فصلنامه علمی ـ پژوهشی

دورهٔ ۵، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۴۵- ۵۸

پاسخ ایمنی و تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمی سرم خون مولدین ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) تحت تزریق هورمون گنادوتروپین جفتی انسانی (hCG)

وحید زادمجید [۱*]، اسعد وزیری [۲]

۱- استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج

۲- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

دریافت: ۹۴/۰۵/۳۱ پذیرش: ۹۵/۰۳/۲۹

* نویسنده مسئول مقاله: zadmajid@gmail.com

چکیده:

مولدین نر و ماده ماهی قرمز به‌صورت یک مرحله‌ای با هورمون گنادوتروپین جفتی انسانی (hCG) به‌میزان 1/ IU hCG g/ BW و گروه شاهد فقط با سرم فیزیولوژی تزریق شدند.. پس از گذشت ۱۲ و ۲۴ ساعت از تزریق، از مولدین خون‌گیری شد و فاکتورهای ایمنی (IgM، IgG، C3، C4)، بیوشیمیایی و آنزیمی (گلوکز، اسید اوریک، اوره، کلسترول، پروتئین کل، تریگلیسرید، کلسیم، کراتینین، آلبومین، HDL، LDL، AST و ALT) اندازه گیری شد. سطح سرمی IgM در مولدین ماده در فواصل زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق hCG نسبت به گروه شاهد، تغییر معنی‌داری نشان نداد (P >۰/۰۵). در صورتی‌که در مولدین نر تزریق شده با hCG، سطح سرمی IgM نسبت به گروه شاهد کاهش نسبی نشان داد (P <۰/۰۵). سطح سرمی IgG و میزان کپلمان C4 در هر دو گروه مولدین نر و ماده، با گذشت زمان از تزریق hCG، کاهش معنی‌داری پیدا کرد (P <۰/۰۵)، در صورتی که میزان کپلمان C3، در هر دو گروه مولدین نر و ماده با گذشت زمان از تزریق hCG افزایش معنی-داری نشان داد (P <۰/۰۵). تزریق هورمون گنادوتروپین جفتی انسانی باعث تغییر در فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمی سرم خونی هر دو گروه مولدین نر و ماده گردید. نتایج نشان داد که هورمون گنادوتروپین جفتی انسانی حتی به‌صورت تزریق یک مرحله‌ای و درفاصله زمانی کوتاه پس از تزریق به‌صورت قوی از طریق تحریک سیستم ایمنی، باعث تغییر در وضعیت فیزیولوژیک مولدین نر و ماده ماهی قرمز می‌شود.

کلید واژگان: ماهی قرمز، hCG، ایمنی، فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمی سرم خون

مقدمه

ماهی قرمز (*Carassius auratus*, Linnaeus 1758) از خانواده کپور ماهیان و به‌لحاظ شرایط زیستی و تغذیه‌ای شبیه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) است. ماهی قرمز گونه بسیار مناسبی برای مطالعات تولیدمثلی، آندوکرینولوژی، سلولی، ایمنی‌شناسی، سم‌شناسی و مولکولی می‌باشد، زیرا برای تحقیقات آزمایشگاهی از اندازه مناسبی برخوردار است و همچنین در محیط‌های آزمایشگاهی به‌راحتی قادر به بلوغ و تولیدمثل می‌باشد. در واقع از این گونه به‌عنوان نمونه برای بررسی کپور ماهیان استفاده می‌شود (Munakata and Kobayashi, 2010).

ایمنی در ماهیان مانند سایر مهره‌داران به دو صورت اختصاصی و غیراختصاصی تظاهر می‌یابد. سیستم ایمنی غیراختصاصی از دو بخش ایمنی سلولی و هومورال تشکیل می‌شود که لایزوزیم و کمپلمان‌ها جزو مولکول‌های دفاعی هومورال سیستم ایمنی غیراختصاصی هستند (Qstegaard et al, 2009). بخشی از ایمنی داخلی به‌وسیله ایمنوگلوبولین‌ها (Ig) ایجاد می‌شود. ایمنوگلوبولین‌ها نقش مهمی را در ایمنی همورال ایفا می‌کنند (Savan et al, 2005). کمپلمان‌ها از مهم‌ترین فاکتورهای دفاعی هستند که از حدود ۳۵ پروتئین محلول در پلاسما تشکیل شده‌اند و نقش کلیدی در ایمنی ذاتی و اکتسابی دارند (Boshra and Sunyer, 2006 ؛ Ataeimehr et al, 2014). بسیاری از محرک‌های ایمنی باعث افزایش فعالیت کمپلمان در سرم ماهیان می‌شوند (Montero et al., 1999). مطالعات مختلف حاکی از تأثیر تزریق هورمون‌های استروئیدی بر سطح سرمی IgM به‌ترتیب بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Hou et al, 199) و مولدین ماده سیم سرطلایی (*Sparus aurata*) (Cuesta et al, 2007) است.

