بررسی امکان رسانش پایدار هورمون GnRHa با استفاده از آدجوانت ناقص فروند (FIA) در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

آریا وزیرزاده[۱]*؛ عبدالمجید حاجی مرادلو[۲]؛ حمید رضا اسماعیلی[۳] و مصطفی اخلاقی[۴]

m_vazirzadeh@yahoo.com

۱- گروه شیلات و محیط زیست دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج صندوق پستی: ۴۱۱۱

۲- دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان صندوق پستی: ۱۵۷۳۹-۴۹۱۳۸

۳- گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه شیراز

۴- گروه بهداشت و بیماریهای دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۵

چکیده

در این مطالعه کارآیی آدجوانت ناقص فروند برای رسانش پایدار آنالوگ هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRHa) در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بررسی شد. بدین منظور آنالوگ هورمون [D-Ala^6, des Gly^{10}] m GnRHa در ۰/۲۵ میلی‌لیتر محلول نمکی ۰/۹ درصد حل شد و با حجم برابری از آدجوانت ناقص فروند (FIA) ترکیب گردید. امولسیون حاصله به گروهی از ماهیان مولد ماده قزل‌آلا تزریق شد و با ماهیانی که هورمون GnRHa را به شکل خالص در یک یا دو مرحله تزریق دریافت نمودند، مقایسه گردید. همه ماهیانی که هورمون GnRHa را به شکل امولسینه (GnRHa-FIA) یا در دو مرحله تزریق دریافت نمودند بترتیب ۱۰ و ۱۱ روز پس از تزریق تخمریزی کردند، ولی در ماهیانی که هورمون GnRHa در یک مرحله تزریق شد و ماهیان گروه شاهد، تا ۳۶ روز بعد از شروع آزمایش بترتیب ۶۰ و ۷۵ درصد از مولدین تخمریزی نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که هورمون GnRHa امولسینه در آدجوانت ناقص فروند (GnRHa-FIA) بطور معنی‌داری سبب پیش‌رس کردن و همزمانی اوولاسیون در ماهیان قزل‌آلا در مقایسه با گروه شاهد و ماهیان دریافت کنندهٔ هورمون GnRHa در یک مرحله گردید ($P<0/05$). استفاده از GnRHa-FIA هیچگونه اثر منفی بر کیفیت، تخمهای استحصالی نداشت ($P>0/05$) و مرگ و میری نیز در گله مولدین مشاهده نگردید.

لغات کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، آدجوانت ناقص فروند، اوولاسیون، GnRHa

* نویسندهٔ مسئول

مقدمه

آدجوانت‌ها یا مواد کمکی، موادی هستند که برای تحریک ایمنی استفاده می‌گردند (تاجبخش، ۱۳۶۱). آدجوانت فروند (Freund's Adjuvant) یکی از آدجوانت‌های معمول در دامپزشکی می‌باشد. این آدجوانت به دو نوع کامل (Freund's Complete Adjuvant) و ناقص (Freund's Incomplete Adjuvant) تقسیم می‌شود که نوع کامل آن علاوه بر روغنهای معدنی حاوی مایکوباکترهای کشته شده مانند مایکوباکتر سل (*Maycobacterium tuberculosis*) نیز می‌باشد (Stills & Bailey, 1991). از آدجوانت فروند بطور معمول در واکسیناسیون حیوانات استفاده می‌شود. از آنجا که این آدجوانت یک آدجوانت روغنی است، آنتی ژن‌های مورد هدف را در محلولهای نمکی رقیق نموده و با ترکیب آن با آدجوانت فروند، امولسیونی حاصل می‌شود که آنتی ژن موجود در آن بتدریج در بدن آزاد می‌گردد و به تولید کافی آنتی بادی کمک می‌نماید (Aucouturier *et al.*, 2005).

امروزه در بسیاری از کارگاههای تکثیر ماهی برای پیش‌رس کردن یا همزمان نمودن تکثیر مولدین، با استفاده از هورمونهای مختلف، اوولاسیون در ماهیان ماده تحریک می‌گردد (Mylonas *et al.*, 1992; Zohar & Mylonas, 2001 ; Arabaci *et al.*, 2004).

