مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال دوم، شماره اول، پیاپی پنجم، تابستان ۱۳۹۲ (۳۲-۲۱)

بررسی شاخص‌های استرس در پاسخ حاد و نیمه حاد ماهی قرمز (*Carassius auratus*) نسبت به آلاینده‌های مختلف آبی

بهروز حیدری[۱]*، الهام عبدزاده[۲]، فاطمه نظرحقیقی[۳]
۱. عضو هیئت علمی، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
۲. دانشجوی دکتری، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
۳. دانشجوی دکتری، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
(تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۲۸، تاریخ تصویب: ۹۲/۴/۲۳)

چکیده
به منظور بررسی میزان کورتیزول و گلوکز و دیگر شاخص‌های محتمل در پاسخ به استرس در ماهی گلدفیش *Carassius auratus*، در بخش نخست آزمایش، بیس فنل آ(0.5 mg/L)، نفتالن (200µg/L) و بوتاکلر(60%) (0.28 µg/L) به مدت دو هفته به آب آکواریوم‌ها اضافه شدند. در بخش دوم تزریق درون صفاقی بیس فنل آ، نفتالن، بوتاکلر به ترتیب هر یک به غلظت 50 mg/kg، 50 mg/kg، 20 µL بر وزن بدن ماهی انجام شد.در روز پنجم و در انتهای آزمایش (روز پانزدهم) و نیز ۴۸ ساعت پس از تزریق درون صفاقی، خونگیری از سیاهرگ دمی ماهیان انجام گرفته و میزان کورتیزول، گلوکز، پروتئین کل و فسفر معدنی پلاسمای خون اندازه گیری شدند. نتایج حاصل نشان داد که در میزان کورتیزول و گلوکز در روز ۵، اختلاف معنی‌دار بین تیمار کنترل و بوتاکلر وجود داشت (P<0.05) و در دیگر تیمارها این اختلاف دیده نشد. همچنین به لحاظ آماری هیچ اختلاف معناداری در میزان کورتیزول، گلوکز، پروتئین کل و فسفر معدنی پلاسمای خون ماهیان تحت استرس و نمونه‌های شاهد در پایان آزمایش (روز پانزدهم) و نمونه‌های تزریقی وجود نداشت (P>0.05). در مقایسه نتایج حاصل از آنالیز پلاسمای خون در روزهای پنجم و پانزدهم آزمایش مشخص شد که میزان کورتیزول و گلوکز تیمار بوتاکلر در این دو بازه زمانی تفاوت معناداری باهم داشتند (P<0.05). در مجموع به‌نظر می‌رسد که ماهی گلدفیش می‌تواند یک ماهی مقاوم در برابر آلاینده‌های آبی باشد و زمان پاسخگویی نسبت به آلاینده‌های محیطی بین ۳ تا ۵ روز می باشد.

واژه‌های کلیدی: آلاینده، کورتیزول، گلوکز، *Carassius auratus*.

Study on Stress Indices in the Acute and Sub-Acute Response of *Carassius auratus* to the Aquatic Pollutants

B. Heidari[1]*, E. Abdzadeh[2], F. Nazarhaghighi[3]
1. Scientific member,Department of Biology, Faculty of Science, the University of Guilan, Rasht
2. PhD Student, Department of Biology, Faculty of Science, the University of Guilan, Rasht
3. PhD Student, Department of Biology, Faculty of Science, the University of Guilan, Rasht
(Received: Nov. 18, 2012; Accepted: Jul. 14, 2013)

ABSTRACT
To evaluate the levels of cortisol, glucose and other possible indicators of goldfish, *Carassius auratus*, in response to stress, in the first experiment, Bisphenol A (0.5 mg/L), Naphthalene (200 µg/L) and Butachlor (60%) (0.28 µg/L) were added to the aquariums water for two weeks. In the second experiment, intra-peritoneal injections of Bisphenol A, Naphthalene and Butachlor, with dose 50 mg/kg, 50 mg/kg, 20 µL on the body weight of fish were performed. On the fifth day and the end of the experiment (fifteenth day) as well as 48 hours after injection, blood sampling from caudal vein was taken and levels of cortisol, glucose, total protein and inorganic phosphorous in blood plasma were measured. The results showed that the cortisol and glucose levels on day 5, was a significant difference between control and Butachlor treatments (P <0.05) and this difference was not observed in the other treatments. In addition, there were not statistically significant differences in the plasma levels of cortisol, glucose, total protein and inorganic phosphorus in fish under stress and control samples at the end of the experiment (fifteenth day) and injected samples (P>0.05). Comparing the results of the analysis of blood plasma in the fifth and fifteenth days of experiment, it was found that levels of cortisol and glucose in the treatment Butachlor had significantly different together within two periods (P<0.05). In general, it seems that the goldfish can be resistant to aquatic pollutants and respond time to the environmental stresses is between 3 to 5 days.

Keywords: Pollutant, Cortisol, Glucose, *Carassius auratus*.

