مقاله علمی – پژوهشی:

مطالعه مقایسه‌ای ایمپلنت‌های آهسته‌رهش و تزریق داخل صفاقی هورمون $LHRHa_2$ بر شاخص‌های رسیدگی جنسی و میزان هورمون‌های استروئیدی جنسی در ماهی اسکار

فاطمه طوبائی[۱]، تکاور محمدیان[۲]، سروش سابیزا*[۳]، اسکندر مقیمی‌پور[٤]

*s.sabiza@scu.ac.ir

۱- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- گروه بهداشت دام، طیور، آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

٤- گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱٤۰۳ تاریخ پذیرش: شهریور ۱٤۰۳

چکیده

ماهی اسکار از جمله معروف‌ترین ماهیان زینتی از خانواده سیکلیده با اهمیت تجاری بالاست. تخمدان‌ها در ماهی اسکار در دسته تخمدان‌های ناهمزمان تقسیم‌بندی می‌شود و استفاده از هورمون‌های اگزوژن برای کنترل چرخه‌های تولیدمثلی آنها کاربرد زیادی دارد. هدف از این مطالعه، مقایسه ایمپلنت‌های آهسته رهش و تزریق داخل صفاقی هورمون $LHRHa_2$ در ماهی اسکار است. در این مطالعه ۱۸ عدد ماهی اسکار پرتغالی که به صورت تصادفی به ۳ گروه که هر گروه شامل ۶ عدد ماهی (۳ جفت) بودند، تقسیم شده و هر جفت ماهی در آکواریوم‌های ۱۵۰ لیتری با دمای آب ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هر ۳ گروه در شرایط نوری یکسانی بودند و به صورت دو نوبت در روز غذادهی شدند. گروه اول تحت القاء هورمون $LHRHa_2$ به صورت تزریقی (۲ مرحله برای جنس ماده: ۱۰٪ مرحله اول و ۹۰٪ مرحله دوم) و گروه دوم تحت القاء هورمون به صورت ایمپلنت و به گروه سوم تنها سرم فیزیولوژی تزریق شد. خونگیری از ماهیان ماده پس از بیهوشی، قبل از تزریق یا کاشت ایمپلنت و در فاصله‌های زمانی معین پس از تزریق تا ۲۴ ساعت و پس از کارگذاری ایمپلنت تا ۲۰ روز انجام گرفت. در بررسی هورمون‌های استروئیدی ماهیان تحت القاء هورمون $LHRHa_2$، به دو روش تزریقی و ایمپلنت، سطح هورمون پروژسترون و ۱۷-بتا استرادیول در هر دو گروه افزایش یافته و سطح هورمون تستوسترون کاهش یافت اما میزان هورمون‌های استروئیدی جنسی در گروه ایمپلنت در قیاس با گروه تزریق به صورت مدت‌دار در سطح بالایی قرار داشت و تلفاتی مشاهده نشد، اما در گروه تزریقی تلفاتی مشاهده گردید. پس از گذشت مدت زمان القاء تولید مثلی در گروه ایمپلنت در مقایسه با گروه تزریقی، کاهش استرس و به دنبال آن رهاسازی بهتر تخمک مشاهده گردید که می‌توان آن را دلیلی بر موفقیت‌آمیز بودن روش ایمپلنت‌گذاری برای القاء تولیدمثلی در ماهی اسکار پرتغالی قلمداد نمود.

لغات کلیدی: تولیدمثل، سیکلید، القاء هورمون، کارگذاری ایمپلنت، کوپلیمر PLGA-b-PEG

*نویسنده مسئول

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

مقدمه

تولیدمثل در ماهی‌ها تحت تأثیر عوامل محیطی مختلفی قرار می‌گیرد و در مواردی که ماهی در زیستگاه طبیعی خود نباشد، عدم موفقیت در تولیدمثل مسئله رایجی است. بنابراین، استفاده از هورمون‌های اگزوژن برای کنترل چرخه‌های تولیدمثلی ماهی کاربرد زیادی پیدا کرده است (Caldas *et al.*, 2021). ماهیان خانواده سیکلیده معروف‌ترین ماهیان زینتی هستند که حدود ۹۵ درصد از کل ماهیان زینتی جهان را تشکیل می‌دهند و شامل ۴۰۰۰ گونه و واریته هستند (Erdogan *et al.*, 2012). گونه*Astronotus ocellatus* معروف به ماهی اسکار، سیکلید بومی آمریکای جنوبی است که در میانه تا بالای رودخانه‌های آمازون، پرو، آرژانتین، پاراگوئه و به تعدادکمتر در آسیا زیست می‌کنند و بیشتر آنها ساکن آب شیرین هستند. این گونه ماهی‌ها به دلیل بلوغ زودرس و باروری نسبتاً بالا از اهمیت تجاری جهانی برخوردارند. ماهی اسکار به نام‌های دیگری چون سیکلید طاووسی و سیکلید مخملی نیز نامیده می‌شود و دارای انواع مختلفی است (ببری، آلبینو، طاووسی، چشم قرمزو پرتغالی) (Pawar *et al.*, 2018). براساس فرایند رشد فولیکولی، تخمدان‌های ماهیان خانواده سیکلیده در دسته تخمدان‌های ناهمزمان (چندبار تخم‌ریز) تقسیم بندی می‌شوند و مشکلاتی در زمینه عدم تخم‌ریزی به صورت طبیعی در فصول خاصی از سال در ماهیان این خانواده گزارش شده است (Mylonas and Zohar, 2000). در به‌کارگیری هورمون‌های اگزوژن به روش تزریقی مشکلاتی وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به مواردی اشاره کرد: هورمون‌هایی چون GNRH و LHRH به‌سرعت از خون پاکسازی می‌شوند و سطح پلاسمایی هورمون LH حاصل از تحریک نیز به‌سرعت در خون پایین می‌آید. به‌علاوه، تزریقات مکرر از نظر مدیریتی به علت افزایش سطح استرس، آترزی غدد جنسی، افزایش تلفات پیش از تخم‌گذاری در برخی از ماهیان خاص، ناکارآمد است. بنابراین، کارگذاری ایمپلنت‌های آهسته رهش هورمونی به منظور آزادسازی تدریجی هورمون طی روزها تا هفته‌ها در سیستم گردش ماهی به طور موفقیت‌آمیزی به‌کارگرفته شد (Rainis *et al.*, 2003; Mylonas *et al.*, 2007) که برای مثال می‌توان در ماهی‌های پرورشی بس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) (Rainis *et al.*, 2003)، ماهی هامور (*Epinephelus marginatus*) (Marino *et al.*, 2003)، ماهی تن باله آبی شمالی (*Thunnus thynnus*) (Mylonas *et al.*, 2007) و ماهی سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) (Yamaguchi *et al.*, 2004) و زمرد ماهی (*Pseudolabrus sieboldi*) (Ohta *et al.*, 2012)، اشاره کرد.