تاکنون هورمونهای مختلفی در تکثیر ماهیان استفاده شده است. نخستین بار از عصارهٔ هیپوفیز برای تکثیر مصنوعی ماهیان استفاده شد، ولی در حال حاضر آنالوگ‌های مصنوعی هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRHa) بطور وسیعی در کارگاههای تکثیر ماهی برای تحریک تخمریزی ماهیان استفاده می‌شود (Zohar & Mylonas, 2001). هورمون GnRHa یک دکاپپتید بوده و حتی انواع مصنوعی آن که در برابر تجزیه آنزیمی مقاوم می‌باشند، در مدت زمان کمتر از ۳۰ دقیقه از بدن دفع می‌گردد (Gothif & Zohar, 1991). در دهه‌های اخیر سعی شده است که با استفاده از روشهای رسانش پایدار (Sustained releasing delivery systems) مشکل یاد شده بنحوی مرتفع گردد (Arabaci *et al.*, 2004; Breton *et al.*, 1990). در روشهای رسانش پایدار با یک مرحله تزریق مولدین، بسته به نوع مواد مصرفی، هورمون به مدت چند روز تا چند هفته در دستگاه گردش خون ماهیان باقی می‌ماند (Mylonas *et al.*, 1997).

تخمریزی در یک گروه از گله مولدین قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) حدود ۴ تا ۶ هفته بطول می‌انجامد (Crim & Glebe, 1984) و در برخی شرایط همزمان نمودن تکثیر مولدین ضروری بنظر می‌رسد. در آزاد ماهیان دوره گامتوژنز تحت تاثیر GtH است (Breton *et al.*, 1990).

بنابراین برای تکثیر مصنوعی مولدین نیاز به تزریقات مکرر هورمونهای القا کننده می‌باشد. برای کاهش استرس وارده به مولدین که منجر به کاهش کیفیت تخمکهای استحصالی از آنان می‌گردد، محققین به جای تزریقات چند باره، استفاده از روشهای رسانش پایدار را پیشنهاد می‌نمایند (Zohar & Mylonas, 2001; Arabaci *et al.*, 2004). اما استفاده از روشهای رسانش پایدار نسبتاً گران است و برای استفاده در کارگاههای تکثیر غالباً نیاز به نیروی کار ماهر می‌باشد (Arabaci *et al.*, 2004; Arabaci, 2000). امروزه محققین برای هر چه بیشتر اقتصادی نمودن استفاده از هورمون GnRHa، در پی دستیابی به روشهای آسانتر و ارزانتر می‌باشند. در داخل کشور نیز دستیابی به مواد و ابزار لازم برای رسانش پایدار هورمون GnRHa آسان نیست و باید از خارج وارد گردد.

مطالعات گذشته نشان داد که آدجوانت کامل فروند (FCA) می‌تواند بعنوان حامل هورمون GnRH عمل نماید (Riley & Secombes, 1993). در مطالعات دیگری با تزریق امولسیونی مرکب از آدجوانت ناقص فروند (FIA) و هورمون GnRHa، اوولاسیون در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان و شانک اروپایی (*Sparus auratus*) تحریک شد (Arabaci, 2000; Arabaci, *et al.*, 2004). بنابراین از آنجا که آدجوانت فروند در داخل کشور تولید می‌گردد و همچنین به دلیل نقش بسیار موثر روشهای رسانش پایدار هورمون GnRHa در کنترل تولید مثل ماهیان، در این مطالعه از آدجوانت ناقص فروند برای امولسینه نمودن هورمون GnRHa (GnRHa-FIA) با هدف رسانش پایدار آن به ماهی قزل‌آلای رنگین کمان استفاده شد. بدین منظور تاثیر امولسیون یاد شده در تحریک و همزمانی اوولاسیون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و اثر آن بر کیفیت تخمهای استحصالی و مرگ و میر مولدین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

آدجوانت مورد استفاده در این تحقیق در بخش سل موسسه تحقیقات و سرم سازی رازی حصارک کرج تهیه شد. برای تهیه آدجوانت ناقص فروند ابتدا اتاق هوای پاک نصب گردید. مقدار ۱۴ میلی‌لیتر روغن دراکوئل (نوعی روغن معدنی که بعنوان پایه ساخت آدجوانت استفاده گردید) به دستگاه گریندر (متشکل از یک محفظه سیلندری شیشه‌ای و یک پیستون شیشه‌ای که برای ایجاد فشار لازم برای ترکیب روغن‌های تشکیل‌دهندهٔ آدجوانت