* نویسنده مسؤول: بهروز حیدری E-mail: behrooz1072@yahoo.com

مقدمه

در سال‌های اخیر مفهومی از استرس که درباره ماهی‌ها به‌کار رفته، در میان دانشمندانی که تحقیقات خود را به بررسی تأثیرات محیط بر سلامت اختصاص داده‌اند، طرفداران زیادی یافته است (Barreto *et al*., 2006). در تعریف استرس، بین دانشمندان اختلاف نظر وجود دارد اما یکی از پذیرفته‌شده‌ترین تعاریف آن است که استرس یعنی عوامل فیزیکی و یا شیمیایی که سبب واکنش بدن شده و منجر به بیماری و یا مرگ گردد (Martinez-Porchas *et al*., 2009). امروزه ثابت شده است که گستره وسیعی از مواد شیمیایی ساخته شده به دست بشر با وارد شدن به محیط آبی به‌طور بالقوه قادر به برهم زدن سیستم اندوکرینی موجودات آبزی هستند (Rouhani *et al*., 2002). آلاینده‌ها معمولاً طیف وسیعی از اثرات و پاسخ‌ها را در موجودات زنده از سطح سلولی و ترکیبات بیوشیمیایی گرفته تا سطح رفتاری، رشد و تولیدمثل ایجاد می‌کنند (Chovanec *et al*., 2003). پاسخ به استرس در ماهی با تحریک هیپوتالاموس آغاز شده و منجر به فعالیت سیستم نورواندوکرینی و به‌راه افتادن یک آبشار متابولیکی پی‌درپی و تغییرات فیزیولوژیکی می‌گردد (Wedemeyer *et al*., 1990). شاخص‌های استرس در سطوح مختلف سازمان‌های زیستی به‌عنوان ابزاری در مطالعات اکوتوکسیکولوژیکی و بررسی این پاسخ‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (Alcaraz, 2000). تاکنون پارامترهای خونی متنوعی به‌عنوان ابزاری قابل اطمینان در تعیین شدت نسبی استرس در ماهی‌ها در نظر گرفته شده‌اند (Al-Kindi, 2000). آنالیز خون با مشخص کردن تغییرات عمده در ترکیبات اصلی آن از قبیل نوسان‌های ایجاد شده در میزان اجزاء پایه خون می‌تواند موقعیت‌های مختلف پاسخ به استرس، آلاینده‌ها و وضعیت‌های اکولوژیکی و فیزیولوژیکی را آشکار کند (Yousefian *et al*., 2011). به دلیل حساسیت عموماً بالاتر جانوران آبزی به ترکیبات مصنوعی ساخته بشر در مقایسه با جانوران خشکی‌زی، این موجودات نقش عمده‌ای در تست‌های آزمایشگاهی حاد، نیمه‌مزمن و مزمن ایفا می‌کنند (Franzle, 2003). ماهی‌ها نه تنها در جنبه مطالعات آلودگی به‌کار می‌روند بلکه برای ارزیابی ویژگی‌های مرکب و پیچیده ساختار محیط زیست نیز به‌کار می‌روند (Chovanec *et al*., 2003). گلد فیش یا *Carassius auratus* مکرراً برای اهداف مختلف آزمایشی مورد استفاده گرفته است. این گونه بومی منطقه شرق آسیا و کشور چین است و از آنجا به ژاپن و بخش‌هایی از اروپا و سراسر آمریکای شمالی منتشر شده است (Franzle, 2003). در این مطالعه پاسخ‌های ناشی از استرس ماهی گلدفیش همچون تغییر میزان کورتیزول و گلوکز، پروتئین کل و فسفر پلاسمای خون در برابر آلاینده‌های شیمیایی محیطی مانند بیس فنل آ، نفتالن و بوتاکلر که هریک به‌عنوان برهم زننده عملکردهای طبیعی در انسان‌ها و جانوران شناخته شده‌اند، مورد بررسی قرار گرفته است. بیس فنل آ جزء دی فنیل آلکان‌ها و ماده اولیه تولید پلیمرهایی مانند پلی‌کربنات‌ها، رزین‌های اپوکسی و فنولیک، پلی‌استرها و پلی‌آکریلات‌ها می‌باشد و همچنین به صورت تجاری در دندان‌پزشکی، صنایع پلاستیک‌سازی و غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد و با ورود به فاضلاب‌های صنعتی باعث اختلال در سیستم نورواندوکرینی موجودات آبزی می‌شود (Lv *et al*., 2007). خاصیت استروژنی بیس فنل آ به واسطه تقلید عمل هورمون ۱۷ بتا–استرادیول درون‌زا در مطالعات آزمایشگاهی و محیطی بسیاری به ثبت رسیده است (Letcher *et al*., 2005). Van den Belt و همکاران (2003) نشان دادند که معارضه ماهی نر Zebrafish و ماهی نابالغ قزل‌آلای رنگین‌کمان با ۱۰۰۰ µg/l بیس فنل آ باعث افزایش سطح پلاسمایی ویتلوژنین در طی سه هفته می‌شود در

حالی که غلظت‌های پایین‌تر (۲۰۰ µg/l) تأثیری در بروز پاسخ طی سه هفته نداشت. ثابت شده است هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs)، به واسطه داشتن خاصیت جهش و سرطان‌زایی بر فرایندهایی مانند رشد، تولیدمثل و تنظیم اسمزی ماهیان مؤثر می‌باشند (Nicolas, 1999). هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به واسطه تقلید کردن و یا از بین بردن اثرات طبیعی هورمون‌ها منجر به بروز اختلالات در متابولیسم هورمونی و یا فرآیندهای سلولی و فیزیولوژیکی تنظیم‌شونده توسط هورمون‌ها می‌شوند و با سیستم نورواندوکرینی ماهیان رقابت می‌کنند (Navas *et al.*, 2004). وجود نفتالن به‌عنوان ساده‌ترین PAHs در آب‌های آلوده شده توسط PAHs مکررا به اثبات رسیده است (Meador *et al.*, 1995). Pollino و همکاران (2009) اثر غلظت‌های مختلف نفتالن (۱۳۰ µg/l، ۲۰۰ و ۴۰۰) بر جنس نر و ماده ماهی رنگین کمان را در طی ۳ و ۱۴ روز مورد مطالعه قرار دادند و تغییراتی در میزان استروئیدهای جنسی بعد از ۳ روز مشاهده نکردند در حالی که کاهش میزان ۱۷بتا–استرادیول در ماده‌ها و افزایش میزان تستسترون در نرها را پس از ۱۴ روز بیان کردند. بوتاکلر به‌عنوان یکی از پر مصرف‌ترین علف‌کش‌ها جهت کنترل علف‌های هرز مزارع برنج مورد استفاده قرار می‌گیرد (Tilak *et al.*, 2007; Farombi *et al.*, 2008). معارضه ماهی سفید نر با غلظت بالای بوتاکلر (۷۵٪ LC50، ۰/۳۲۲ ppm)، کاهش حجم، تراکم و تعداد اسپرم‌ها و همچنین افزایش تعداد اسپرم‌های غیرطبیعی را به دنبال داشت (Lasheidani *et al.*, 2008). Yadav و همکاران(2010) با مطالعه اثرات ژنوتوکسیک بوتاکلر بر ماهی آب شیرین *Cirrhinus mrigala*، افزایش اجسام ریزهسته‌ای در اریتروسیت‌ها پس از ۴۸ ساعت و کاهش رشد پس از ۶۰ روز معارضه با غلظت ۱ ppm بوتاکلر را گزارش کردند.