هورمون HCG به‌منظور بلوغ و اوولاسیون در ماهیان استفاده می‌شود. این هورمون به‌وسیلهٔ جفت انسان ساخته و در ادرار خانم‌های باردار وجود دارد (Van Der Kraak et al, 1998). این هورمون برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ به‌کار گرفته شد و امروزه به‌عنوان روشی مؤثر در فرایند القایی تولید مثل ماهیان به‌کار گرفته می‌شود (Zohar and Mylonas, 2001 ؛ Lam, 1982). معمولاً تزریق مکرر HCG با پاسخ ایمنی در ماهی همراه است و ممکن است در مراحل بعدی باعث عدم واکنش ماهیان به تزریق هورمون گردد (Tsampalas et al, 2010 ؛ Van Der Kraak et al, 1989). البته در مطالعات انجام شده، دربارهٔ تشکیل پادتن در بدن ماهیان تزریق شده به‌وسیلهٔ HCG نظریات متفاوتی وجود دارد و اصولاً بیان شده که بهتر است HCG در یک مرحله به ماهیان مولد نر و ماده تزریق شود (Zohar and Mylonas, 2001). تزریق این هورمون معمولاً براساس دُزهای انفرادی صورت می‌گیرد و با توجه به گونه ماهیان دُز آن بین ۱۰۰ تا ۴۰۰۰ واحد (IU)[1] به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن متفاوت است (Ohta and Tanaka, 1997). مزیتی که HCG نسبت به سایر هورمون‌ها دارد این است که این ماده به‌طور مستقیم روی گناد اثر گذاشته و نیازی به فعال کردن غده هیپوفیز برای ذخیره‌سازی LH ندارد (Zohar and Mylonas, 2001). معمولاً بعضی از هورمون‌ها به‌صورت دو مرحله‌ای تزریق می‌شوند که باعث طولانی شدن فاصله بین تزریق و تخم‌ریزی می‌شود. در نتیجه طولانی شدن فاصله بین

1 International Unit

پاسخ ایمنی و تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی ... ـــــــ

۱۸٤/٦ میلی‌گرم در لیتر؛ پی- اچ ۰/۳ ± ۸/۲). سیستم آبرسانی به تانک‌های نگهداری ماهیان متصل به آب لوله‌کشی شهری (شهر سنندج) بود و آب مورد استفاده پیش از ورود به تانک نگهداری ماهیان، در تانک‌های ذخیره آب با استفاده از تیوسولفات سدیم کلرزدایی و به‌مدت ٤۸ ساعت هوادهی گردید. ماهیان به‌مدت ۲ ماه تا زمان رسیدن بلوغ جنسی تحت پرورش در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی (12L:12D) قرار گرفتند و روزانه ماهیان به مقدار ۳ درصد وزن بدن و در دو وعده غذایی در روز با غذای مخصوص ماهی قرمز (انرژی- ساخت کشور تایلند) شامل: ۳۳/۷۱ درصد پروتئین خام، ۸/٤۱ درصد چربی خام، ۹/۲۱ درصد خاکستر و ۲/۹۲ درصد فیبر خام تغذیه شدند.

در ابتدای فصل بهار و در مرحله بلوغ رسیدگی جنسی، مولدین نر و ماده از یکدیگر جدا شدند. تشخیص مولدین نر و ماده با مشاهده علائم خارجی رسیدگی جنسی صورت گرفت. به گونه‌ای که تشخیص مولدین نر بالغ از طریق فشار به ناحیه شکمی و خارج شدن اسپرم و همچنین وجود دانه‌های زبر و مرواریدی شکل روی سرپوش آبششی و قسمت فوقانی باله سینه‌ای انجام شد، در صورتی‌که مولدین رسیده ماده شکم نرم و برآمده دارند. پس از حصول اطمینان از رسیدگی کامل، مولدین نر و ماده به‌صورت جداگانه به سه تیمار (۳ تکرار برای هر تیمار و ۲۵ عدد مولد در هر تیمار) تقسیم شدند. گروه اول: شاهد که فقط تزریق با سرم فیزیولوژی انجام شد، گروه دوم: خون‌گیری ۱۲ ساعت پس از تزریق هورمون hCG (Karma-HCG 5000, BSV, BioScience GmbH, Germany) صورت گرفت و گروه سوم: خون‌گیری ٢٤ ساعت پس از تزریق هورمون hCG انجام شد. مولدین نر و ماده با استفاده از هورمون hCG به‌میزان 1 IU/ g به‌صورت یک مرحله‌ای و تزریق داخل عضلانی (ناحیه پشتی) تزریق شدند.