استفاده می‌شود) وارد شد و سپس ۳ میلی‌لیتر روغن آرلسل (نوعی روغن معدنی غیرقابل متابولیسم که بعنوان سورفاکتانت برای تولید آدجوانت فروند استفاده می‌گردد) به آن اضافه شد. همزمان با اضافه نمودن تدریجی روغن‌های ذکر شده، پیستون دستگاه گریندر به آرامی فشار داده شد تا روغن‌ها کاملاً با یکدیگر مخلوط گردند. آدجوانت آماده شده در مجاورت شعله چراغ الکلی در ویالهای ۵ میلی‌لیتری ریخته شد و پلمپ گردید (Aucouturier *et al.*, 2005). آدجوانت ساخته شده تا زمان مصرف در دمای یخچال نگهداری شد.

آنالوگ هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRHa) مورد استفاده در این مطالعه از نوع [D-Ala^6,des Gly^{10}]m GnRHa ساخت کشور چین بود. این هورمون به صورت لیوفیلیزه بود و تا زمان مصرف در دمای صفر تا ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای تهیه امولسیون آدجوانت و GnRHa، هورمون GnRHa در ۰/۲۵ میلی‌لیتر محلول نمکی ۰/۹ درصد حل شد و با حجم برابری از آدجوانت ناقص فروند به روش دابل سرنگ (Double syringe) ترکیب شد. بدین صورت که دو عدد سرنگ توسط یک لوله پلاستیکی به یکدیگر متصل شده و هورمون و آدجوانت در حدود ده دقیقه از یک سرنگ به سرنگ دیگر منتقل گردید تا امولسیون لازم تشکیل گردد (Flies & Chen, 2003).

انتخاب ماهیها و تزریق آنها در کارگاه تکثیر و پرورش قزل‌آلای ۲۲ بهمن سپیدان در استان فارس انجام گرفت. در پاییز سال ۱۳۸۴ در دو مرحله، ۵۵ عدد مولد ماده سه ساله قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۱۷±۲۰۱۹ گرم و ۱۰ عدد ماهی نابالغ با میانگین وزنی ۲۷±۲۲۳ گرم بصورت تصادفی انتخاب گردیدند.

در مرحلهٔ اول برای بررسی اثر آدجوانت ناقص فروند در مرگ و میر ماهیان یا سایر اثرات جانبی احتمالی آن، ۳۰ عدد ماهی مولد ماده و ۱۰ عدد ماهی نابالغ انتخاب شدند. برای مقایسه دو روش تزریق، در ماهیان بالغ ۰/۵ میلی‌لیتر ترکیب GnRHa-FIA بصورت داخل صفاقی یا داخل عضلانی تزریق گردید. مقدار هورمون در این مرحله ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بود (Mylonas *et al.*, 1992). در ماهیان نابالغ فقط ۰/۲۵ میلی‌لیتر آدجوانت ناقص فروند تزریق شد. مقدار هورمون و روش تزریق در تیمارهای آزمایش مقدماتی بشرح زیر بود:

۱- تزریق GnRHa-FIA با مقدار ۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی
۲- تزریق GnRHa-FIA با مقدار ۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل عضلانی
۳- تزریق GnRHa-FIA با مقدار ۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی
۴- تزریق GnRHa-FIA با مقدار ۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل عضلانی
۵- تزریق GnRHa با مقدار ۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی
۶- تزریق محلول نمکی ۰/۹ درصد به صورت داخل صفاقی
۷- تزریق ۰/۲۵ میلی لیتر آدجوانت ناقص فروند در ماهیان نابالغ به شکل داخل صفاقی
۸- تزریق ۰/۲۵ میلی لیتر آدجوانت ناقص فروند در ماهیان نابالغ به شکل داخل عضلانی

تعداد ماهیان در هرکدام از تیمارهای فوق ۵ عدد بود.

در مرحله دوم فقط ماهیان مولد ماده مورد تزریق قرار گرفتند. در این مرحله نیز هر مولد ۰/۵ میلی‌لیتر محلول تزریقی دریافت نمود. مقدار هورمون در این مرحله ۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن بود (Arabaci *et al.*, 2004) و تمام تزریق‌ها بصورت داخل صفاقی انجام شد. تیمارهای مرحله دوم به شرح زیر بود:

۱- ماهیانی که GnRHa-FIA دریافت نمودند (۸ عدد).
۲- ماهیانی که هورمون GnRHa را در دو مرحله تزریق دریافت نمودند (۶ عدد).
۳- ماهیانی که هورمون GnRHa را در یک مرحله تزریق دریافت نمودند (۵ عدد).
۴- ماهیانی که محلول نمکی ۰/۹ درصد دریافت نمودند (۸ عدد).