هدف از مطالعه حاضر بررسی سطوح هورمون‌های استروئیدی در سرم خون ماهیان اسکار پرتقالی القاء شده با هورمون $LHRHa_2$ به دو روش تزریقی و کارگذاری ایمپلنت و مقایسه این دو روش با یکدیگر است.

مواد و روش کار

یک هفته پیش از شروع مطالعات، تعداد ۱۸ قطعه ماهی اسکار بالغ نر و ماده با میانگین وزنی ابتدایی ۵۰±۴۵۰ گرم در ابتدای فصل بهار از یکی از مراکز پرورش ماهیان آکواریومی واقع در استان آذربایجان شرقی، شهرستان میانه تهیه شد و با ماشین مخصوص حمل ماهی زنده به مخازن نگهداری ماهی در بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال داده شد. از یک هفته پیش از شروع مطالعه، همه ماهی‌ها با معاینه بالینی و در شرایط یکسان به حوضچه ۳۰۰ لیتری انتقال داده شدند و شوری آب به‌تدریج بر ۵ قسمت در میلیون تنظیم شد.

تیماربندی ماهیان

ماهیان به صورت تصادفی به ۳ گروه (شامل ۳ جفت ماهی بالغ) تقسیم شدند. گروه اول: ماهیان تحت القاء هورمون جنسی $LHRHa_2$ به روش تزریقی (۲ مرحله برای جنس ماده: ۱۰٪ مرحله اول و ۹۰٪ مرحله دوم، ۱ مرحله برای جنس نر: همزمان با نوبت تزریق دوم ماهی ماده، تزریق صورت گرفت)، گروه دوم: ماهیان تحت القاء هورمون جنسی $LHRHa_2$ به روش ایمپلنت و گروه سوم: گروه کنترل که فقط سرم فیزیولوژی استریل تزریق شد.

شرایط نگهداری مولدین

پس از تیماربندی، مولدین در آکواریوم‌های ۱۵۰ لیتری با شرایط یکسان اعم از دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد، فیلتر بیولوژیک اسفنجی و دستگاه هواده نگهداری شده و در بستر هر یک از آکواریوم‌ها، سرامیکی سفید رنگ به‌منظور تحریک جهت تخم‌ریزی قرار داده شد. با توجه به رفتار پرخاشگرانه ماهی اسکار، پس از قرار دادن مولد نر و ماده در کنار یکدیگر، به مدت ۹۶-۴۸ ساعت رفتارهای مبنی بر سازگاری یا عدم سازگاری نر و ماده تحت نظر گرفته شده و در صورت عدم سازگاری، به منظور جلوگیری از نزاع و آسیب فیزیکی با ماهی ماده یا نر دیگر جایگزین شد. مولدین روزی دو نوبت، یک نوبت با غذای تجاری شرکت ۲۱ بیضا (پروتئین خام ۴۲ درصد، چربی خام ۱۶/۵ درصد، رطوبت ۱۰ درصد) و یک نوبت غذای تازه (میکس دل مرغ، فیله مرغ، دل گاو و مولتی ویتامین) تغذیه شدند.