مواد و روش‌ها

نگهداری نمونه‌ها

برای انجام این آزمایش ماهی‌های سالم و بالغ از مزارع پرورشی منطقه انتخاب و به آزمایشگاه تحقیقاتی زیست دریا در دانشگاه گیلان منتقل شدند. به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی نمونه‌ها به مدت یک هفته در تانک‌های فایبرگلاس حاوی آب شهر بدون کلر و مجهز به سیستم هوادهی مداوم نگهداری شدند. در طی آزمایش کیفیت آب آکواریوم‌ها با کنترل pH در محدوه ۶/۹ تا ۷/۹، اکسیژن محلول در محدوده ۵–۷mg/L و دما در محدوده ۲۲/۵–۲۵/۵°C ثابت نگه داشته شد و آب آکواریوم ها هر سه روز یکبار تعویض گردید.

آزمایش اول

آزمایش در دو بخش انجام شد. در هر بخش ۳ آکواریوم تیمار، یک شاهد و سه تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. در هر آکواریوم تیمار ۸ عدد ماهی قرار داده شد. در آزمایش اول بیس فنل آ به غلظت 0.5 mg/L (Lv *et al.*, 2007)، نفتالن به غلظت 200 µg/L (Pollino *et al.*, 2009) و بوتاکلر 60% به غلظت 20 µM (Wany *et al.*, 1992) به مدت دو هفته به آب آکواریوم‌های کنترل اضافه شد. در این آزمایش ماهی‌ها به‌طور روزانه با غذای آماده تغذیه شدند. اما در ۱۲ ساعت پایانی مانده به خونگیری نمونه‌ها، غذادهی قطع گردید.

آزمایش دوم

در بخش دوم مطالعه تزریق درون صفاقی بیس فنل‌آ، نفتالن و بوتاکلربه ترتیب هر یک به غلظت 50mg/kg (Lv *et al.*, 2007)، 50 mg/kg (Tintos *et al.*, 2006)، 20 µM (Wany *et al.*, 1992) بر وزن بدن ماهی انجام شد. شرایط حاکم مانند آزمایش اول بود. آکواریوم‌ها به‌طور مداوم هوادهی و روزانه به منظور بررسی میزان مرگ‌ومیر

کنترل شدند. در طی این آزمایش تغذیه ماهی‌ها قطع گردید.

خونگیری

در روز پنجم و در پایان هفته دوم آزمایش اول و نیز پس از گذشت ۴۸ ساعت در آزمایش دوم، بعد از بیهوشی و اندازه‌گیری طول و وزن هر نمونه، خونگیری توسط سرنگ‌های هپارینه و از محل سیاهرگ دمی صورت گرفت. بعد از سانتریفیوژ نمونه‌های خون با دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه، پلاسما به لوله‌های پلاستیکی اپندورف منتقل و تا زمان آنالیز در دمای $-۲۰^{o}C$ نگهداری شد. پلاسمای خون نمونه‌های شاهد نیز به همین ترتیب جداسازی شد.

سنجش پارامترها

اندازه‌گیری میزان پروتئین کل و گلوکز پلاسما به روش رنگ‌سنجی (Colorimetric)، میزان فسفر معدنی به روش نورسنجی (Photometric) و میزان کورتیزول پلاسما نیز به روش Radioimmunoassay (RIA) و با استفاده از کیت تجاری ایمونوتک (Immunotech) فرانسه انجام شد.

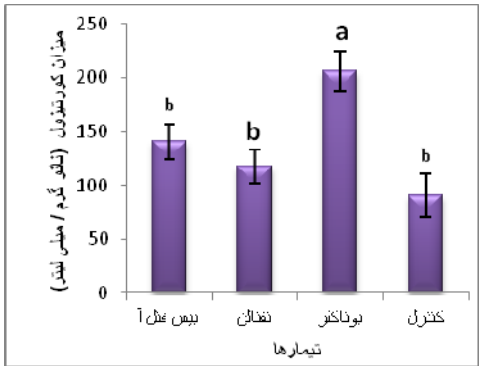
آنالیز آماری

به دلیل نرمال بودن داده‌ها از تست آماری پارامتریک استفاده شد. معنی‌دار بودن یا نبودن میزان تغییرات پارامترها در هر یک از تیمارها طی دوره آزمایش و همچنین بین تیمارهای مختلف توسط تست ANOVA یکطرفه و پس آزمون Dunnett با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. میانگین پارامترها برحسب SE± بیان شده است. تمام آنالیزها توسط نرم‌افزار SPSS 19.0 و رسم نمودارها به وسیله نرم‌افزار EXCEL تحت سیستم عامل WINDOWS 7 انجام گرفت.

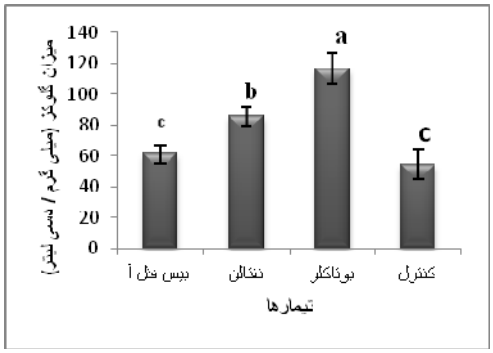
نتایج

آزمایش اول

نتایج حاصل نشان داد که میزان کورتیزول در روز ۵، دارای اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای شاهد (بدون آلاینده) و بوتاکلر بوده ($P<0.05$) و در دیگر تیمارها این اختلاف دیده نشد. میزان کورتیزول به ترتیب از شاهد به نفتالن، بیس فنل آ و بوتاکلر روند صعودی داشت (شکل ۱). اختلاف معنی‌داری بین میزان گلوکز روز ۵ در تیمارهای نفتالن و بوتاکلر با یکدیگر و با شاهد مشاهده شد ($P<0.05$) در حالی که تیمار شاهد با بیس فنل آ اختلاف معناداری نداشت و به ترتیب از بیس فنل آ به نفتالن و بوتاکلر روند صعودی نشان داد (شکل۲).