خون‌گیری و اندازه‌گیری فاکتورهای خون‌شناسی

پس از گذشت ۱۲ ساعت از تزریق سرم فیزیولوژی (گروه شاهد) و گذشت ۱۲ و ٢٤ ساعت از تزریق hCG، نمونه‌های خون از ماهیان گرفته شد. پیش از شروع خون‌گیری، ماهیان با گل میخک به‌میزان ppm 150 بیهوش شدند. سپس سطح بدن ماهیان کاملاً با استفاده از یک پارچه تمیز خشک شد و با قطع ساقه دمی، خون‌گیری از ماهیان انجام شد. نمونه‌های خون، یک ساعت پس از لخته شدن با استفاده از سانتریفوژ (۱۰ دقیقه با g ٤٥۰۰ و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد)، سرم از خون تفکیک شد. سپس سرم به ویال‌هایی که مشخصات مربوطه به ماهی و مرحله آزمایش توسط برچسب روی آن نصب شده انتقال داده شد و ویال‌ها توسط پارافیلم و درب پلاستیکی بسته و در دمای زیر انجماد (۲۱- درجه سانتی‌گراد) تا زمان آنالیز فاکتورهای مدنظر نگهداری شدند.

سنجش شاخص‌های ایمنی، بیوشیمیایی و آنزیمی سرم خون

آنالیز فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون شامل گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسیم، اسید اوریک، اوره، کراتینین، کلسترول، HDL، LDL، پروتئین کل، آلبومین، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز توسط دستگاه اتوآنالایزر (Roche Hitachi 911 Chemistry Analyzer) و با استفاده از کیت‌های پارس آزمون (Pars Azmun Co. Ltd., Tehran, Iran) انجام شد. فاکتورهای

پاسخ ایمنی و تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی ... ـــــــ

جدول ۱ میانگین فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمی سرم خون مولدین ماده ماهی قرمز تحت تزریق هورمون hCG بین تیمارهای مختلف

شاخص‌ها	شاهد	۱۲ساعت پس از تزریق	۲۴ ساعت پس از تزریق
گلوکز (mg/dl)	۷۷/۱۴ ± ۰/۸۷^{a}	۱۷۹/۷۱ ± ۴۳/۱۳^{b}	۱۱۷/۱۸ ± ۱۴/۶۴^{b}
اسید اوریک (mg/dl)	۱/۱۳ ± ۰/۰۰۳	۱/۱۵ ± ۰/۰۰۴	۱/۲۴ ± ۰/۰۶
اوره (mg/dl)	۳/۴۱ ± ۰/۲۲^{b}	۴/۱۱ ± ۰/۰۶^{c}	۲/۰۳ ± ۰/۰۳^{a}
کلسترول (mg/dl)	۲۸۵/۱۵ ± ۳۱/۵۲^{c}	۲۰۳/۱۱ ± ۴۵/۳۳^{b}	۱۹۰/۴۵ ± ۱۵/۰۶^{a}
پروتئین (g/dl)	۲/۳۹ ± ۰/۰۶^{a}	۳/۷ ± ۰/۰۵^{c}	۳/۱ ± ۰/۳۳^{b}
تری‌گلیسرید (mg/dl)	۲۷۵/۵۴ ± ۱۵/۸۸^{c}	۱۵۵/۴۸ ± ۱۵/۳۱^{a}	۱۷۶/۵۹ ± ۲۶/۵۸^{b}
کلسیم (mg/dl)	۱۳/۶۴ ± ۱/۱۵^{a}	۱۷/۲۷ ± ۲/۵۳^{c}	۱۴/۴۳ ± ۲/۵۸^{b}
کراتینین (mg/dl)	۰/۳۰ ± ۰/۰۳	۰/۳۱ ± ۰/۰۳	۰/۱۸ ± ۰/۰۳
آلبومین (g/dl)	۱/۰۶ ± ۰/۰۳^{a}	۱/۴ ± ۰/۰۵^{b}	۱/۰۳ ± ۰/۰۳^{a}
LDL (mg/dl)	۱۵۴/۱۱ ± ۲۳/۱۲^{c}	۱۲۱/۹۷ ± ۱۴/۱۳^{b}	۱۱۲/۵۴ ± ۲۵/۸۸^{a}
HDL (mg/dl)	۹۳/۴۳ ± ۷/۱۱^{c}	۵۶/۸۸ ± ۳/۳۳^{b}	۴۵/۷۷ ± ۱/۸۳^{a}
ALT (U/L)	۶/۰۳ ± ۰/۵۵^{a}	۷/۱۰ ± ۰/۲۳^{b}	۸/۰۶ ± ۰/۵۵^{c}
AST (U/L)	۵۱۰/۴۱ ± ۷/۳۹^{c}	۲۹۱/۶۷ ± ۱۱/۴۶^{a}	۳۴۱/۲۶ ± ۱۷/۲۳^{b}

میانگین و انحراف معیار (Mean ± S.D) با حروف متفاوت در ردیف‌های یکسان نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار در تیمارها می‌باشند ($p<0.05$)

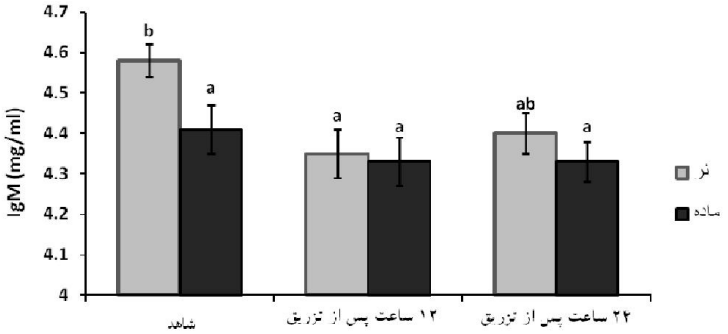
جدول ۲ میانگین فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمی سرم خون مولدین نر ماهی قرمز تحت تزریق هورمون hCG بین تیمارهای مختلف