کلیه ماهیان مولد تا زمان اولین تخمریزی دو بار در هفته و پس از آن ۵ بار در هفته معاینه شده و تخمکهای ماهیان رسیده با استفاده از اسپرم سه ماهی نر و بصورت خشک لقاح داده شدند. همزمان با معاینه مولدین، سلامت ظاهری (وجود زخم، خون مردگی و تغییر رنگ در محل تزریق) و رفتار آنان نیز بررسی شد.

کیفیت تخمهای استحصالی براساس درصد لقاح، درصد چشم‌زدگی جنین‌ها (بعنوان درصدی از تخمهای لقاح یافته) و درصد تفریخ (براساس درصدی از تخمهای چشم‌زده) بررسی شد (Velsen, 1980). بدین منظور از هر مولد ۲ نمونه تخم به تعداد ۲۵۰ عدد بصورت جداگانه در سبدهای پلاستیکی و در

شرایط محیطی مشابه با سایر تخمها و دمای متوسط ۱۰ درجه سانتیگراد انکوباسیون شد و پس از چشمزدگی جنین‌ها، تخمهای تلف شده در محلول استوکارد مرکب از فرمالین، اسید استیک، گلسیرین و آب به نسبت حجمی ۸۵:۶:۴:۵ شفاف شدند و بدین ترتیب تخمهای لقاح نیافته، لقاح یافته تلف شده و تخمهای چشم‌زده تلف شده شمارش شدند (Mylonas *et al.*, 1992).

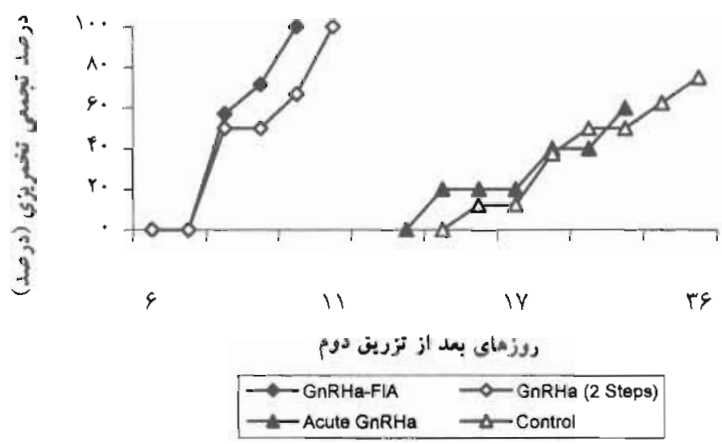
برای مقایسه میانگین زمان اوولاسیون ماهیان از آزمون ناپارامتریک کروسکال - والیس استفاده شد. برای مقایسه کیفیت تخم تیمارهای مختلف از آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. مقایسه داده‌ها در نرم افزار SPSS (V.10) انجام شد و سطح مورد قبول $P<0/05$ بود.

نتایج

هیچکدام از ماهیان مولد تزریق شده در مرحله مقدماتی تا پایان آزمایش تخمریزی نکردند. در مرحلهٔ دوم آزمایش همه مولدینی که هورمون GnRHa را به شکل امولسیون (GnRHa-FIA) یا در دو مرحله تزریق دریافت کرده بودند بترتیب ۱۰ و ۱۱ روز پس از تزریق تخمریزی کردند، درحالیکه در ماهیانی که هورمون GnRHa در یک مرحله تزریق شد و ماهیان گروه شاهد، تا ۳۶ روز بعد از شروع آزمایش بترتیب ۶۰ و ۷۵ درصد از مولدین تخمریزی نمودند. تزریق یک مرحله‌ای هورمون GnRHa بصورت خالص در همزمانی تکثیر مولدین تاثیری نداشت (نمودار ۱). میانگین زمان اوولاسیون در ماهیانی که هورمون GnRHa را به شکل امولسیون (GnRHa-FIA) یا در دو مرحله تزریق دریافت نمودند بترتیب ۹ و ۱۰ روز بود، در حالیکه میانگین زمان اوولاسیون در ماهیانی که هورمون GnRHa در یک مرحله تزریق شد و ماهیان گروه شاهد بترتیب ۲۳ و ۲۶ روز بود. میانگین زمان اوولاسیون در ماهیانی که GnRHa-FIA دریافت نمودند بطور معنی‌داری از ماهیان تزریق شده با GnRHA در یک مرحله و ماهیان گروه شاهد کوتاهتر بود ($P<0/05$).