ساخت ایمپلنت

جهت تهیه این نانوذرات از روش امولسیون‌سازی دوتایی تغییر یافته برای بارگذاری داروهای آب‌دوست استفاده شد (Avgoustakis., 2004; Locatelli and Franchini., 2012) و تلاش گردید تا با به‌کارگیری فرمول‌های مختلف و استفاده از غلظت‌های متفاوت کوپلیمر PLGA-b-PEG در حلال آلی کلروفوم بهینه‌سازی کمی و کیفی در ساخت نانوذرات حاصل شود و روش ساخت مطلوب به شرح ذیل است:

ابتدا ۰/۳ میلی گرم از هورمون $LHRHa_2$ و ۲۰ میلی گرم کوپلیمر PLGA-b-PEG به‌وسیله ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ توزین شده و سپس محلولی آبی حاوی ۰/۳ میلی گرم از این هورمون به حجم ۱۰۰ میکرولیتر (غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر) تهیه شده و به صورت قطره‌ای و تحت فشار تنشی (۱۰ ثانیه) با دستگاه سونیکاتور با قدرت ۳۰ وات درون حجم ۱ میلی لیتر از حلال آلی کلروفوم حاوی ۲۰ میلی گرم کوپلیمر PLGA-b-PEG طی مدت زمان ۶۰ ثانیه امولسیون شد (امولسیون اول). سپس این امولسیون درون یک فاز آبی دوم به حجم ۲ میلی لیتر و حاوی سورفکتانت (PVA ۰/۲۵ درصد) به صورت اضافه کردن قطره‌ای و به‌وسیله سونیکاسیون با قدرت ۱۰۰ وات طی مدت زمان ۱۲۰ ثانیه امولسیون شد (امولسیون دوم).

امولسیون دوتایی حاصله به‌تدریج و به صورت قطره‌ای به یک بشر حاوی ۲۵ میلی لیتر آب دارای سورفاکتانت (PVA ۰/۱ درصد) به روی همزن مغناطیسی با دور ۸۰۰ در دقیقه اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه نگه داشته شد تا حلال آلی کاملاً تبخیر شود و نانو ذرات شکل بگیرند و سپس در دستگاه سانتریفیوژ با دور۱۲۰۰۰ در دقیقه به مدت ۴۰ دقیقه به منظور جمع‌آوری نانوذرات، سانتریفیوژ شده و این فرایند ۳ مرتبه تکرار شد و از محلول روی رسوب به میزان ۲ میلی‌لیتر نمونه برای تعیین مقدار داروی بارگیری نشده، برداشته شده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر تعیین مقدار گردید. سپس با کم کردن عدد به‌دست آمده از کل داروی اولیه، میزان داروی بارگیری شده محاسبه شد (اما به دلیل دقت در محاسبات و بررسی دقیق رهایش دارو از یک مدل دارویی نیز استفاده گردید). جهت ذخیره طولانی مدت و محافظت در برابر انجماد، لاکتوز ۱۰درصد به نانو ذرات اضافه شد و به مدت ۹۶ ساعت به منظور خشک شدن در فریزر درایر قرار گرفت. پس از خشک شدن کامل، نانوذرات با ۲۰۰ میلی‌گرم پودر کلسترول ترکیب شده و به‌وسیله دستگاه قرص‌زنی به صورت قرص‌هایی بیضی‌شکل پرس شد. سپس در دستگاه ماوراء بنفش استریل گردید. ایمپلنت‌های حاصل حاوی ۷۵ میکروگرم هورمون $LHRHa_2$ بودند (شکل ۱).

شکل ۱: ایمپلنت هورمون $LHRHa_2$ به صورت قرص بیضی‌شکل

Figure 1: $LHRHa_2$ hormonal implant as an oval shaped pill

مطالعه رهایش دارو

به منظور بررسی رهایش دارو، از روش انتشار از محفظه‌های انتشاری فرانز[1] و یک مدل دارویی (داروی کترولاک) استفاده شد. به این صورت که یکی از قرص‌ها به عنوان نمونه روی غشاء سلولزی قرار داده شده و درون محفظه گیرنده سل فرانز با مقدر معین از حلال آب مقطر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. در ۶ ساعت اول (به فاصله هر ۱ ساعت) و در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴، ۱۶۸، ۱۹۲، ۲۱۶، ۲۴۰، ۲۶۴ از محلول در بخش گیرنده، نمونه‌گیری شد و به اندازه نمونه برداشته شده در هر بار نمونه‌گیری، حلال جایگزین شد. سپس به‌وسیله دستگاه اسپکتوفتومتری جذب نمونه‌های استخراجی در طول موج ۳۲۴ نانومتر تعیین شده و میزان داروی آزاد شده در هر ساعت محاسبه شد. در دستگاه اسپکتوفتومتری به عنوان شاهد، آب مقطر به منظوره کالیبره کردن دستگاه استفاده شد.