شاخص‌ها	شاهد	۱۲ ساعت پس از تزریق	۲۴ ساعت پس از تزریق
گلوکز (mg/dl)	۴۶/۲۳ ± ۵/۸۷^{a}	۱۸۳/۳۱ ± ۱۰/۲۵^{c}	۱۲۳/۷۱ ± ۸/۸۴^{b}
اسید اوریک (mg/dl)	۰/۷۶ ± ۰/۰۳^{a}	۰/۹۶ ± ۰/۰۳^{b}	۰/۹۳ ± ۰/۰۶^{b}
اوره (mg/dl)	۵/۳۰ ± ۰/۲۰^{a}	۵/۸۰ ± ۰/۹۶^{b}	۵/۱۳ ± ۰/۱۳^{a}
کلسترول (mg/dl)	۲۱۴/۴۲ ± ۹/۸۲^{c}	۱۶۵/۴۷ ± ۵/۳۳^{a}	۱۶۰/۲۳ ± ۲/۱۶^{a}
پروتئین (g/dl)	۳/۱۳ ± ۰/۰۳^{a}	۴/۱۶ ± ۰/۰۵^{c}	۳/۷۵ ± ۰/۳۳^{b}
تری‌گلیسرید (mg/dl)	۵۰۵/۱۶ ± ۱۰/۴۸^{c}	۱۷۵/۲۷ ± ۵/۳۱^{a}	۲۷۴/۶۱ ± ۱۱/۵۵^{b}
کلسیم (mg/dl)	۶/۳۷ ± ۱/۲۵^{a}	۷/۸ ± ۰/۵۳^{c}	۷/۱۰ ± ۰/۰۸^{b}
کراتینین (mg/dl)	۰/۲۱ ± ۰/۰۵^{c}	۰/۱۸ ± ۰/۰۳^{b}	۰/۱۲ ± ۰/۰۵^{a}
آلبومین (g/dl)	۱/۱۰ ± ۰/۰۸^{b}	۱/۴۰ ± ۰/۰۵^{c}	۰/۹۶ ± ۰/۰۵^{a}
LDL (mg/dl)	۶۸/۰۴ ± ۲/۱۲^{c}	۵۵/۵۲ ± ۱/۲۳^{b}	۵۲/۸۷ ± ۱/۸۸^{a}
HDL (mg/dl)	۸۶/۴۳ ± ۳/۱۱^{c}	۶۸/۳۹ ± ۱/۰۳^{b}	۵۲/۸۸ ± ۲/۲۳^{a}
ALT (U/L)	۶/۰۳ ± ۰/۶۵^{a}	۷/۰۳ ± ۰/۱۳^{b}	۸/۰۳ ± ۰/۲۵^{c}
AST (U/L)	۴۱۸/۹۵ ± ۱۸/۳۹^{c}	۲۷۳/۶۱ ± ۱۰/۸۶^{a}	۳۰۱/۲۶ ± ۱۱/۲۳^{b}

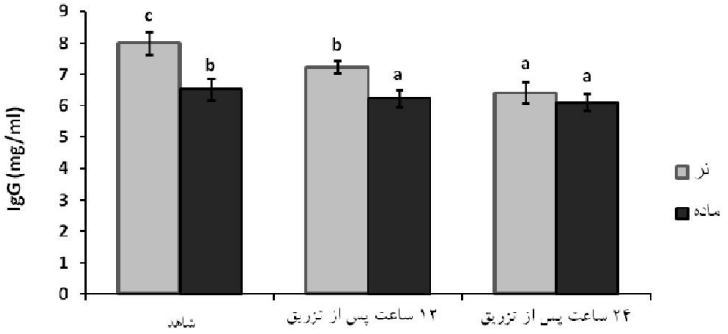
میانگین و انحراف معیار (Mean ± S.D) با حروف متفاوت در ردیف‌های یکسان نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار در تیمارها می‌باشند ($p<0.05$)