شکل ۱. تغییرات میزان کورتیزول روز پنجم در تیمارهای مختلف. حروف متفاوت انگلیسی نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تیمارها است ($P<0.05$).



شکل ۲. تغییرات میزان گلوکز روز پنجم در تیمارهای مختلف. حروف متفاوت انگلیسی نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تیمارها است ($P<0.05$).

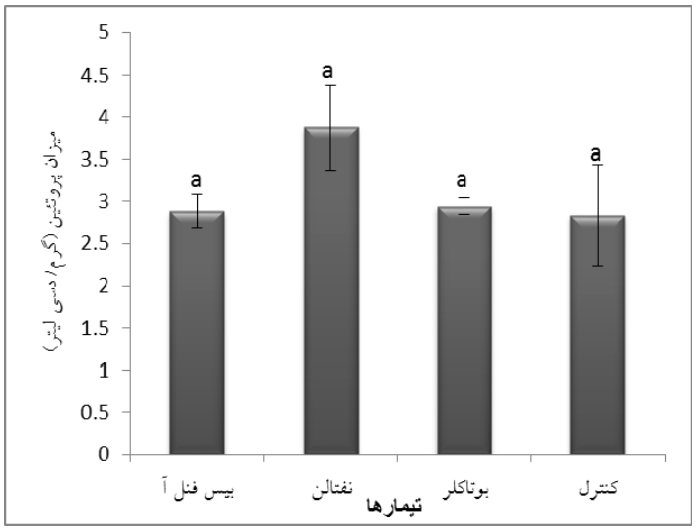
برای میزان پروتئین کل و فسفر معدنی در روز پنجم بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری ثبت نشد (P>0.05) و بیشترین میزان پروتئین کل در تیمار نفتالن گزارش گردید (شکل‌های ۳ و ۴).

همچنین به لحاظ آماری اختلاف معناداری در میزان کورتیزول، گلوکز، پروتئین کل و فسفر معدنی پلاسمای خون ماهیان تحت استرس و نمونه‌های شاهد در پایان آزمایش (روز پانزدهم) وجود نداشت (P>0.05). با وجود عدم مشاهده تفاوت معنادار، میزان فسفر معدنی و پروتئین کل در تیمارها نسبت به شاهد روند نزولی داشتند (شکل ۵ الف، ب، ج و د). بین تغییرات میزان پروتئین کل و فسفر معدنی در روزهای پنجم و پانزدهم نیز یک همبستگی مثبت قوی به ترتیب به اندازه ۷۲ و ۸۸ درصد وجود داشت.

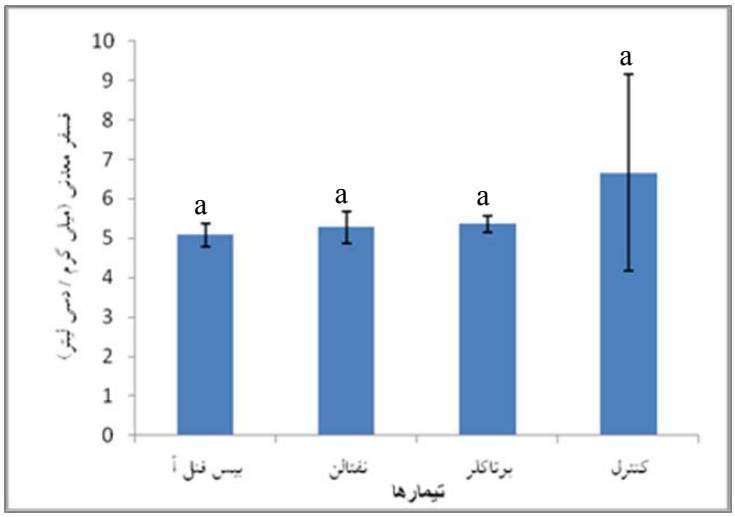
با مقایسه نتایج حاصل از آنالیز خون در روزهای پنجم و پانزدهم آزمایش مشخص شد که میزان کورتیزول تیمار بوتاکلر در این دو بازه زمانی تفاوت معناداری باهم داشتند، در حالی که میزان کورتیزول در تیمار شاهد در این دو بازه زمانی هیچ تغییری نشان نداد و در سایر تیمارها به جز در تیمار بوتاکلر روند نزولی بود و تفاوت معناداری مشاهده نشد (شکل ۶). میزان گلوکز در تیمار بوتاکلر بین دو بازه زمانی پنج و پانزده روزه تفاوت معناداری داشت اما این اختلاف معنادار در تیمار بیس فنل آ و نفتالن بین روزهای پنجم و پانزدهم مشاهده نشد. همچنین میزان گلوکز در تیمار شاهد در این دو بازه زمانی هیچ تغییری نشان نداد (شکل ۷). همچنین میزان پروتئین کل در آزمایش پنج روزه در هر سه تیمار بوتاکلر، نفتالن و بیس فنل آ تفاوت معناداری با میزان آن در روز پانزدهم آزمایش داشت، در حالی که میزان پروتئین کل شاهد در این دو بازه زمانی تفاوتی نشان نداد (شکل ۸). در مورد فسفر معدنی آنالیز آماری داده‌های حاصل نشان داد که علی رغم کاهش در میزان این یون در هر سه تیمار بوتاکلر، نفتالن و بیس فنل آ نسبت به شاهد، این تفاوت معنادار نبوده و مانند کورتیزول، گلوکز و پروتئین کل، تیمار شاهد هیچ تغییری از نظر موارد مورد بررسی نشان نداد (شکل۹).

