ میلی گرم ویتامین C و بیشترین آن در تیمار ۴ حاوی ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C مشاهده گردید (جدول ۲).

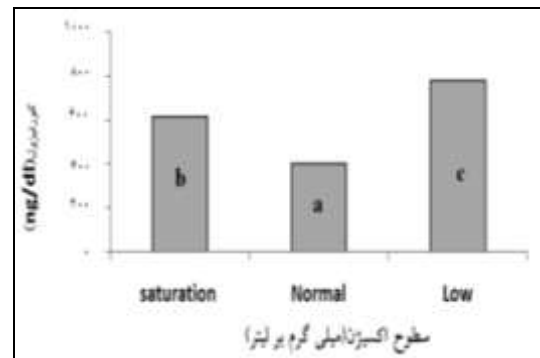
جدول ۲: میانگین سطوح گلوکز و کورتیزول سرم خون ماهیان در استرس‌های افزایش و کاهش اکسیژن در تیمارهای مختلف

فاکتور	تیمار	Vitamin C (mg/kg)	افزایش اکسیژن (۲۰- ۱۹ میلی گرم بر لیتر)	کاهش اکسیژن (۱/۱۵- گرم بر لیتر)
گلوکز (mg/dl)	۱ (شاهد)	۰	۲۷/۵±۰/۷ ^a	۲۱/۵±۰/۷ ^{ab}
	۲	۱۰۰	۲۴±۱۸/۳۸ ^a	۲/۵±۰/۷۷ ^b
	۳	۲۰۰	۲۸/۵±۶/۳۶ ^a	۵۱±۴۳/۸ ^{ab}
	۴	۴۰۰	۲۶/۵±۶/۳۶ ^a	۱۲/۵±۳/۲۴ ^{ab}
	۵	۸۰۰	۳۹±۱۲/۷ ^a	۵۶±۴/۳۳ ^a
	۶	۱۶۰۰	۲۱/۵±۱۴/۸۷ ^a	۱۵/۵±۱۲/۰۲ ^{ab}
کورتیزول (ng/dl)	۱ (شاهد)	۰	۷۳۵±۴۶ ^a	۷۹۲/۵±۱۳/۴ ^a
	۲	۱۰۰	۶۱۰/۵±۲۳/۳۳ ^a	۷۴۲±۲۳/۶ ^a
	۳	۲۰۰	۶۴۵±۱۴۷ ^a	۸۵۱±۵/۷ ^a
	۴	۴۰۰	۳۵۵±۳۲ ^a	۷۶۰±۲۰/۵ ^a
	۵	۸۰۰	۶۴۸±۳۹ ^a	۷۳۸±۷۶/۳۶ ^a
	۶	۱۶۰۰	۷۰۰/۵±۳/۵ ^a	۷۷۵±۲/۶۲ ^a

اعداد با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند ($P < 0.05$).

مقایسه میانگین کورتیزول در سطوح مختلف اکسیژن

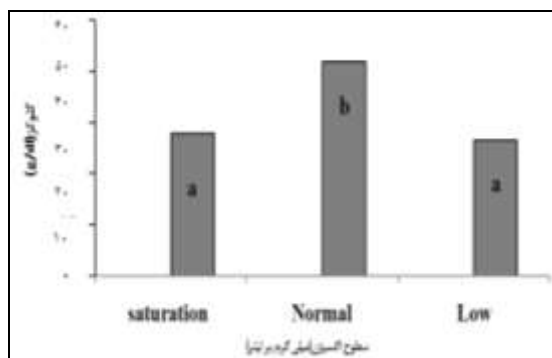
با توجه به آزمون آنالیز واریانس یکطرفه، بین سطوح مختلف اکسیژن مورد بررسی از نظر میزان کورتیزول اختلاف معنی دار مشاهده گردید و بر اساس آزمون دانکن مشخص شد که بین غلظت‌های مختلف ویتامین C اختلاف وجود دارد (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه میانگین کورتیزول بین سطوح مختلف اکسیژن