تغییرات شاخص‌های ایمنی سرم خون مولدین نر و ماده

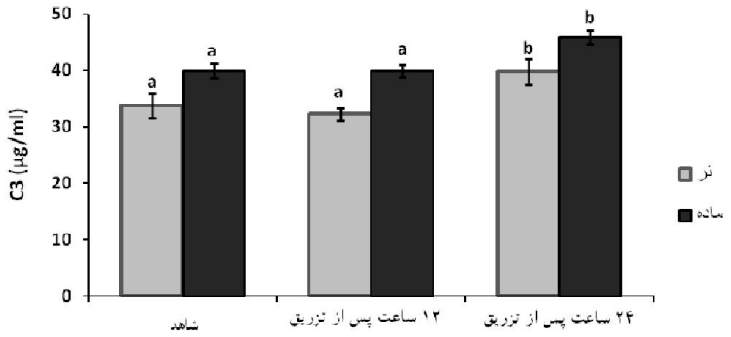
براساس نتایج تحقیق حاضر، سطح سرمی IgM در مولدین ماده در فواصل زمانی ۱۲ و ۲٤ ساعت پس از تزریق هورمون hCG نسبت به گروه شاهد، تغییر معناداری نشان نداد، در صورتی‌که در مولدین نر تزریق شده با هورمون hCG، سطح سرمی IgM نسبت به گروه شاهد کاهش نسبی نشان داد (p <۰/۰۵؛ شکل ۱). سطح سرمی IgG و میزان کپلمان C4 در هر دو گروه مولدین نر و ماده با گذشت زمان از تزریق هورمون، کاهش معناداری پیدا کرد (p <۰/۰۵؛ شکل‌های ۲ و ٤). در صورتی‌که میزان کپلمان C3، در هر دو گروه مولدین نر و ماده با گذشت زمان از تزریق هورمون افزایش معناداری نشان داد (p <۰/۰۵؛ شکل ۳).



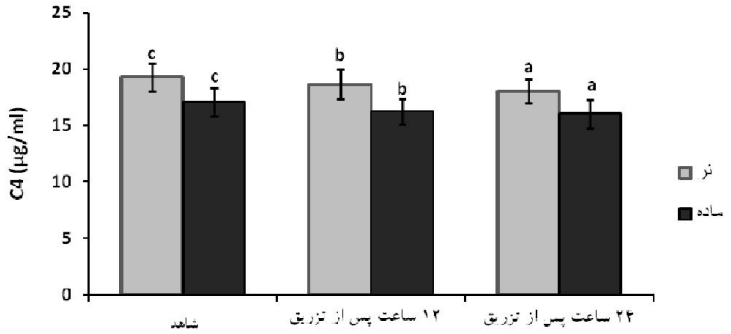
شکل ۱ مقایسه (میانگین ± انحراف معیار) سطح سرمی IgM (mg/ml) مولدین نر و ماده ماهی قرمز، تحت تزریق هورمون hCG در فواصل ۱۲ و ۲٤ ساعت پس از تزریق (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است)



شکل ۲ مقایسه داده‌های (میانگین ± انحراف معیار) سطح سرمی IgG (mg/ml) مولدین نر و ماده ماهی قرمز، تحت تزریق هورمون hCG در فواصل ۱۲ و ۲٤ ساعت پس از تزریق (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است)



شکل ۳ مقایسه داده‌های (میانگین ± انحراف معیار) سطح سرمی C3 (µg/ml) مولدین نر و ماده ماهی قرمز، تحت تزریق هورمون hCG در فواصل ۱۲ و ۲٤ ساعت پس از تزریق (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است)



شکل ٤ مقایسه داده‌های (میانگین ± انحراف معیار) سطح سرمی C4 (µg/ml) مولدین نر و ماده ماهی قرمز، تحت تزریق هورمون hCG در فواصل ۱۲ و ۲٤ ساعت پس از تزریق (حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است)

بحث

با وجود خالص‌سازی بسیاری از هورمون‌های مؤثر در القای تولیدمثل ماهیان مانند هورمون‌های LH[1] و FSH[2]، ولی دسترسی سخت، مشکل خالص‌سازی و همچنین هزینه بالای این دسته از هورمون‌ها، باعث محدودیت استفاده از آنها می‌شود. درصورتی‌که قیمت پایین و سهولت دسترسی به hCG باعث شده که این هورمون به‌عنوان روشی مؤثر در القای تولیدمثل ماهیان، کاربرد گسترده‌ای داشته باشد. hCG ممکن است در دُزهای انفردای به‌صورت یک مرحله‌ای و یا به‌صورت هفتگی به مولدین تزریق گردد (Zohar and Mylonas, 2001). تحقیق حاضر نشان داد که تزریق یک مرحله‌ای هورمون گنادوتروپین جفتی انسانی باعث تغییر در شاخص‌های ایمنی، بیوشیمیایی و آنزیمی سرم خون مولدین نر و ماده ماهی قرمز گردید.