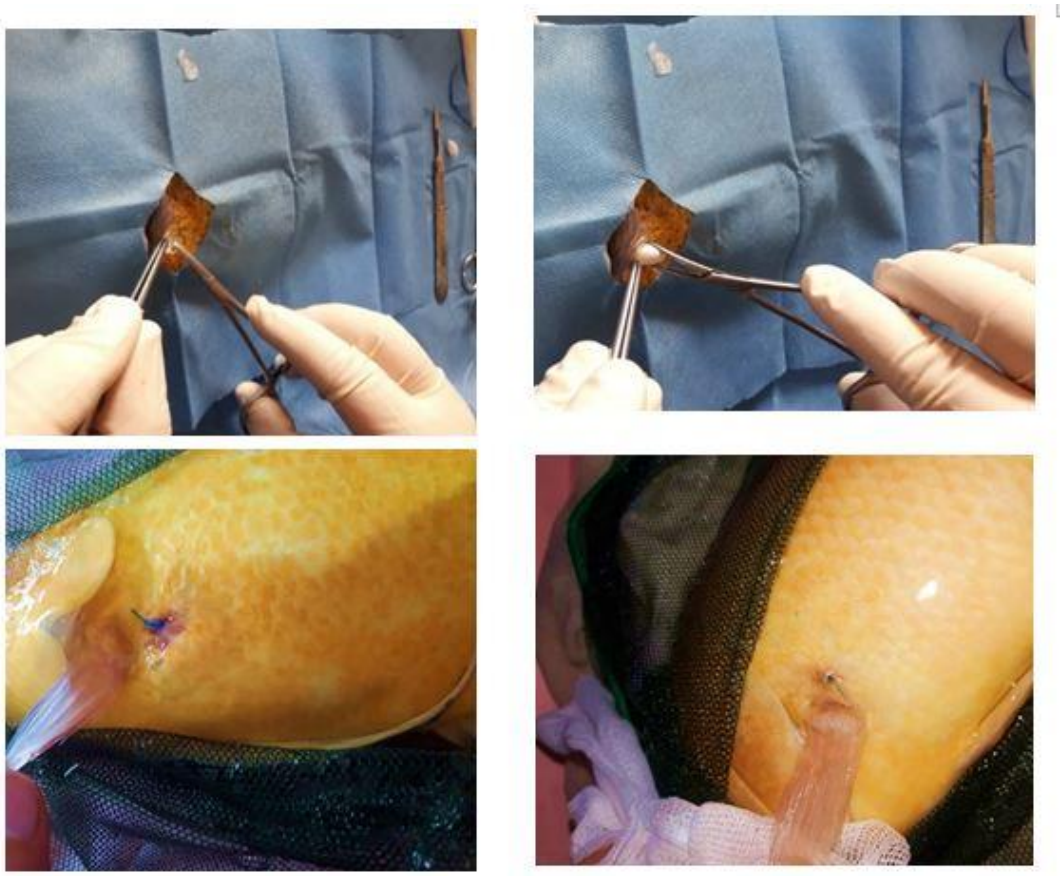
تزریق هورمون $LHRHa_2$ به ماهی مولد اسکار

هر ویال تزریقی هورمون $LHRHa_2$ به حجم ۲ میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از هورمون بود که در این مطالعه با دوز ۸۰ میکروگرم به ازاء هر کیلوگرم مطابق وزن هر ماهی محاسبه گردید. تزریق این هورمون ۳۰ روز پس از سازگاری ماهیان با شرایط جدید، در دو مرحله ، مرحله اول ۱۰ درصد و مرحله دوم ۹۰ درصد از کل دوز محاسبه شده با فاصله ۱۲ ساعت به ماهیان ماده و در یک مرحله، همزمان با تزریق مرحله دوم ماهیان ماده، به میزان ۹۰ درصد دوز محاسبه شده به ماهیان نر و با استفاده از سرنگ انسولین در زیر باله سینه‌ای به صورت تزریق عضلانی صورت گرفت.

کاشت ایمپلنت هورمونی

در روز جراحی، ماهی از آکواریوم‌های ۱۵۰ لیتری به‌وسیله تور ماهی‌گیری گرفته شده و در سطلی به گنجایش ۱۰ لیتر آب و دارای سنگ هوا به منظور القاء بیهوشی، قرار گرفت. از ماده بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول (با دوز ۳۰۰ قسمت در میلیون) استفاده شد و در مدت زمان ۳-۲ دقیقه بیهوشی القاء گردید. یک آبفشان آزمایشگاهی، با حجم ۱ لیتر آب مقطر که حاوی داروی بیهوشی ۲-فنوکسی اتانول (با دوز ۲۰۰ قسمت در میلیون) بود، تهیه شد. سپس محلول حاصل در حین جراحی به منظور نگهداری بیهوشی با فواصل منظم روی تامپون خیس روی آبشش و کمان آبششی، آبفشانی گردید. در ابتدا با استفاده از تامپونی آغشته به اسکراب جراحی (پویدون آیوداین ۷/۵ درصد) با دقت فرایند اسکراب کردن انجام گرفت. سپس فلس‌هایی که در محل برش قرار داشتند، با به‌کارگیری پنس شستی از محل خط برش جدا شده و سپس محل برش با سرم استریل نمکی (۰/۹ درصد) شستشو داده شده و مجدداً خط برش با استفاده از یک تامپون استریل آغشته به اسکراب جراحی اسکراب گردید. پس از جدا کردن فلس‌ها در ناحیه خط برش و اسکراب نهایی موضع، به‌وسیله دسته بیستوری سایز ۳ و تیغ شماره ۱۵، روی پوست برشی مطابق شکل ۲ به اندازه ۱۰ میلی‌متر در زیر باله سینه‌ای و به فاصله ۵ میلی‌متر از قاعده‌ی باله زده شد و در این مرحله مراقبت گردید که برش به محوطه صفاقی وارد نگردد و آسیبی به اندام‌های داخلی وارد نشود. در مرحله بعد با استفاده از قیچی مقداری برش عمیق‌تر شد و در ادامه ایمپلنت استریل شده در موضع قرار داده شده و با نخ غیر قابل جذب تک‌رشته‌ای (نایلون) با اندازه مناسب و با الگوی ساده تکی در یک لایه بسته شد. در تمام مراحل در صورت مشاهده خونریزی، خون‌بندی با تامپون انجام گرفت. سپس ماهیان جراحی شده پس از بازگشت از بیهوشی بلافاصله به آکواریوم‌های ۱۵۰ لیتری باز گردانده شدند و به‌منظور جلوگیری از عفونت‌های ثانویه محلول ترکیبی فرمالین و مالاشیت گرین (دوز۱۰ قسمت در میلیون) و آنتی‌بیوتیک ترکیبی تری‌متوپریم سولفادیازین با دوز ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به صورت حمام طولانی مدت ۲۴ ساعته و با تعویض ۵۰ درصدی بین دو درمان به مدت ۱۴ روز مراقبت صورت گرفت و تا ۴۸ ساعت پس از جراحی به علت استرس، غذادهی به ماهیان نیز صورت نگرفت.