درصد لقاح، چشم‌زدگی و تفریخ جنین تخمهای استحصالی از مولدین تیمارهای مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. تیمارهای مختلف در صفات یاد شده تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P>0/05$).

در هیچکدام از ماهیان مولد یا نابالغ تزریق شده در مرحله اول و دوم آزمایش (چه به شکل داخل عضلانی یا به شکل داخل صفاقی) مرگ و میر ناشی از تزریق GnRHa-FIA مشاهده نشد. تا ۲ ماه پس از تزریق مرحله دوم (و حدود سه ماه بعد از آزمایش مرحله اول) مشکل بالینی خاصی در ماهیان تیمار شده دیده نشد.



نمودار ۱: درصد تجمعی اوولاسیون در تیمارهای مرحله دوم آزمایش

جدول ۱: کیفیت تخمهای استحصالی از مولدین تیمارهای مرحله دوم آزمایش
(تفاوت آماری در بین تیمارها مشاهده نشد P<۰/۰۵).

تیمارها	درصد لقاح	درصد چشم زدگی	درصد تفریخ
تزریق GnRHa-FIA	۷۵/۱۵±۲/۰۵	۹۰/۰۰±۱/۸۲	۹۳/۲۹±۰/۴۳
تزریق GnRHa در دو مرحله	۷۶/۴۰±۲/۱۴	۹۰/۰۵±۱/۴۷	۹۳/۲۹±۱/۲۲
تزریق GnRHa در یک مرحله	۷۸/۴۰±۲/۲۸	۹۱/۶۴±۱/۸۲	۹۳/۷۰±۱/۵۴
تزریق محلول نمکی (گروه شاهد)	۷۸/۸۲±۲/۹۵	۹۲/۱۰±۱/۶۳	۹۴/۵۰±۰/۷۹

بحث

از آنجا که مشکلی پس از تزریق در مولدین مشاهده نشد، نتایج این تحقیق نشان داد که ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان بخوبی تزریق امولسیون GnRHa-FIA را تحمل نمودند و استفاده از امولسیون یاد شده بطور معنی‌داری سبب همزمانی تخمریزی در مولدین تزریق شده با GnRHa-FIA شد. ماهیان تزریق شده با GnRHa-FIA همانند ماهیان تزریق شده با هورمون GnRHa در دو مرحله، حدود سه هفته زودتر از ماهیان گروه شاهد و ماهیانی که هورمون یاد شده را در یک مرحله دریافت نموده بودند، تخمریزی کردند. بعبارتی دیگر می‌توان بیان نمود که آدجوانت ناقص فروند کارآیی مناسبی در امولسینه نمودن هورمون GnRHa داشت و می‌توان به جای تزریق چند باره مولدین از هورمون امولسینه در آدجوانت ناقص فروند استفاده نمود که این عمل علاوه بر کاهش هزینه‌های انسانی سبب کاهش استرس وارده به مولدین می‌گردد.

Arabaci (۲۰۰۰) و Arabaci و همکاران (۲۰۰۴) نیز نشان دادند که تزریق GnRHa-FIA از تزریق GnRHa خالص در تحریک و همزمانی اوولاسیون ماهیان قزل‌آلا و شانک اروپایی موثرتر است.