آزمایش دوم

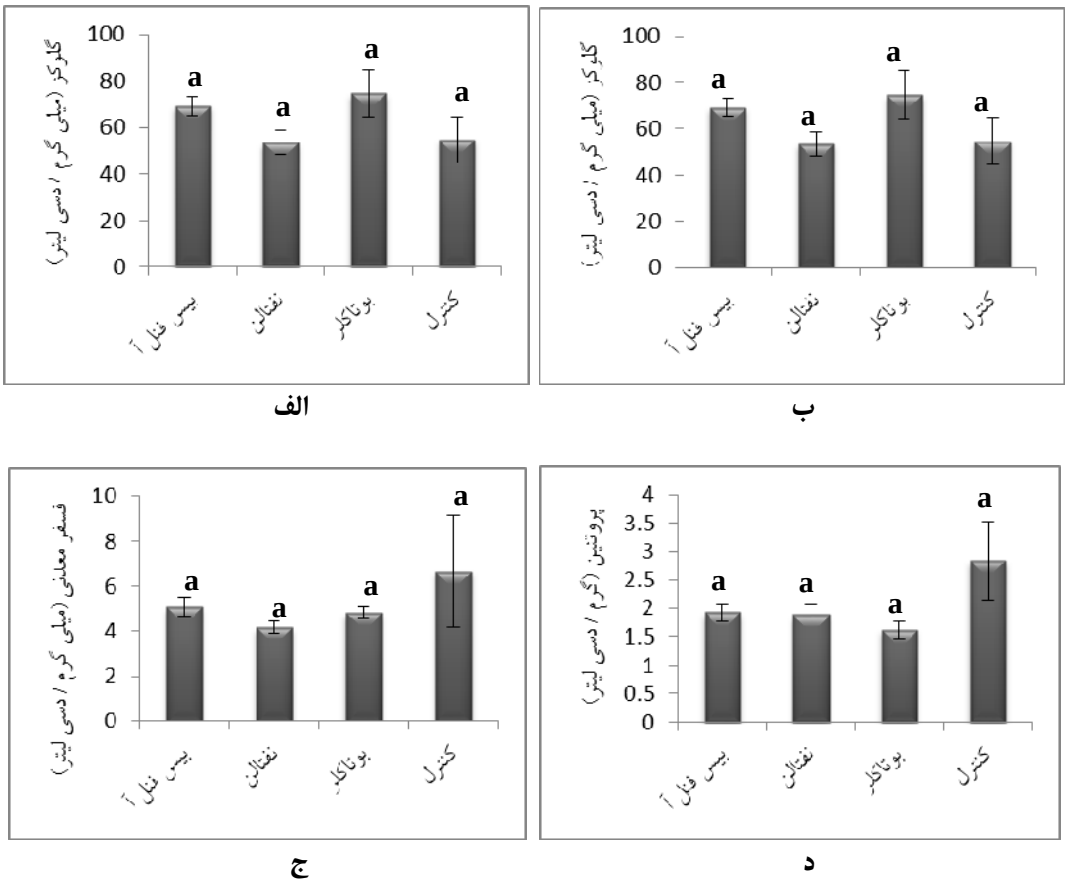
در نمونه‌های تزریقی (۴۸ ساعته) پارامترها در تیمارهای بوتاکلر، بیس فنلآ و نفتالن تفاوت معناداری با شاهد نشان ندادند (P>0.05) (شکل ۱۰ الف، ب، ج و د).



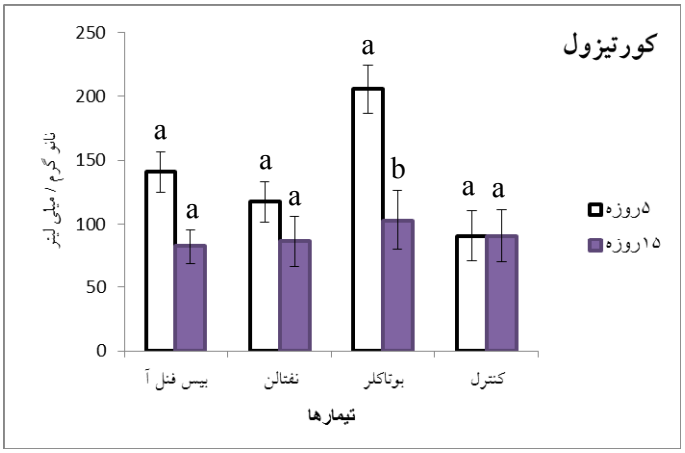
شکل ۳. عدم وجود اختلاف معنی‌دار میزان پروتئین کل تیمارهای مختلف و شاهد در روز پنجم (P>0.05).



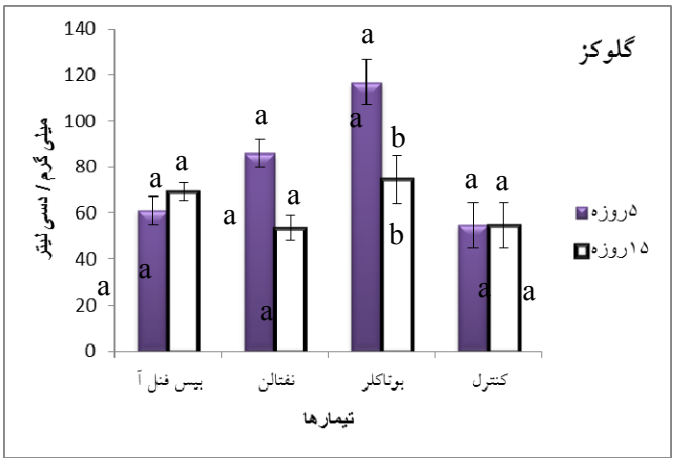
شکل ۴. عدم وجود اختلاف معنی‌دار میزان فسفر معدنی تیمارهای مختلف و شاهد در روز پنجم (P>0.05).



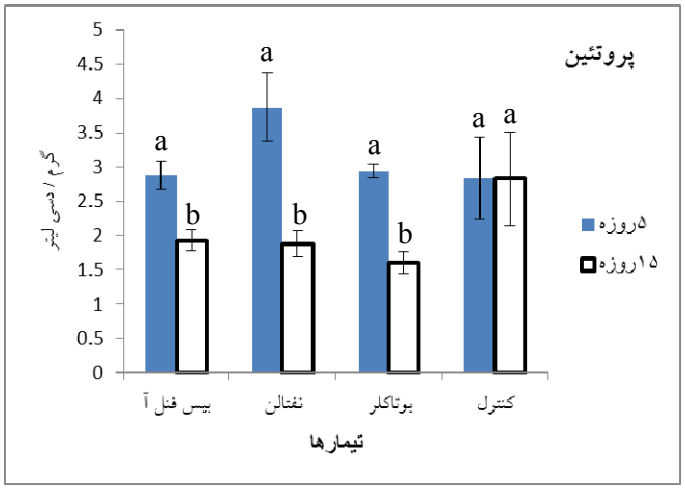
شکل ۵. عدم وجود اختلاف معنی دار در میزان گلوکز (الف)، کورتیزول (ب) ، پروتئین کل (ج) و فسفرمعدنی (د) پلاسمای خون ماهیان تحت استرس و شاهد در پایان آزمایش (روز پانزدهم) (P>0.05).