[1] Franz diffusion cell



شکل ۲: کارگذاری ایمپلنت هورمونی
Figure 2: Hormonal implant operation

خونگیری

خونگیری از ماهیان در چند نوبت و به فواصل مختلف انجام گرفت. بدین‌صورت که در گروه کنترل، در ابتدا پیش از تزریق سرم فیزیولوژی و سپس در زمان‌های ۶ و ۱۸ ساعت بعد از تزریق سرم فیزیولوژی و در گروه تزریقی پیش از تزریق هورمون و سپس در زمان‌های ۶ و ۱۸ ساعت بعد از تزریق هورمون و در گروه جراحی نیز پیش از کارگذاری ایمپلنت و نیز پس از کارگذاری در ساعت‌ها ۲۴، ۷۲، ۱۴۴، ۲۱۶، ۳۳۶ و ۴۸۰ انجام گرفت. به منظور خونگیری در ابتدا با استفاده از داروی بیهوشی با نام تجاری ۲- فنوکسی اتانول (دوز ۳۰۰ قسمت در میلیون) بیهوشی در ماهی ایجاد شد و از طریق سیاهرگ دمی خونگیری انجام گرفت و به میکروتیوب حاوی ضد انعقاد هپارین انتقال داده شد. نمونه‌های خون در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم خون نمونه‌ها اخذ شده و به‌منظور انجام ارزیابی‌های بیوشیمیایی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ارزیابی میزان هورمون‌های استروئیدی سرم خون

ماهی مقادیر هورمون‌های استروئیدی شامل ۱۷-بتا استرادیول، پروژسترون، تستوسترون و کورتیزول از طریق روش ELISA با به‌کارگیری کیت‌های تجاری مونوبایند تعیین گردید.

روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

طرح کلی این تحقیق در قالب طرحی کاملا تصادفی، برنامه‌ریزی و اجرا شد. داده ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه جهت اندازه‌گیری اختلاف بین تیمارهای مختلف از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد.

برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد و ترسیم نمودارها نیز در فضای نرم افزار Excel (نسخه ۲۰۱۶) انجام گرفت.

نتایج

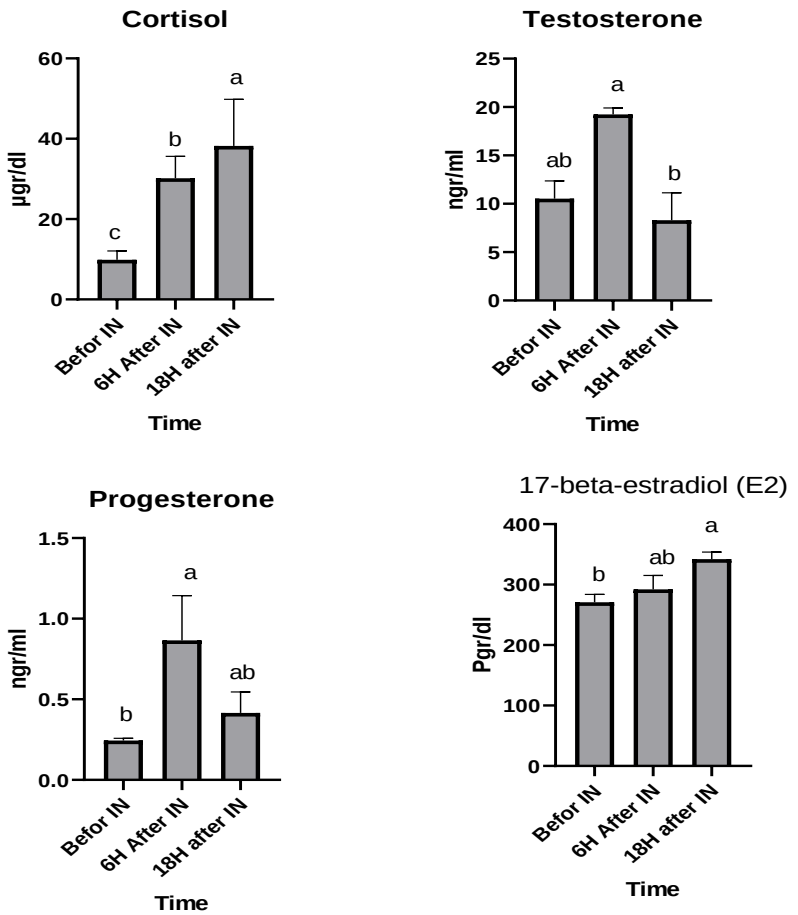
هورمون‌های استروئیدی سرم خون ماهی اسکار در تیمار تزریقی