از آنجا که هورمون GnRHa فقط در مراحل نهایی بلوغ تخمک قابلیت القا اوولاسیون را دارد (Zohar & Mylonas, 2001)، بنابراین از دلایل احتمالی عدم تخمریزی ماهیان مولد آزمایش مرحله اول می‌توان به زمان نامناسب تزریق ماهیان (فاصله طولانی تزریق ماهیان با زمان تخمریزی طبیعی مولدین قزل‌آلا) اشاره نمود. عدم پاسخ‌دهی مولدین آزاد ماهیان در مراحل مختلف رشد جنسی نسبت به تزریق هورمون‌ها و از جمله هورمون GnRHa امری بی‌سابقه نیست و در مطالعات محققین گذشته نیز به این امر اشاره شده است. در یک مطالعه، هنگامی که مولدین ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*)، ۴۵ روز قبل از اوولاسیون طبیعی با هورمون GnRHa تزریق شدند، حدود ۳۰ درصد از آنها تخمریزی نمودند، ولی در تزریق این ماهیان با هورمون یاد شده ۳۰ روز پیش از اوولاسیون طبیعی، بیش از ۹۴ درصد مولدین تخمریزی کردند (Crim & Glebe, 1984). همچنین در مطالعه‌ای مشابه، تزریق ماهیان آزاد کوهو (*Oncorhynchus kisutch*) با هورمون GnRHa یک هفته نزدیکتر به زمان اوولاسیون طبیعی، سبب تخمریزی در درصد بیشتری از مولدین گردید (Fitzpatrick *et al.*, 1987). از دلایل احتمالی دیگر عدم پاسخ‌دهی مولدین تیمارهای آزمایش مقدماتی، می‌توان به مقدار پایین (۵ و ۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم) هورمون GnRHa استفاده شده، اشاره نمود. اگرچه در آزمایشات مختلف مقادیر بین ۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم هورمون GnRHa در تحریک اوولاسیون آزاد ماهیان موثر بوده اما ثابت شده است که برای تحریک اوولاسیون آزاد ماهیان غالباً مقدار بالاتری نسبت به سایر ماهیان لازم است (Donaldson *et al.*, 1981; Breton *et al.*, 1990; Fitzpatrick *et al.*, 1987) عدم پاسخ‌دهی وابسته به مقدار نیز در آزاد ماهیان بی‌سابقه نیست. در مطالعه‌ای تزریق هورمون GnRHa با مقادیر ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم در القا اوولاسیون قزل‌آلای قهوه‌ای (*Salmo trutta*) تاثیری نداشت (Billard *et al.*, 1984) ولی در گزارشی دیگر تزریق ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم هورمون GnRHa در اوولاسیون بیش از ۹۰ درصد گله مولدین قزل‌آلای قهوه‌ای موثر بوده است (Mylonas *et al.*, 1992). در گزارشی دیگر تزریق ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن هورمون GnRHa، ۲۸ روز قبل از

اوولاسیون طبیعی در آزاد ماهی اقیانوس اطلس موثر بوده، ولی تزریق ۱ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن، تنها زمانی که ۱۳ روز پیش از زمان اوولاسیون طبیعی بکار گرفته شد، موثر بود و در زمانهای پیش از آن تاثیری نداشت (Tranger *et al.*, 1992). بنابراین به نظر می‌رسد در آزمایش مقدماتی عدم تخمریزی مولدین ناشی از بی‌تاثیر بودن GnRHa باشد (به دلیل زمان استفاده نامناسب و مقدار ناکافی) و ارتباط با عدم کارآیی آدجوانت ناقص فروند ندارد.