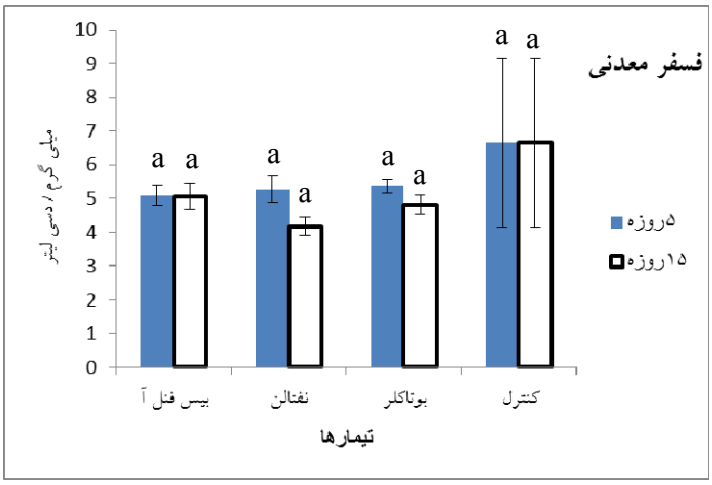
شکل ۶. مقایسه میزان کورتیزول در روز پنجم و پانزدهم در تیمارهای مختلف. فقط کورتیزول تیمار بوتاکلر اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد.



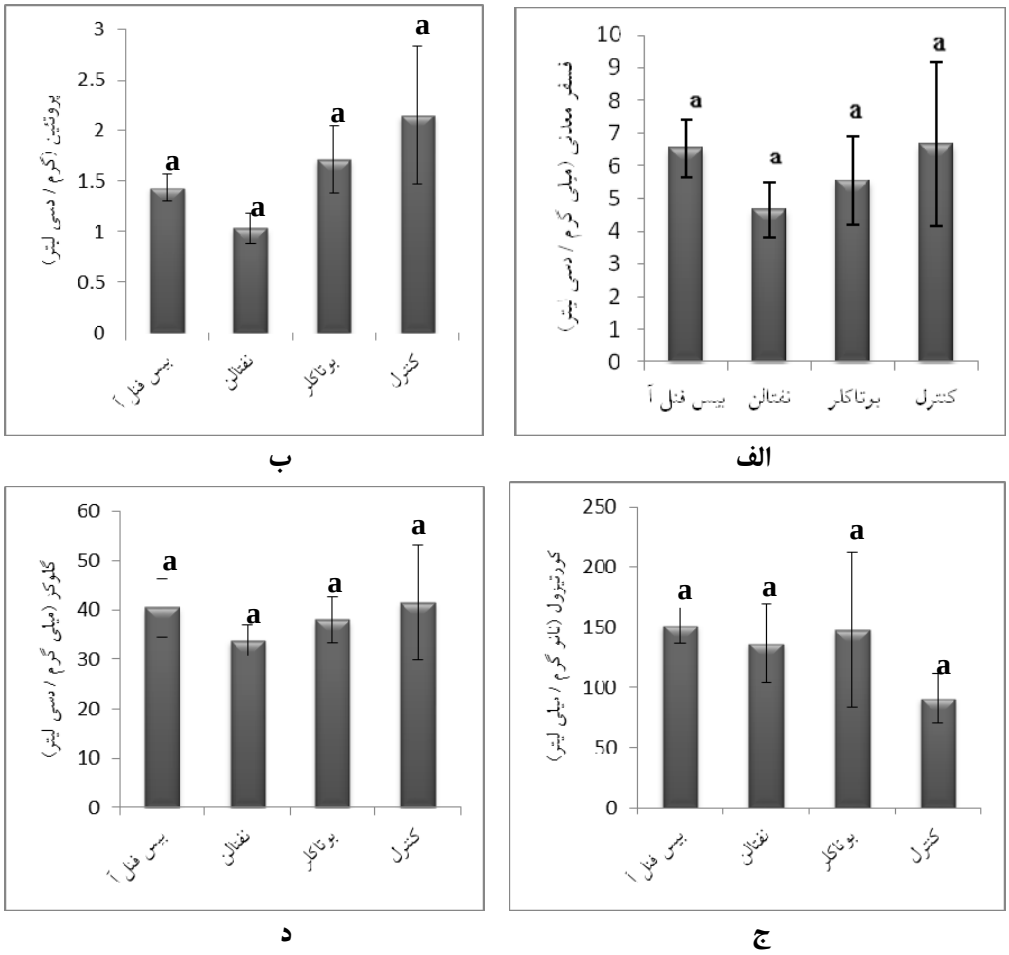
شکل ۷. مقایسه میزان گلوکز در روز پنجم و پانزدهم در تیمارهای مختلف. فقط گلوکز تیمار بوتاکلر اختلاف معنی‌داری نشان می دهد ($P<0.05$).



شکل ۸. مقایسه میزان پروتئین کل در روز پنجم و پانزدهم در تیمارهای مختلف که عدم اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد ($P<0.05$).



شکل ۹. مقایسه میزان فسفر معدنی در روز پنجم و پانزدهم در تیمارهای مختلف که عدم اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد (P>0.05).



شکل ۱۰. تیمارهای تزریقی ۴۸ ساعته که اختلاف معناداری بین پارامترها در تیمارهای مختلف دیده نشد (P>0.05).