در شکل ۳، میزان هورمون کورتیزول در سرم ماهیان اسکار تزریق شده با هورمون$LHRHa_2$ نشان داده شده است. با توجه به شکل میزان هورمون کورتیزول در سرم خون ماهیان پس از تزریق هورمون $LHRHa_2$ اختلاف معنی‌داری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ با زمان پیش از تزریق هورمون داشته و سطح هورمون کورتیزول در سرم خون پس از تزریق روند افزایشی داشت. میزان هورمون تستوسترون در سرم خون ماهیان تزریق شده با هورمون، در شکل۳ نمایش داده شده است. میزان هورمون تستوسترون در سرم خون ماهیان ۶ ساعت پس از تزریق هورمون در مقایسه با سطح هورمون در سرم خون پیش از تزریق، روند افزایشی داشته و سطح هورمون تستوسترون در سرم خون ماهیان، ۱۸ ساعت پس از تزریق هورمون در مقایسه با زمان ۶ ساعت پس از تزریق، روند کاهشی داشته و اختلاف معنی‌داری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ وجود داشت. همچنین میزان پروژسترون در سرم خون ماهیان تزریق شده با هورمون$LHRHa_2$، در زمان ۶ ساعت پس از تزریق در مقایسه با سطح هورمون در سرم پیش از تزریق، روند افزایشی داشته و اختلاف معنی‌داری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ وجود داشته، اما در زمان ۱۸ ساعت پس از تزریق، سطح هورمون E2 روند کاهشی داشت. به‌علاوه، میزان هورمون بتا استرادیول در سرم خون ماهیان تزریق شده با $LHRHa_2$، قبل از تزریق در کمترین میزان خود بود و در زمان ۶ ساعت پس از تزریق میزان هورمون E2 افزایش یافت، اما اختلاف معنی‌داری با پیش از تزریق وجود نداشت. در زمان ۱۸ ساعت پس از تزریق نیز میزان هورمون E2 در سرم خون همچنان روند افزایش داشته و اختلاف معنی‌داری با پیش از تزریق هورمون وجود داشت ($p\leq ۰/۰۵$) (شکل ۳).

هورمون‌های استروئیدی سرم خون ماهی اسکار در القاء ایمپلنت آهسته رهش

در شکل ۴، میزان هورمون کورتیزول در سرم خون ماهیان اسکار القاء شده با ایمپلنت آهسته رهش هورمون $LHRHa_2$نشان داده شده است. میزان هورمون کورتیزول در سرم خون ماهیان پس از کارگذاری ایمپلنت تا زمان ۲۱۶ ساعت پس از کارگذاری افزایش قابل توجهی داشته و پس از آن روندی کاهشی داشت، اما همچنان سطح هورمون در روز پایانی خونگیری (۴۸۰ ساعت پس از کارگذاری) در مقایسه با پیش از کارگذاری ایمپلنت بیشتر بود و اختلاف معنی‌داری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ وجود داشت. همچنین میزان هورمون تستوسترون در سرم خون ماهیان اسکار القاء شده با ایمپلنت آهسته رهش هورمون $LHRHa_2$، در زمان ۲۴ ساعت پس از کارگذاری ایمپلنت روند افزایشی داشت و پس از آن تا زمان ۳۳۶ ساعت پس از کارگذاری روند به صورت کاهشی بود و سطح هورمون در زمان ۳۳۶ ساعت پس از کارگذاری ایمپلنت در مقایسه با پیش از کارگذاری ایمپلنت کمتر بود و اختلاف معناداری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ وجود داشت، اما در زمان ۴۸۰ ساعت پس از کارگذاری، میزان هورمون تستوسترون مقدار اندکی افزایش یافت، اما همچنان از سطح هورمون تستستوسترون در سرم خون پیش از کارگذاری ایمپلنت کمتر بود. به‌علاوه، میزان هورمون پروژسترون در سرم خون ماهیان اسکار القاء شده با ایمپلنت آهسته رهش هورمون $LHRHa_2$، در زمان ۲۱۶ ساعت پس از کارگذاری به صورت کلی روند افزایشی داشت و در مقایسه با پیش از کارگذاری به طور قابل‌توجهی بیشتر بود و اختلاف در سطح معنی‌داری وجود داشت ($p\leq ۰/۰۵$). در زمان ۳۳۶ ساعت پس از کارگذاری، میزان هورمون پروژسترون کاهش یافته و سپس افزایش یافت. در ۴۸۰ ساعت پس از کارگذاری، سطح هورمون پروژسترون در مقایسه با سطح هورمون پیش از کارگذاری بیشتر بود و اختلاف معنی‌داری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ وجود داشت. در ضمن، میزان هورمون بتا استرادیول در سرم خون ماهیان اسکار القاء شده با ایمپلنت آهسته رهش هورمون $LHRHa_2$، در ۱۴۴ ساعت پس از کارگذاری، روند افزایشی داشته و در مقایسه با پیش از کارگذاری، اختلاف معنی‌داری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ وجود

داشت. سپس سطح هورمون E2 در سرم خون ماهیان مقداری کاهش یافت، اما همچنان سطح هورمون E2 در ۴۸۰ ساعت پس از کارگذاری، در مقایسه با پیش از کارگذاری بیشتر بود، ولی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۴).