آدجوانت‌های روغنی از جمله آدجوانت ناقص فروند گاهی سبب ایجاد برخی مشکلات جانبی از قبیل: مرگ و میر، چسبندگی اعضاء داخلی، واکنش‌های گرانولوماتوز و غیره می‌گردد (Stills & Bailey, 1991). در این مطالعه تزریق GnRHa-FIA هیچگونه اثر جانبی در ماهیان مولد و غیربالغ نداشت. در یک مطالعه از تزریق ترکیب آدجوانت کامل فروند و هورمون GnRH برای ایجاد آنتی بادی (ایمن نمودن) در برابر ترشح GnRH طبیعی از هیپوتالاموس و در نتیجه جلوگیری از بلوغ ماهی قزل‌آلا استفاده شد و مرگ و میری نیز گزارش نگردید (Riley & Secombes, 1993). در تحقیقی دیگر نیز پس از واکسیناسیون ماهی قزل‌آلا در برابر *Vibrio anguillarum* مرگ و میری مشاهده نگردید (Boesen *et al.*, 1997). ولی Arabaci و همکاران (۲۰۰۴)، پس از استفاده از امولسیون GnRHa-FIA در ماهی قزل‌آلا حدود ۵۰ درصد مرگ و میر بعد از تخمریزی را گزارش نمودند. از دلایل احتمالی این تفاوت می‌توان به میزان آدجوانت مصرفی در دو تحقیق اشاره نمود. در مطالعه حاضر با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیقات گذشته و از آنجا که به نظر می‌رسید یکی از دلایل مرگ و میر بالا در مطالعهٔ Arabaci و همکاران (۲۰۰۴)، مصرف میزان زیاد آدجوانت (۰/۵ میلی‌لیتر برای هر کیلوگرم وزن بدن) باشد، سعی بر آن شد که از حداقل میزان ممکن آدجوانت استفاده شود. به همین منظور به هر مولد ۲ کیلوگرمی در مجموع ۰/۲۵ میلی‌لیتر آدجوانت تزریق گردید. این میزان آدجوانت تقریباً یک چهارم میزان آدجوانت مصرفی توسط Arabaci و همکاران (۲۰۰۴) بود. در مرور منابع در هیچ تحقیقی مصرف چنین مقدار بالایی از آدجوانت مشاهده نشد و استفاده از ۰/۵ میلی‌لیتر آدجوانت برای هر کیلوگرم وزن بدن فقط در مطالعه Arabaci (۲۰۰۰) و Arabaci و همکاران (۲۰۰۴) دیده شد. در غالب تحقیقات انجام شده، میزان آدجوانت مصرفی در حدود ۰/۱ تا ۰/۲ میلی‌لیتر برای هر ماهی ذکر شده است. از آنجا که اثرات جانبی آدجوانت وابسته به مقدار آن می‌باشد، شاید یکی از دلایل مرگ و میر بالا در مطالعه یاد شده مربوط به مصرف مقدار بالای آدجوانت باشد. از طرف دیگر Arabaci (۲۰۰۰) از همین مقدار برای ماهی شانک اروپایی استفاده نمود و مرگ و میری گزارش نکرد. بنابراین این امکان نیز وجود دارد که در مطالعه Arabaci و همکاران (۲۰۰۴)، در مراحل آماده‌سازی آدجوانت و آنتی ژن، شرایط سترون که پیش نیاز اصلی واکسیناسیون می‌باشد، رعایت نشده باشد و مرگ و میر بوجود آمده بدلیل ورود عوامل بیماریزا به امولسیون GnRHa-FIA و ایجاد مرگ و میر شدید به دلیل تشدید بیماریزایی آن به کمک آدجوانت باشد. البته لازم به ذکر است که در گزارش Arabaci و همکاران (۲۰۰۴)، همانگونه که بیان نمودند، تنها گزارشی است که مرگ و میر شدیدی را پس از استفاده از روشهای رسانش پایدار نشان می‌دهد و محققین یاد شده نیز دلیل خاصی برای مشکل مشاهده شده بیان نکرده‌اند و اطلاعاتی در رابطه با نشانه‌های بالینی ماهیان تلف شده نیز ارائه نشده است.

بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از آدجوانت ناقص فروند برای امولسینه نمودن هورمون GnRHa مفید بوده و استفاده از GnRHa-FIA در عین سهولت، سبب پیش‌رس نمودن و همچنین کوتاه شدن زمان تخمریزی در ماهیان مولد ماده قزل‌آلای رنگین کمان گردید. پیشنهاد می‌گردد برای تعیین میزان دقیق آدجوانت و هورمون GnRHa مورد نیاز برای موثر واقع شدن هورمون و همچنین جلوگیری از اثرات جانبی احتمالی آدجوانت، مطالعات بیشتری صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای تامین بخشی از هزینه‌های این تحقیق سپاسگزاری می‌گردد. از همکاری بسیار صمیمانه مهندس نیکوکار و مهندس قاسمپور و کلیه کارکنان کارگاه تکثیر ۲۲ بهمن سپیدان که ماهیان مورد نیاز را تامین نمودند صمیمانه تشکر می‌گردد. از داوران محترم که با نظرات خویش بر غنای این تحقیق افزودند نیز صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

تاجبخش، ح. ، ۱۳۶۱. ایمنی شناسی بنیادی. انتشارات دانشگاه تهران. ۴۲۸ صفحه.

Arabaci, M. , 2000. Induction and synchronization of spawning in sea bass and sea bream broodstocks by using long-acting LH-RHa preparation. Egg University, Ph.D Thesis, Izmir, Turky. 87P (in Turkish).

Arabaci, M.; Diler, I. and Sari, M. , 2004. Introduction and synchronization of ovulation in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserlin (GnRHa) and its effects on egg quality. Aquaculture, Vol. 237, pp.475-484.

Aucouturier, J.; Ascarateil, A. and Dupuis, L. , 2005. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. Vaccine. (in press).

Billard, R.; Reinand, P.; Hollebecq, M. and Breton, B. , 1984. Advancment and synchroniz-ation of spawning in *Salmo gairdneri* and *S. trutta* following administration of LRH-a combined or not with pimozide. Aquaculture, Vol. 43, pp.57-66.