سیستم ایمنی در ماهیان به‌عنوان خط دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا مطرح است. در پستانداران ۵ گروه Ig با وظایف گوناگون وجود دارد که شامل IgE، IgA، IgG

1 Luteinizing hormone
2 Follicle stimulating hormone

پاسخ ایمنی و تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی ... ـــــــ

زمان قرارگیری جانور در معرض شرایط استرس‌زا می‌باشد (Percin and Konyalioglu, 2008). به نظر می‌رسد در پژوهش حاضر محتوای پروتئین کل سرم به‌دنبال قابلیت تحریک ایمنی توسط hCG افزایش یافته باشد. مطابق با تحقیق حاضر، Falahatkar و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که در ماهی سوف سفید (*S. lucioperca*) تیمارهایی که با هورمون‌های گنادوتروپین انسانی و عصاره هیپوفیز کپور تزریق شده بودند، میزان کورتیزول و گلوکز افزایش یافت. Metwally و Fouad (۲۰۰۸)، تأثیر تزریق هورمون اوواپریم و hCG را بر روی برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون مولدین نر و ماده کپور علفخوار (*C. idellus*) بررسی نمودند و افزایش معناداری را در سطح کورتیزول، گلوکز و پروتئین کل مشاهده کردند. از طرفی دیگر، سطح اوره، کلسیم و آلبومین در هر دو گروه مولدین نر و ماده با گذشت ۱۲ ساعت از تزریق هورمون افزایش معناداری نشان داد و پس از گذشت ۱۲ ساعت از تزریق هورمون روند کاهشی در رابطه با این شاخص‌ها مشاهده شد. همچنین تزریق هورمون hCG باعث کاهش معناداری در میزان کلسترول، تری‌گلیسرید، HDL، LDL و AST در هر دو گروه از مولدین نر و ماده گردید. درصورتی‌که سطح ALT برای هر دو گروه از مولدین افزایش نشان داد. گزارش‌ها مستند و کافی دربارهٔ تغییرات آنزیم‌های سرم خون ماهیان مولد در نتیجه تزریق هورمون‌های القاکننده تولیدمثل ارائه نشده و اغلب گزارش‌ها در زمینه اثرات سموم و یا ترکیبات مختلف غذایی در مرحله رشد ماهیان انجام شده است. بنابراین در تحقیق حاضر تغییرات آنزیم‌های اندازه‌گیری شده در نتیجه تزریق hCG چندان شناخته شده نیست. عوامل محیطی و فیزیولوژیک متعدی از قبیل سن، شوری آب، فصل سال، وضعیت بلوغ، جنسیت، درجه حرارت آب و نوع تغذیه بر سطح آنزیم‌های سرمی و میزان فعالیت آنها مؤثرند (Hille, 1982; Shahsavani et al, 2007). کلسترول و تری‌گلیسرید به‌عنوان دو ترکیب مهم در طی تکامل گناد و بیوسنتز استروئیدهای جنسی نقش دارند. کلسترول در سنتز استروئیدهای جنسی و تری‌گلیسرید به‌عنوان منبع انرژی تولیدمثلی نقش مهمی در گناد مولدین برعهده دارند. این ترکیبات در طی بلوغ دارای تغییرات زیادی می‌باشند (Hemre et al, 2002). تغییرات کلسترول و تری‌گلیسیرید در این تحقیق احتمالاً در نتیجه تغییرات استروئیدهای جنسی و بلوغ گناد در نتیجه تزریق هورمون hCG است. مطابق با تحقیق حاضر، کاشت هورمون تری یدوتیرونین (T3) باعث افزایش معناداری در غلظت کلسترول و کلسیم سرم خون فیل ماهیان (*Huso huso*) ماده پرورشی سه ساله در مرحله پیش زرده‌گیری شد (Poursaeid et al, 2013). به‌طور معمول با سنجش سطح فاکتورهای بیوشیمی و آنزیم‌های سرم، می‌توان به اطلاعات مهمی دربارهٔ بافت‌های بین سلولی و وضعیت سلولی جانور دست یافت. استرس‌های محیطی، ترکیبات سمی و بیماری‌ها، به‌طور گسترده سطح فاکتورهای بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های سرم خون و کبد جانور را تحت تأثیر قرار می‌دهند (De La Torre et al, 2000; Peres et al, 2014). در این تحقیق، تغییرات سریع در بسیاری از شاخص‌ها به‌ویژه فاکتورهای ایمنی، ۱۲ ساعت پس از تزریق مشاهده شد و با گذشت ۲٤ ساعت پس از تزریق بیشتر فاکتورها روند بازگشت به حالت اولیه نشان دادند که می‌تواند حاکی از تأثیر کوتاه مدت تزریق هورمون بر روی فاکتورهای ایمنی، بیوشیمیایی و آنزیمی سرم خون باشد.

براساس نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر مشاهده می‌شود تزریق یک مرحله‌ای هورمون hCG در فاصله زمانی کوتاه پس از تزریق، باعث تغییر معناداری در