مقایسه میانگین گلوکز در سطوح مختلف اکسیژن

با توجه به آزمون آنالیز واریانس یکطرفه، بین سطوح مختلف اکسیژن مورد بررسی از نظر میزان گلوکز اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید. اما بر اساس آزمون دانکن مشخص شد که سطح نرمال با سایر سطوح از نظر میزان گلوکز اختلاف دارد (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه میانگین گلوکز بین سطوح مختلف اکسیژن

سطوح گلوکز و کورتیزول در شرایط استرس‌های افزایش و کاهش دما

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه و آزمون دانکن به منظور مقایسه میزان گلوکز و کورتیزول خون ماهیان بین تیمارها در استرس‌های افزایش و کاهش دما اختلاف معنی‌دار در سطوح گلوکز و کورتیزول مشاهده نشد ($P > 0/05$). هر چند که بیشترین میزان گلوکز در شرایط استرس دمایی بالا در تیمار ۴ حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و کمترین آن در تیمار شاهد مشاهده گردید، اما با کاهش دما بیشترین میزان گلوکز در تیمار ۶ حاوی ۱۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C به مقدار $19/09 \pm 55/5$ گرم در دسی‌لیتر و کمترین آن متعلق به تیمار ۲ حاوی ۱۰۰

میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C به مقدار $15/5 \pm 40$ گرم در دسی‌لیتر بود.

همچنین در استرس دمایی بالا بیشترین میزان کورتیزول در تیمار ۲ حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C به میزان $15/55 \pm 748$ نانوگرم در میلی‌لیتر و کمترین آن در تیمار ۳ حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C به میزان $9/19 \pm 713$ نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد.

در استرس دمایی پایین بیشترین میزان کورتیزول در تیمار ۵ حاوی ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C به میزان $35/35 \pm 761$ نانوگرم در میلی‌لیتر و کمترین آن در تیمار ۶ حاوی ۱۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C به مقدار $85/55 \pm 700$ مشاهده شد.

جدول ۳- میانگین میزان سطوح گلوکز سرم خون ماهیان در شاهد و تیمارهای مختلف

فاکتور	تیمار	Vitamin C (mg/kg)	افزایش دما (۳۱-۳۰) درجه سانتی‌گراد	کاهش دما (۱۱-۱۰) درجه سانتی‌گراد
گلوکز (g/dl)	۰	۰	$13/5 \pm 4/8^a$	$44 \pm 28/28^a$
	۱۰۰	۱۰۰	$22 \pm 13/8^a$	$40 \pm 15/5^a$
	۲۰۰	۲۰۰	$21 \pm 6/34^a$	$32/5 \pm 17/68^a$
	۴۰۰	۴۰۰	$24 \pm 16/97^a$	$53/5 \pm 6/36^a$
	۸۰۰	۸۰۰	$17/5 \pm 16/26^a$	$48/5 \pm 31/8^a$
	۱۶۰۰	۱۶۰۰	$21 \pm 12/73^a$	$55/5 \pm 19/09^a$
کورتیزول (ng/ml)	۰	۰	$733 \pm 69/62^a$	$727 \pm 23/33^a$
	۱۰۰	۱۰۰	$748 \pm 15/55^a$	$724 \pm 97/58^a$
	۲۰۰	۲۰۰	$713 \pm 9/19^a$	$701 \pm 114/55^a$
	۴۰۰	۴۰۰	$730 \pm 138/59^a$	$753 \pm 2/82^a$
	۸۰۰	۸۰۰	$732/5 \pm 123/74^a$	$761 \pm 35/35^a$
	۱۶۰۰	۱۶۰۰	$744 \pm 38/18^a$	$700 \pm 85/55^a$

اعداد با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0/05$).

بحث

پرورش ماهی در سیستم های پرورشی و محیط های مصنوعی منجر به قرار گرفتن 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 (Schreck, 1990).