Boesen, H.T.; Pederson, K.; Koch, C. and Larson, J.L. , 1997. Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to antigenic preparations from *Vibrio anguillarium* serogroup 01. Fish Shelfish Immunol. Vol. 7, pp.543-553.

Breton, B.; Weil, C.; Sambroni, E.; Zohar, Y., 1990. Effects of acute versus sustained administration of GnRHa on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, Vol. 91, pp.371-383.

Crim, L.W. and Glebe, B.D. , 1984. Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon with pelleted LHRH analog. Aquaculture, Vol. 43, pp.47-56.

Donaldson, E.M.; Hunter, G.A. and Dye, H.M. , 1981. Induced ovulation in coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*): II. Preliminary study of the use of LH-RH and two high potency LH-RH analogues. Aquaculture, Vol. 26, pp.129-141.

Fitzpatrick, M.S.; Suzumoto, B.K.; Schreck, C.B. and Oberbiling, D. , 1987. Luteinizing hormone releasing hormone analogue induces precocious ovulation in adult coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture, Vol. 43, pp.67-73.

Flies, D.B. and Chen, L. , 2003. A simple and vortex method for preparing antigen/adjuvant emulsions for immunization. Journal of Immunology Methods, Vol. 276, pp.239-242.

Gothif, Y. and Zohar, Y. , 1991. Clearance of different forms of GnRH from the circulation of the gilthead sea bream, *Sparus aurata*, in relation to their degradation and bioactivities. *In*: A.P. Scott; , J.P. Sumpter; D.E. Kime and M.S. Rolfe (Eds.), Reproductive physiology of fish. Fish Symposium, Vol. 91, Sheffield, pp.35-73.

Mylonas, C.C.; Hinshaw, M.J. and Sulivan, V.C. , 1992. GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. Aquaculture, Vol. 106, pp.379-392.

Mylonas, C.C.; Magnus, Y.; Gissis, A.; Klebanov, Y. and Zohar,Y. , 1997. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. Journal of Fish Biol. Vol. 51, pp.234-250.

Riley, E.M. and Secombes, C.J. , 1993. Immunization of rainbow trout against GnRHa. Potential anti-maturation vaccine? Aquaculture, Vol. 112, pp.271-282.

Stills, J.R. and Bailey, M.Q. , 1991. The use of Freund's complete adjuvant. Lab Animal. Vol. 20, pp.25-30.

Taranger, G.L.; Stefansson, S.O. and Hansen, T. , 1992. Advancement and synchronization of ovulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following injection of LHRH analogue. Aquaculture, Vol. 102, pp.169-175.

Velsen, F.P.J. , 1980. Embryonic development in eggs of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. Vol. 49, 19P.

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

RICEST

An investigation on the sustained releasing delivery of GnRHa using Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Vazirzadeh A.[1]*; Hajimoradloo A.[2]; Esmaeili H.R.[3] and Akhlaghi M.[4]

m_vazirzadeh@yahoo.com

1- Fisheries and Environmental Sciences Department, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, P.O.Box: 4111 Karaj, Iran

2- Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 49138-15739 Gorgan, Iran

3- Biology Department, Shiraz University, Shiraz, Iran

4- Aquatic Animal Health and Diseases Department, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: May 2006 Accepted: March 2007

Keywords: Rainbow trout, Freund's incomplete adjuvant (FIA), Ovulation, GnRHa

Abstract

In this study, Freund's incomplete adjuvant (FIA) was used for emulsifying and sustained releasing of gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The hormone [D-Ala6, des Gly10] m GnRHa was diluted in 0.25ml physiological saline and mixed with equal volume of FIA (GnRHa-FIA). A group of Rainbow trout broodstock were injected with GnRHa-FIA and compared with those receiving the treatment in two steps or one acute GnRHa injection. All of the fish that received GnRHa in emulsified form or in two steps injection ovulated in 10 and 11 days after injection respectively. In contrast, only 75% of the control fish and 60% of the fish with an acute injection ovulated up to 36 days after injection. Results showed that GnRHa-FIA injection as two steps injection protocol was effective in advancing the onset of ovulation, synchronizing the ovulation of treated fish relative to control or acute GnRHa injected groups ($P<0.05$). GnRHa-FIA neither affected egg quality ($P<0.05$) nor did it cause any mortality in the treated fish.

* Corresponding author