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش انجام شده سعی بر آن بود تا پاسخ‌های فیزیولوژیکی ماهی گلدفیش را نسبت به آلاینده‌های متفاوت آبی به‌عنوان استرس‌های محیطی در قالب تست نیمه حاد و به عبارتی نیمه مزمن در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گیرد. موارد بسیاری وجود دارد که نشان می‌دهد در تست‌های مزمن استفاده از شاخص کورتیزول برای بررسی میزان استرس وارد شده به موجود به دلیل عملکرد تنظیمی سریع آن مناسب نیست. در آزمایش‌های استرس مزمن بعضی از ماهیها افزایش ضعیفی در مقادیر کورتیزول نشان می‌دهند (Barton *et al*., 2005; Fast *et al*., 2008)، که ممکن است به علت تخلیه مداوم و بیش از حد سیستم اندوکرینی در نتیجه فعالیت طولانی مدت (Hontela *et al*., 1992) و یا بدلیل عادت کردن موجود زنده به این وضعیت باشد (Martinez *et al*., 2009). در تست‌های نیمه حاد مطالعه حاضر و مقایسه روز پنجم و پانزدهم، برای تقریباً تمامی پارامترها بخصوص کورتیزول به‌عنوان شاخص استرس نشان داده است که بیشترین میزان شاخصهای استرس در روز پنجم دیده شده است و در روز پانزدهم، ماهیان توانستند شرایط سازشی را بدست آورند به‌طوریکه میزان این پارامترها روند نزولی نسبت به روز پنجم (به استثنای گلوکز در تیمار بیس فنل آ) داشتند.

ترشح هورمون‌کورتیزول از سیستم نورواندوکرینی به‌عنوان یکی از پاسخ‌های فوری به وارد شدن یک عامل استرس‌زا به محیط زیست ماهی محسوب می‌شود که به دنبال خود سبب ایجاد آبشاری متابولیکی از پاسخ‌های ثانویه می‌گردد که تغییر در وضعیت شیمیایی خون و بافت را به دنبال دارد. برای مثال سبب افزایش میزان گلوکز پلاسمای خون می‌گردد و یا می‌توان با استفاده از تغییر ایجاد شده در پارامترهای بیوشیمیایی خون از قبیل پروتئین کل، فسفر و کلسیم به‌طور غیرمستقیم وضعیت آلودگی محیط زیست را به لحاظ قرارگیری در معرض ترکیبات برهم‌زننده سیستم نورواندوکرینی نیز پیش‌بینی کرد (Gillespie and Peyster, 2004). در مطالعه حاضر اختلاف معنی‌داری بین میزان گلوکز روز ۵ در تیمارهای بیس فنل آ، نفتالن و بوتاکلر مشاهده شد که در واقع می‌تواند نشان‌دهنده افزایش به وقوع پیوسته در میزان کورتیزول پلاسما بین زمان صفر و روز پنجم آزمایش باشد. همچنین افزایش با تأخیر میزان گلوکز بعد از ترشح کورتیزول می‌تواند بیانگر به راه افتادن آبشار متابولیکی ذکر شده در مطالب فوق باشد. محققین بسیاری این تأخیر چند روزه در افزایش میزان گلوکز بعد از کورتیزول پلاسما را تأیید کرده‌اند (Martinez *et al*., 2009). علی‌رغم استفاده گسترده از گلوکز به‌عنوان شاخص استرس، اما بعضی از محققین معتقدند که در استفاده تنها از گلوکز به‌عنوان تنها شاخص استرس باید احتیاط بیشتری به خرج داد (Flodmark *et al*., 2001; Martinez-Porchas *et al*., 2009)، و همچنین این شاخص نسبت به کورتیزول از دقت کمتری برخوردار است (Martinez-Porchas *et al*., 2009).

در مطالعه صورت‌گرفته روی ماهیان الاسموبرانش تأثیر عوامل استرس‌زا بر افزایش بالقوه فاکتورهای بیوشیمیایی خون از قبیل کلسیم، پروتئین کل، فسفر ثابت شده است (Haulena, 1999). در پژوهش حاضر برای ماهی *Carassius auratus* این تغییرات ملاحظه گردید، اما تفاوت معناداری بین میزان این پارامترها و نمونه شاهد وجود نداشت که می‌تواند مربوط به زمان‌بندی و ویژگی سلسله مراتبی وقوع این پاسخ‌ها باشد که شاید در زمان نمونه‌برداری ثبت نگردیده است. از طرفی همبستگی مثبت قوی بین پروتئین کل و فسفر معدنی می‌تواند بیانگر این نکته باشد که شاید بیومارکری همچون ویتلوژنین که در ساختار آن هم فسفات و هم اسیدامینه وجود دارد سنتز شده است (Hiramatsu *et al*., 2006).

تحقیقات نشان داده که در آزمایش‌های استرس حاد پاسخ کورتیزول به‌طور تنظیم شده‌ای پس از افزیش ضعیف می‌شود و یا حتی چند ساعت پس از رویارویی با استرس ناپدید می‌گردد (Davis and McEntire, 2006). در بیشتر ماهی‌ها پس از یک ساعت از شروع استرس، کورتیزول به بیشترین مقدار خود رسیده و پس از ۶ ساعت دوباره به مقدار اولیه برمی‌گردد (Iwama *et al*., 2006). برای مثال در ماهی سوف قرمز طی روش‌های دستی وارد کردن استرس میزان کورتیزول افزایش می‌یابد اما طی ۴۸ ساعت آینده و در ونتکس معمولی طی ۸ ساعت بعد از وقوع استرس میزان آن به وضعیت پایه برمی‌گردد. Seyle و همکارانش (۱۹۳۶) گزارش کردند که طی ۶ تا ۴۸ ساعت بعد از اینکه یک موجود زنده با موقعیت‌های متفاوتی برخورد کند، تغییرات شیمیایی در خونش (افزایش کورتیزول) بوجود می‌آید. عدم وجود اختلاف معنی‌دار در تست ۴۸ ساعته در آزمایش حاضر شاید به مقاومت گونه گلدفیش در برابر آلودگی برگردد که تغییرات فیزیولوژیکی خود را در معارضه نیمه‌حاد نشان داده است و اینکه نیاز به زمان بیشتری جهت پاسخگویی به استرس‌های محیطی دارد.