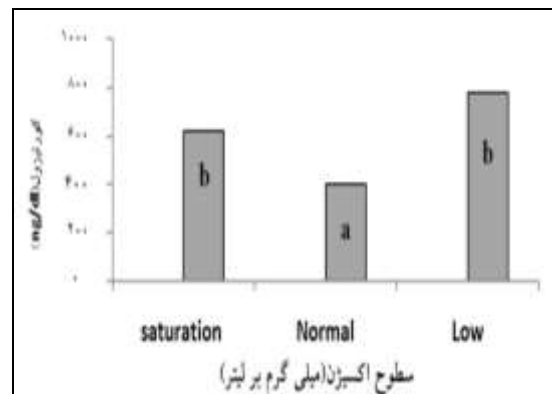
مناسب ترین شاخص های انواع استرس در ماهیان مطالعه توأم کورتیزول و گلوکز سرم خون می باشد (Barton *et al.*, 1985). همچنین ثابت شده است که کورتیزول در متابولیسم انرژی، تنظیم یونی و پاسخ به استرس نقش مؤثری داشته و با تحریک پدیده های گلیکولیز و تبدیل اسید لاکتیک به گلوکز در کبد طی پروسه شیمیایی از منابع پروتئین و چربی موجب افزایش گلوکز سرم خون می گردد (Wendelaar, 1993). 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 (Kubilay *et al.*, 2002; Mc Cormic *et al.*, 2003; Schreck *et al.*, 2001).

از سوی دیگر مطالعات نشان داده است که ویتامین C می تواند در ماهی به عنوان تعدیل کننده های پاسخ های استرس ایفای نقش کنند (Kolkovski *et al.*, 2000; Ortuno *et al.*, 2003). اثرات استرس می تواند از طریق استفاده از مکمل های حاوی مقادیر

مقایسه میانگین کورتیزول بین سطوح مختلف

دما

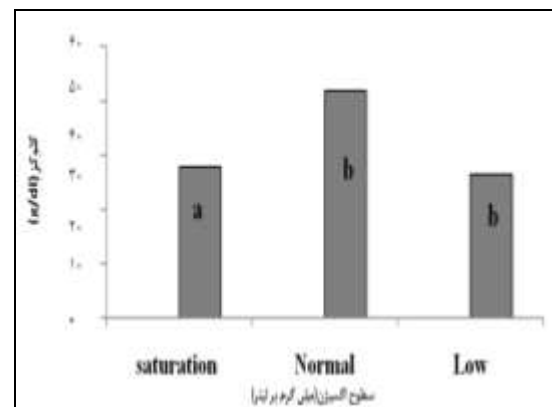
با توجه به آزمون آنالیز واریانس یکطرفه، بین سطوح مختلف دما مورد بررسی از نظر میزان کورتیزول اختلاف معنی دار مشاهده شد و بر اساس آزمون دانکن مشخص گردید که سطح نرمال با سایر سطوح از نظر میزان کورتیزول اختلاف دارد (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین کورتیزول بین سطوح مختلف دما

مقایسه میانگین گلوکز بین سطوح مختلف دما

با توجه به آزمون آنالیز واریانس یکطرفه، بین سطوح مختلف دما مورد بررسی از نظر میزان گلوکز اختلاف معنی دار مشاهده گردید و بر اساس آزمون دانکن مشخص می گردد که دمای بالا با سایر سطوح از نظر میزان گلوکز اختلاف دارد (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه میانگین گلوکز بین سطوح مختلف دما

خود نشان داد ($P < 0/05$)، در باقی حالات تنش‌زا، فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($P > 0/05$). ولی با افزایش سطوح ویتامین C نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید که مقدار کمتری گلوکز مصرف شده است و این نتایج بیانگر این موضوع می‌باشند که با افزایش مقدار ویتامین C نسبت به گروه شاهد ماهیان مقاومت بهتری را در مقابل شرایط تنش از خود نشان دادند.

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 HPG و HPI سیستم ایمنی و فرایند تولید مثلی تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) دریافتند که استرس های صید، حمل و نقل و نگهداری باعث بالا رفتن هورمون کورتیزول و گلوکز می شود (تاتینا و همکاران، ۱۳۹۰). 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 (Bayunova et al., 2002).