شاخص‌های ایمنی، بیوشیمیایی و آنزیمی سرم خون مولدین نر و ماده ماهی قرمز شد، با وجود اینکه با گذشت ۲٤ ساعت پس از تزریق بیشتر فاکتورها روند بازگشت به حالت اولیه نشان دادند. به‌طورکلی می‌توان چنین استنباط کرد که احتمالاً پاسخ ضعیف تولیدمثلی بیشتر ماهیان مولد پرورشی به تزریق هورمون hCG نسبت به سایر هورمون‌های سنتتیک، در فصل تولیدمثل، تغییرات گسترده در شاخص‌های ایمنی، بیوشیمیایی و آنزیمی سرم خون مولدین در نتیجه نحوه عملکرد hCG بر روی مولدین باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که هورمون‌های پلی‌پپتیدی با زنجیره طویل مانند hCG که باعث تحریک سیستم ایمنی در ماهیان می‌شود با احتیاط بیشتری به‌کار گرفته شوند، یا تا حد امکان از هورمون‌های سنتتیک مانند هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپین (GnRHa)[1] به‌منظور القای تولیدمثل ماهیان استفاده شود که اثرهای جانبی کمتری بر روی مولدین ماهیان دارند. همچنین با توجه به اینکه تأثیر تزریق هورمون hCG بر روی گونه‌های مختلف آبزیان اختصاصی است، بنابراین تزریق تک مرحله‌ای و یا مکرر و استفاده از دُزهای مختلف بر پاسخ ایمنی و تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمی سرم خون سایر گونه‌های ماهیان نیز بررسی شود.

تشکر و قدردانی

لازم است مراتب قدردانی و سپاس خود را از خانم دکتر فرزانه وردی مسئول آزمایشگاه تشخیص طبی وردی (سنندج)، به سبب همکاری در اجرای این تحقیق اعلام داریم. همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان برای تأمین هزینه‌های مالی این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

1 Gonadotropin releasing hormone

منابع

Ascoli, M., Fanelli, F. and Segaloff, D.L. 2002. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine Reviews*, 23: 41-74.

Ataeimehr, B., Bagheri, P., Emtyazjoo, M. and Yousefi Siahkalroodi, S. 2014. Study on effect of aloe vera (*Aloe vera*) on changes of immunoglobulins IgM ,IgA and IgG, total protein and differential counts of white blood cells of rainbow trout (*Oncorynchus mykiss*). *Journal of Animal Research*, 27: 89-99.

Boshra, H.L.J. and Sunyer, J.O. 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 239-262.

Cuesta, A., Vargas-Chacoff L., García-López A., Arjona F.J., Martínez-Rodríquez G., Mesequer J., Macera, J.M. and Esteban, M.A. 2007. Effect of sex-steroid hormones, testosterone and estradiol, on humoral immune parameters of gilthead seabream. *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 693-700.

De La Torre, F.R., Salibian, A. and Ferrari, L. 2000. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environmental Pollution*, 109: 277-282.

Falahatkar, B., Poursaeid, S., Efatpanah, I., Meknatkhah, B. and Ershad Langroudi, H. 2010. Effects of hormonal treatment on induced spermiation, ovulation and steroids changes in Eurasian pikeperch *Sander lucioperca*. *Aquaculture Europe 2010*, October 5-8, Porto, Portugal.

Firouzbakhsh, F., Abedi, Z., Rahmani, H. and Khalesi, M.K. 2013. A comparative study of some blood factors in male and female Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) broodstock from the southern basin of the Caspian Sea. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,* 37: 320-325.

Golmoradizadeh, A., Sajjadi, M.M., Falahatkar, B., Efatpanah, I. and Hamzehnezhad Bangoudi, M. 2012. Effect of Human Chorionic Gonadotropin (HCG) and Carp Pituitary Extract (CPE) on plasma sex steroid hormones, stress parameters levels and spermatozoa quality in *Sander lucioperca* (pikeperch). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 3: 65-84 (In Persian).

Guzmana J., Ramosa, J, Mylonasb, C. and Mañanós, E. 2011. Comparative effects of human

frisii kutum subjected to captivity. *International Aquatic Research*, 2: 55-60.

Ohta, H. and Tanaka, H. 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin HCG and 11-ketotestosterone after a single injection of HCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 153: 123-134.

Percin, F. and Konyalioglu, S. 2008. Serum biochemical profiles of captive and wild northern bluefin tuna, (*Thunnus thynnus* L. 1758) in the Eastern Mediterranean. *Aquaculture Research*, 39: 945-953.

Peres, H., Santos, S. and Oliva-Teles, A. 2014. Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40: 1339-1347.

Pisano, E., Coscia, M.R., Mazzei, F., Ghigliotti, L., Coutanceau, j., Ozouf-Costaz, C. and Oreste, U. 2007. Cytogenetic mapping of immunoglobulin heavy chain genes in Antarctic fish. *Genetica*, 130: 9-17.

Poursaeid, S., Falahatkar, B. and Mojazi Amiri, B. 2013. Physiological responses in cultured beluga, Huso huso, implanted by triiodothyronine. *Journal of Marine Science and Technology,* 12, 90-105 (In Persian).

Qstegaard, A. E., Martin, S. A. M., Wang, T., Stet, R. J. M. and Secombes C. J. 2009. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess multiple novel immunoglobulin-like transcripts containing either an ITAM or ITIMs. *Developmental and Comparative Immunology*, 33: 525-532.

Savan, R., Aman, A. Nakao, M., Watanuki, H. and Sakai,M. 2005. Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Immunogenetics*, 57: 458-463.

Shahsavani, D., Mohri, M. and Taghvaeimoghadam, E. 2007. Determination of concentration some blood serum enzymes of *Huso huso*. *Journal of Veterinary Research*, 62: 127-129 (In Persian).