در مجموع با توجه به آزمایشات انجام گرفته به نظر می‌رسد که ماهی گلدفیش می‌تواند یک ماهی مقاوم در برابر آلاینده‌ها باشد و اینکه حداکثر زمان لازم جهت پاسخگویی نسبت به آلاینده‌های محیطی بین ۳ تا ۵ روز می‌باشد، زیرا که قبل از ۴۸ ساعت پاسخ فیزیولوژیکی هنوز شروع نشده بود و پس از روز پنجم نیز تقریباً ماهی شرایط سازشی را حاصل کرده بود.

REFERENCES

Alcaraz G (2000) Relevant stress indices in aquatic ecotoxicology. Rev. Int. Contam. Ambient. 16(2): 75- 81.

Al-Kindi AYA, Brown JA, Waring CP (2000) Endocrine, physiological and histopathological responses of fish and their larvae to stress with emphasis on exposure to crude oil and various petroleum hydrocarbons. Science and Technology, Special Review, 1-30.

Barreto RE, Volpato GL (2006) Stress responses of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 39:1605-612.

Barton BA, Ribas L, Acerete L, Tort L (2005) Effects of chronic confinement on physiological responses of the juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata L*. to acute handling. Aquaculture Research, 36: 172-179.

Davis KB, McEntire ME (2006) Comparison of the cortisol and glucose stress response to acute confinement and resting insulin-like growth factor-I concentrations among white bass, striped bass and sunshine bass. Paper presented at Aquaculture America Conference, Stuttgart National Aquaculture Research Center, 13 February, 2006, p.79.

Evans DH, Claiborne JB (2006) The Physiology of fishes. *In:* Iwama G.K., Afonso L.O.B., Vijayan M.M., (Eds), Stress in fishes. Taylor and Francis, 3rd edition. USA.pp319-342.

Farombi EO, Ajimoko YR, Adelowo OA (2008) Effect of butachlor on antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in fresh water African Catfish, (*Clarias gariepinus*), Int. J. Environ. Res. Public Health, 5(5): 423-427.

Fast MD, Hosoya S, Johnson SC, Afonso LO (2008) Cortisol response and immune related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and longterm stress. Fish and Shellfish Immunology, 24: 194-204.

Flodmark LE, Urke WH, Halleraker JH, Arnekleiv JV, Vollestad LA, Poleo

ABS (2001) Cortisol and glucose response in juvenile brown trout subjected to a fluctuating flow regime in an artificial stream. Journal of Fish Biology, 60: 238-248.

Gillespie DK, Peyster A (2004) Plasma calcium as a surrogate measure for vitellogenin in fathead minnows (*Pimephales promelas*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 58:90-95.

Haulena M (1999) Plasma biochemical change in response to transport, handling and variation of eater quality in sand tiger sharks. Dissertation, the University of Guelph. pp: 103.

Hiramatsu N, Matsubara T, Fujita T, Sullivan CV, Hara A (2006) Multiple piscine vitellogenins: Biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. Marine Biology, 149: 35-47.

Hontela A, Rasmussen JB, Audet C, Chevalier G (1992) Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 22: 278-283.

Lasheidani MF, Balouchi SN, Keyvan A, Jamili S, Falakrou K (2008) Effects of butachlor on density, volume and number of abnormal sperms in Caspian Kutum *(Rutilus frisii kutum, Kamenskii 1901)*. Research Journal of Environmental Sciences, 2 (6): 474-482.

Letcher RJ, Sanderson JT, Bokkers A, Giesy JP, Van den Berg M (2005) Effects of bisphenol A-related diphenylalkanes on vitellogenin production in male carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes and aromatase (CYP19) activity in human H295R adrenocortical carcinoma cells. Taxico. Appl. Pharmac., 209: 95-104.

LV X, Zhou Q, Song M, Jiang G, Shao J (2007) Vitellogenic responses of 17β-estradiol and bisphenol A in male Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Environmental Toxicology and Pharmacology, 24: 155-159.

Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (2003) Bioindicators and Biomonitors. *In:* Chovanec A., Hofer R., Schiemer F. (Eds), Fish as bioindicators. Elsevier Science Ltd. pp639-676.

Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (2003) Bioindicators and Biomonitors. *In:* Franzle O. (Ed), Bioindicators and environmental stress assessment. Elsevier Science Ltd. pp41-84.

Martinez-Porchas M, Martinez-Cordova LR, Ramos-Enriquez R (2009) Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 4(2):158-178.

Meador JP, Stein JE, Reichert WL, Varanasi U (1995) Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 143: 79-165.

Navas JM, Zanuy S, Segner H, Carrillo M (2004) β-Naphthoflavone alters normal plasma levels of vitellogenin, 17β-estradiol and luteinizing hormone in sea bass broodstock. Aquat. Toxicol., 67: 337-345.

Nicolas JM (1999) Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. Aquat. Toxicol., 45: 77-90.

Pollino CA, Georgiades E, Holdway DA (2009) Physiological changes in reproductively active rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) following exposure to naphthalene. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72: 1265-1270.

Rouhani-Rankouhi T, Holsteijn I van, Letcher R, Giesy JP, Berg M van den (2002) Effects of primary exposure to environmental and natural estrogens on vitellogenin production in Carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes. Toxicological science, 67:75-80.

Developmental effects of endocrine

disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ Health Perspect. 101: 378-384.

Selye H (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature, 138: 32-32.

Tilak KS, Veeraiah K, Bhaskara Thathaji P, Butchiram MS (2007) Toxicity studies of butachlor to the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). Journal of Environmental Biology, 28(2): 485-487.

Van den Belt K, Verheyen R, Witters H (2003) Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental strogens. Ecotoxicol. Environ. Saf., 56: 271-281.

Yadav AS, Bhathagar A, Kaur M (2010) Assessment of genotoxic effects of butachlor in fresh water fish, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). Research Journal of Environmental Toxicology, 4(4): 223-230.

Yousefian M, Sheikholeslami AM, Dawood K (2011) Serum biochemical parameter of Male, Immature and female Persian Sturgeon (*Acipencer persicus*).