کورتیزول پلازما در ماهی *Scaphirhynchus albus* و تاس ماهیان هیبرید *Scaphirhynchus albus* × *Platohynchus shovelnose* یک ساله طی ۶ ساعت نگهداری در شرایط نامساعد از ۳ نانوگرم در میلی لیتر به ۱۴ نانوگرم در میلی لیتر رسید (Barton et al., 2001). همچنین محققین اثرات صید، دستکاری و انتقال به آزمایشگاه را بر روی ماهی *melapterus* *Hemigymnus* مورد بررسی قرار دادند. آنها اظهار کردند که میانگین کورتیزول 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

بالای ویتامین C در غذای ماهیان کاهش پیدا کند (Kolkovski et al., 2000). 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 یمنی بالاتری از خود نشان داده و در نتیجه کارایی بهتری دارند (Montero et al., 1999; Tort et al., 2004).

گلوکز پلازما به عنوان یک شاخص مهم در پاسخ به عوامل مختلف استرس حاد یا مزمن مورد توجه قرار می گیرد (Ellis et al., 2002). از این رو اندازه گیری میزان گلوکز خون بعد از بروز استرس مشابه کورتیزول فاکتور مناسبی جهت ارزیابی شدت پاسخ های نورواندوکروینی در ماهیان محسوب می گردد (Pottinger et al., 1999). سطوح گلوکز در هر زمان وابسته به فاکتورهای مختلفی مثل جیره غذایی، سن، تغذیه و فصل می باشد و از مهم ترین پاسخ های ثانویه در ارتباط با بالا رفتن کورتیزول می باشد (Pottinger, 1998). تحت شرایط استرس زا، کاتکول آمین ها با تأثیر بر کبد سبب القاء گلیکولیز یا گلیکونئوزنریز می شوند که این امر منجر به متابولیزه شدن گلوکز شده و در نتیجه میزان گلوکز سرم افزایش می یابد (Rotland et al., 1997).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اختلاف معنی داری در سطوح مختلف ویتامین C بر سطوح کورتیزول در شرایط مختلف دمایی و اکسیژنی مشاهده نگردید ($P > 0/05$). اما با افزایش مقدار ویتامین C در تمامی تیمارها سطوح کورتیزول در شرایط تنش در خون ماهی کاهش یافت اما اختلاف معنی داری دیده نشد. سطوح گلوکز بجز در تنش اکسیژنی بالا که اختلاف معنی داری را در سطوح مختلف ویتامین C از

کورتیزول و گلوکز سرم بعنوان شاخصی در پاسخ به استرس در نظر گرفته می شود (Bayunova et al., 2002 ; Blaxhall, 1972).

در مطالعه ای، با تأثیر استرس بر تاسماهی، آدریاتیک (*A. naccarii*) مشخص شد که میزان کورتیزول از $18/7 \pm 32$ نانوگرم در میلی لیتر به $43/8 \pm 43$ نانوگرم در میلی لیتر در دمای ۱۷ درجه سانتی گراد رسید (Blaxhall, 1972). مطالعه ای بر روی اثر انواع مختلف استرس شامل صید، شنای اجباری و در معرض هوا قرار دادن ماهیان ازون برون و تاسماهی روسی انجام شده و به این نتیجه رسیدند که مقدار کورتیزول پس از قرار دادن در تور به مدت ۱۰-۵ دقیقه به $98/2 \pm 6/06$ نانوگرم در میلی لیتر رسیده و ۳۰ دقیقه بعد این مقدار به $171/2$ نانوگرم در میلی لیتر می رسد. این درحالی است که مقدار گلوکز از $1/9 \pm 0/9$ به $4/5$ میلی گرم در دسی لیتر رسید (Bayunova et al., 2002).

تحقیقات انجام شده نشان از معنی دار بودن اثر ویتامین C در برخی موارد و بی اثر بودن آنها در موارد دیگر در پاسخ به استرس دارد. با بررسی تأثیر استرس بر روی بچه فیل ماهیان (*Huso huso*) دریافت که کمترین استرس در ماهیانی که با جیره های غذایی حاوی 200 mg/kg ویتامین C تغذیه شده بودند مشاهده شد و بیشترین استرس در ماهیان گروه شاهد که فاقد ویتامین C در جیره بودند ملاحظه گردید (فلاحکار، ۱۳۸۴). محققین با بررسی سطوح مختلف ویتامین C جیره بر روی استرس گرما در ماهیان جوان (*Notemigonus crysoleucas*) بعد از ۱۷ هفته پرورش دریافتند ماهیانی که فاقد ویتامین C در جیره غذایی خود بودند بقا کمتری بعد از قرار گرفتن در معرض

قرار گرفتند به 40 نانوگرم در میلی لیتر رسید. آنها مدت زمان این عوامل استرس را ۲-۴ ساعت بیان نمودند (Grutter et al., 2000).