شکل ۳: نمودارهای مقایسه‌ای میانگین و انحراف معیار هورمون‌های استروئیدی در سرم خون ماهی اسکار در تیمار تزریقی هورمون $LHRHa_2$

Figure 3: Comparative graphs of mean and standard deviation of steroid hormones in blood serum of scar fish in $LHRHa_2$ hormone injection treatment.

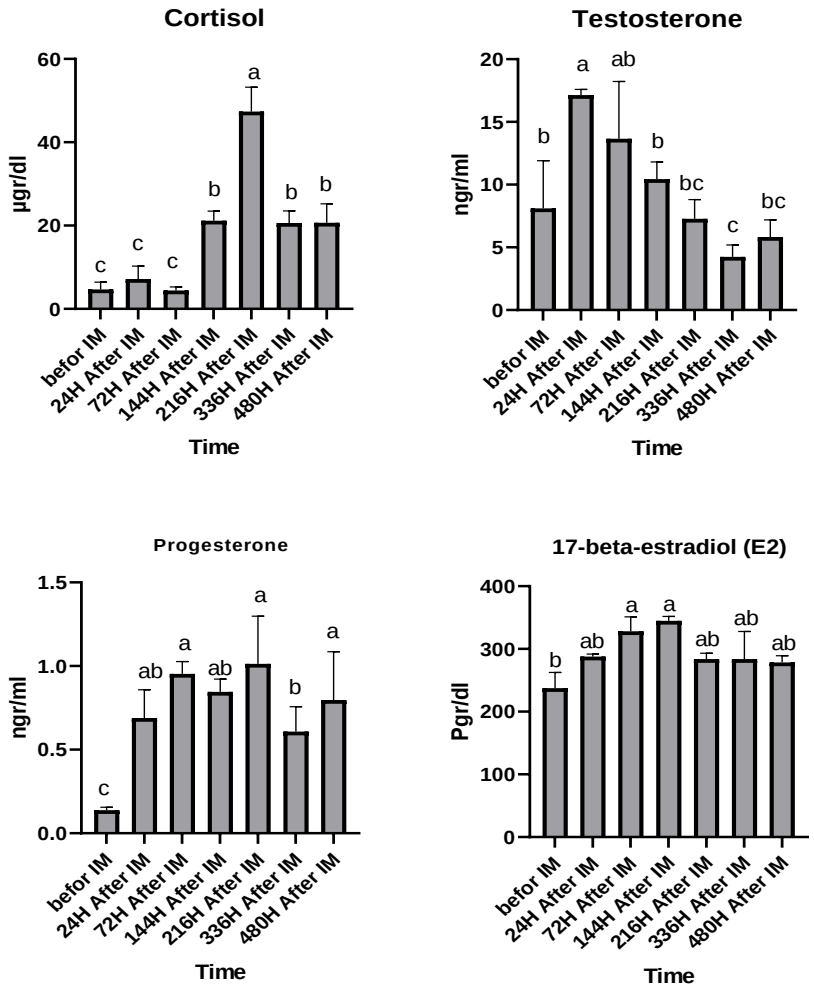
تخم‌ریزی در ماهیان پس از القاء هورمون

تخم‌ریزی در ماهیان گروه تزریقی

دو مولد از سه مولد در تیمار تزریقی، پس از تزریق هورمون، موفق به تخم‌ریزی شدند، اما میزان تخم‌ریزی به حد مطلوب نبود و یکی از این دو مولد با وجود تورم شکمی و رفتار تخم‌ریزی موفق به تخم‌ریزی به‌صورت کامل نشد و در اثر پارگی تخمدان و آسیت در محوطه شکمی، تلف شد.

تخم‌ریزی در ماهیان گروه ایمپلنت

در این گروه، دو مولد از سه مولد، ۴۰ روز پس از کارگذاری ایمپلنت موفق به تخم‌ریزی شدند و یکی از مولدین ۳ مرتبه به صورت مکرر به‌فاصله ۳ روز، تخم‌ریزی کرد.



شکل ۴: نمودارهای مقایسه‌ای میانگین و انحراف معیار هورمون‌های استروئیدی در سرم خون ماهی اسکار در تیمار ایمپلنت هورمون $LHRHa_2$

Figure 4: Comparative graphs of mean and standard deviation of steroid hormones in the blood serum of scar fish in $LHRHa_2$ hormone implant treatment