Tian, J.Y., Sun, B.J., Luo, Y.P., Zhang, Y.A. and Nie, P. 2009. Distribution of IgM, IgD and IgZ in mandarin fish, *Siniperca chuatsi* lymphoid tissues and their transcriptional changes after chorionic gonadotropin (hCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. *Aquaculture*, 316: 121-128.

Hemre, G.I., Taranger, G.L. and Hansen, T. 2002. Gonadal development influences nutrient utilisation in cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 214: 201-209.

Hille, S. 1982. A litrature review of the blood chemistery of Rainbow trout (*Salmo garrdneri*). *Journal of Fish Biology*, 20: 535-569.

Hodson, R. and Sullivan, C.V. 1993. Induced maturation and spawning of domestic and wild striped bass *morane saxatilis* broodstock eith implated GnRH analogue and injected HCG. *Aquaculture and Fish Management,* 24: 389-398.

Hou, Y., Suzuki, Y.Y. and Aida, K. 1999. Effects of steroid hormones on immunoglobulin M (IgM) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 20: 155-162.

Lam, T.J. 1982. Applications of endocrinology to fish culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39: 11-137.

Lupi, P., Vigiani, V. and mecatti, M. 2006. Contribution to the definition of metabolic profile of farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*), *Italian Journal of Animal Science*, 5: 63-71.

Metwally, M.A.A. and Fouad. I.M. 2008. Some biochemical changes associated with injection of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) with Oviaprim and Pregnyl for induction of artificial spawning. *Global Veterinaria,* 6: 320-326.

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

Munakata, A. and Kobayashi, M. 2010. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 456-468.

Nikoo, M., Falahatkar, B., Alekhorshid, M., Haghi, B.N., Asadollahpour, A., Dangsareki, M.Z. and Ershad Langroudi, H.F. 2010. Physiological stress responses in kutum, *Rutilus*

Yano, T. 1992. Assays of hemolytic complement activity. In: Stolen, S.J., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaattari, S.L., Rowley, A.F. (eds.). Techniques in Fish Immunology. Fair Haven, NJ, USA: *SOS publication.* 131-141.

Zhong, H., Zhou, Y., Yu, F., Xiao, J., Gan, X. and Zhang, M. 2014. Seasonal changes and human chorionic gonadotrophin (hCG) effects on innate immune genes expression in goldfish (*Carassius auratus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 38: 303-310.

Zohar, Y. and Mylonas, C.C. 2001. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136.

Flavobacterium columnare stimulation. *Aquaculture,* 288: 14-21.

Tsampalas, M., Gridelet, V., Berndt, S., Foidart, J. M., Geenen, V. and S Perrier d'Hauterive, S. 2010. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *Journal of Reproductive Immunology*, 85: 93-98.

Van Der Kraak, G., Pankhurst, N.W., Peter, R.E. and Lin, H.R. 1989. Lack of antigenicity of human chorionic gonadotropin in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture* ,78: 81-86.

Van Der Kraak, Chanh, J.P. and Janz, D.M. 1998. Reproduction. In: The physiology of fishes. 2nd Edition, Evans, D.H., (Ed.), *CRC Press, Boca Raton*, Chapter 18.

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 5, No. 2, Summer 2016

Immune response and changes in serum biochemical and enzymes of goldfish broodstock (*Carassius auratus gibelio*) injected with human chorionic gonadotropin (hCG)

Vahid Zadmajid[1*], Asaad Vaziry[2]

1- Assistant Prof., Department of Fisheries Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2- Assistant Prof., Department of Animal Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Received: 22.08.2015 Accepted: 18.06.2016
*Corresponding author: zadmajid@gmail.com

Abstract:

The effect of human chorionic gonadotropin (hCG) on the immune response, biochemical parameters and serum enzymes in adult male and female goldfish during breeding season was investigated. Mature male and female received an intramuscular injection of human chorionic gonadotropin (hCG) 1/ IU hCG g/ BW and the control group was injected with saline solution. Twelve and 24 hours after hCG injection, blood samples were taken from broodstock and immune parameters (IgM, IgG, C3, C4), biochemical and enzymes (glucose, uric acid, urea, cholesterol, total protein, triglycerides, calcium, creatinine, albumin, HDL, LDL, AST and ALT) were measured. There were no significant changes in IgM levels in females between 12 and 24 hours after hCG injection compared to the control group ($P>0.05$). However, IgM level in male showed a gradual decrease in comparison to control fish ($P<0.05$). On the other hand, the concentration of IgM and C4 complement decreased by passing time after hCG injection in both male and female ($P<0.05$). The C3 complement dramatically increased after hCG injection in both male and female ($P<0.05$). Injection of human chorionic gonadotropin caused a significant change in serum biochemical and enzyme in both male and female. The results showed that the hCG hormone even in a single dose within a short time after injection, strongly stimulate the immune system and changes physiological condition of adult male and female goldfish.

Keywords: Goldfish, hCG, Immune response, Serum biochemical and enzymes