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 (Barton et al., 2001). در بررسی استرس های بالا و پایین نگهداری بر روی ماهی قزل آلا رنگین کمان بیان شده که در استرس های بالا ۲ ساعت بعد مقدار کورتیزول به می رسد.

در حالی که در استرس های پایین بعد از ۶ ساعت مقدار کورتیزول $43/2 \pm 7/7$ 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 $326 \pm 44/5$ میلی گرم در دسی لیتر رسید و مقدار آن در استرس های بالا در این زمان به $156 \pm 13/2$ میلی گرم در دسی لیتر رسید (Trenzado et al., 2003).

در آزاد ماهی ساکای *nerka Oncorhynchus* میزان اولیه گلوکز خون $1/3$ میلی گرم در میلی لیتر بوده است ولی پس از استرس نگهداری (در شرایط اسارت) به مدت ۳۰ دقیقه به حد 142 میلی گرم در میلی لیتر افزایش یافت (Kubokawa et al., 1999).

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 (Wedemeyer et al., 2000). در ماهیان خاویاری همانند ماهیان استخوانی، افزایش سطح

یافته و غلظت ویتامین C در پلاسما 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. 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 (Hazon *et al.*, 1997). لذا وجود ویتامین ها در جیره و امکان جذب آنها از طریق روده می تواند در کاهش اثرات استرس مؤثر باشد. با توجه و به نتایج محققین مختلف و تاثیر سطوح بالای ویتامین C در کاهش اثرات استرس، استفاده از این سطوح ویتامینی با توجه به نقش اثبات شده ویتامین C می تواند مؤثر باشد.

تاسماهیان آنچنان که ماهیان استخوانی در معرض استرس هستند این ماهیان قدیمی زیاد تحت تاثیر 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 (Keiffer, 2000). این پاسخ ها ناشی از طراحی فیزیولوژیک خوب (نداشتن محدودیت بی هوازی)، تاریخچه زندگی (شکارچی های طبیعی) (Barton *et al.*, 2001) یا مشخصات مورفولوژیکی (پوشش خوب و محکم) (Billard *et al.*, 2001) هستند.

بنابراین آبی پروری متراکم نیازمند مدیریت دقیق محیط پرورشی است و درک کامل فیزیولوژی ماهی نیز اثرات زیان آور استرس را به حداقل می رساند.

استرس دمای آب (37°C – 36°C) نسبت به آنهایی که با جیره های حاوی مکمل های ویتامین C تغذیه شده بودند، داشتند (Chen *et al.*, 2004).

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 (Sandens *et al.*, 1991).

غلظت کورتیزول سرم عمومی ترین شاخص پذیرفته شده استرس است (Barton *et al.*, 1991). برخی محققین عقیده دارند سطوح بالای ویتامین C از بیوسنتز کورتیزول جلوگیری می کند (Wedemeyer, 1969).

محققین ثابت کرده اند که استرس نمونه برداری و اسارت می تواند با مکمل های ویتامین C مدیریت شود (Shiau *et al.*, 1999 و Woodward, 1994). 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 (Li *et al.*, 1999). نقش تغذیه با سطوح بالای این ویتامین در کاهش اثر استرس اینگونه می تواند توصیف گردد که

هورمون های استرس توسط سلول های اینترنال 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

۳. 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.

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×platyrhynchus*) 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. Billard, R. and Leconte, C., 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. Review in Fish Biology and Fisheries. 10: 355-392.
9. Blaxhall, P. C., 1972. The hematological assessment of the health of freshwater fish. Review of selected literature. Journal of Fish Biology. 4: 593-604.
10. Cataldi, E. Di Marco, P. Mandich, A. Cataudella, S., 1998. Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes) effects of temperature and stress. Comparative Biochemistry and Physiology. 121: 351-354.
11. 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

استرس های تحمیل شده به ماهی از طریق آب، غذا، میکروارگانیزم 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 ویتامین C که نقش بسیار مهم و ضروری آن در کاهش اثر استرس اثبات شده است می تواند در صورت کاربرد در جیره غذایی آبزیان پرورشی در شرایط مصنوعی از اثرات مضر استرس بکاهد.

سپاسگزاری

لازم می دانیم مراتب قدردانی و سپاس خود را از آقای دکتر مسعود فرخ روز، همسر گرامی ام و سایر عزیزانی که نقشی در این تحقیق داشته اند ابراز دارم چرا که بدون یاری آنها امکان انجام این تحقیق میسر نبود.

منابع

۱. باقرزاده لاکانی، ف، ستاری، م، یزدانی ساداتی، م، ع، کاظمی، ر، ا، جعفرزاده، ا، ۱۳۹۱. اثرات سطوح مختلف اکسیژن بر رشد و ترکیب عضله در دو گروه وزنی از فیل ماهیان. مجله علوم و فنون دریایی. شماره ۴. ۱۲ صفحه.
۲. تاتینا، م، طاعتی، ر، بهمنی، م، سلطانی، م، قریب خانی، م، ۱۳۹۰. اثر استرس حاد بر نوسانات کورتیزول و گلوکز ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف ویتامین C و E، مجله آبزیان و شیلات، سال دوم، شماره ۸، ۱۱ صفحه.

- sockeye salmon during the breeding season. *Aquaculture*. 172: 335-349.
21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Pottinger, T. G., 1998. Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in angler keepnets. *Journal of Fish Biology*. 53: 728 – 742.
 27. 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.
 28. Rivers, J. M., 1987. Safety of high level of vitamin C ingestion. *Annals of New York Academic of Sciences*. 498: 445 – 453.
 29. 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.
 30. 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.
- concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*. 242: 553–569.
 12. 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.
 13. Ellis, T. North, B. Scott, A. Bromage, N. R. Porter, M. and Gad, D., 2002. The relationship between staking density and the welfare of farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology*. 6: 493-531.
 14. 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.
 15. Hazon, N. and Balment, R. J., 1997. *Endocrinology*. In: Evans, D. H. (ed), *The Physiology of Fishes*. CRC Press. pp: 441-463.
 16. Keiffer, J. D., 2000. Limits to exhaustive exercise in fish comparative biochemistry and physiology. 126: 161-179.
 17. Keefe, T., 2001. Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in *Aquaculture Feeds*. *ASA Technical Bulletin*. 48:1-9.
 18. 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 acidsenriched *Artemia nauplii* on growth, survival, and stress resistance of fresh water walleye *Stizostedion vitreum* larvae. *Aquaculture Nutrition*. 6: 199–206.
 19. Kubilay, A. and Vlukai, G., 2002. The effect of acute stress on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Turkish Journal of Zoology*. 26: 249-254.
 20. 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

- for deferring to stress cortisol responsiveness to stress. *General and Comparative Endocrinology*. 133: 332-340.
36. Wedemeyer, G., 1969. Stress-induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 29: 1247-1251.
 37. 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.
 38. Wendelaar Bonga, S. E., 1993. Endocrinology. In: Evans, D. H. (ed), *The Physiology of Fishes*. CRC press. pp: 469 – 503.
 39. Woodward, W., 1994. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with special emphasis on quantitative estimates for salmonids. *Aquaculture*. 124:133-168.
 31. Schreck, C. B., 1990. In: Adams, S. M (ed) *Biological indicators of stress in fish*. American Fisheries Symposium & Bethesda, Maryland, USA. pp: 9-28.
 32. 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.
 33. Shiau, S-Y, Hsu, T-S., 1999. Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*×*Oreochromis aureus*, with Lascorbyl- 2-monosulphate-Rna and L-ascorbyl- 2-monophosphate-Mg. *Aquaculture*. 17: 317- 326.
 34. 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.
 35. 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