بحث

محققان از هورمون‌های اگزوژن (LHRHa، $LHRHa_2$، GNRH) برای حل مشکلات تولیدمثلی ماهیان در اسارت همچون کاهش تخم‌ریزی، کاهش اسپرم‌زایی، کاهش مایع منی (Rainis *et al.*, 2003; Mylonas *et al.*, 2007) و برای حل مشکلات گونه‌هایی از ماهیان با توسعه ناهمزمان تخمدان استفاده کردند (Mylonas *et al.*, 2007)، ولی در به‌کارگیری این هورمون‌ها به روش تزریقی مشکلاتی وجود دارد که از جمله: هورمون‌هایی چون GNRH و LHRH به‌سرعت از خون پاکسازی می‌شوند، به این دلیل احتیاج به تزریق مکرر هورمون به منظور حفظ سطح پلاسمایی موردنیاز هورمون LH در خون است. به‌علاوه، درمان‌های هورمونی مکرر (به‌روش تزریقی) از نظر مدیریتی به علت افزایش سطح استرس، آترزی غدد جنسی، افزایش تلفات پیش از تخم‌گذاری در برخی از ماهیان خاص، ناکارآمد است. لذا، روش‌های کارگذاری ایمپلنت‌های آهسته رهش هورمونی به منظور آزادسازی تدریجی هورمون طی روزها لغایت هفته‌ها در سیستم گردش ماهی به طور موفقیت‌آمیزی به کارگرفته شد. در مطالعه حاضر، ایمپلنت آهسته رهش هورمون $LHRHa_2$ بر پایه کوپلیمر PLGA-b-PEG

ساخته شد که به‌تنهایی نیمه عمر بیشتری نسبت به پلیمر PLGA داشت. در مطالعه حاضر، سطح هورمون کورتیزول، ۶ ساعت پس از تزریق هورمون $LHRHa_2$ در مقایسه با پیش از تزریق هورمون (گروه کنترل)، افزایش یافت و در ۱۸ ساعت پس از تزریق به حداکثر میزان خود رسید. مولدین مورد مطالعه، پیش و پس از تزریق هورمون، متحمل استرس ناشی از خونگیری و حمل‌ونقل بودند. اما سطح هورمون کورتیزول پس از تزریق، افزایش قابل‌توجهی نسبت به پیش از تزریق داشت که حاکی از تأثیر مراحل خونگیری و دستکاری ماهی و اثر غیر مستقیم هورمون $LHRHa_2$ بر سطح هورمون کورتیزول بود. هم سو با مطالعه حاضر، در بررسی سطوح هورمون‌های استروئیدی ماهی *Chilasoma dimerus* در فرایند طبیعی چرخه تولیدمثلی، به صورت طبیعی سطح هورمون کورتیزول پیش از تخم‌ریزی افزایش می‌یابد (Varela *et al.*, 2017).

در گروه ایمپلنت، تا زمان ۲۱۶ ساعت پس از کارگذاری، سطح هورمون کورتیزول در مقایسه با پیش از کارگذاری و گروه کنترل افزایش یافت و در زمان ۲۱۶ ساعت به حداکثر میزان خود رسید و سپس کاهش یافت. ولی همچنان از سطح هورمون کورتیزول پیش از کارگذاری بالاتر بود که سطح بالاتر هورمون کورتیزول در ۲۱۶ ساعت پس از کارگذاری نسبت به شروع آزمایش، علاوه بر استرس ناشی از خونگیری، حمل‌ونقل، می‌تواند حاکی از تأثیر هورمون $LHRHa_2$ بوده باشد و کاهش سطح هورمون کورتیزول پس از این زمان، به دلیل عادت کردن ماهی به شرایط محیطی بود. مغایر با نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای دیگر، تغییرات سطح هورمون کورتیزول و هورمون‌های استروئیدی ماهی باربوس (*Barbus sharpeyi*) بر اثر تزریقی هورمون $LHRHa_2$ و عصاره هیپوفیز مورد بررسی قرار گرفت. سطح کورتیزول پس از تزریق $LHRHa_2$ کاهش یافته و پس از تخم‌ریزی مقداری افزایش یافت ولی همچنان نسبت به پیش از تزریق در سطح پایین‌تری قرار داشت (Mohammadian *et al.*, 2015). همسو با مطالعه حاضر، با بررسی اثر تزریقی عصاره هیپوفیز، هورمون $LHRHa_2$ و هورمون تیروکسین بر سطوح هورمون کورتیزول و هورمون‌های استروئیدی کپور ماهی روهو (*Labeo rohita*)، سطح هورمون کورتیزول پس از تزریق هورمون $LHRHa_2$ نسبت به پیش از تزریق افزایش یافت و در قیاس با هورمون تیروکسین و عصاره هیپوفیز، تزریق هورمون $LHRHa_2$ میزان کورتیزول را مقدار کمتری افزایش داد و استرس کمتری برای مولدین ایجاد کرد (Maboudi *et al.*, 2022). در مطالعه حاضر، سطح هورمون E2 در سرم خون ماهیان در گروه تزریقی، ۶ ساعت پس از تزریق (در فاصله میان تزریق اول و دوم) مقدار بسیار کمی افزایش یافت و در پایان ۱۸ ساعت در حداکثر میزان خود قرار گرفت. در ماهیان گروه تزریقی، دو مولد از سه مولد تخم‌ریزی کردند و یکی از مولدین هیچ علایمی از تخم‌ریزی نشان نداد و این می‌تواند حاکی از این موضوع باشد که مولدین در مراحل مختلفی از رسیدگی جنسی قرار داشتند. هورمون E2 در سرم خون ماهیان القاء شده با ایمپلنت تا زمان ۱۴۴ ساعت پس از القاء، روند افزایشی داشت و سپس مقداری کاهش یافت و تا زمان ۴۸۰ ساعت پس از القاء در یک سطح نسبتاً ثابتی باقی ماند. در تیمار ایمپلنت، در دو مولد از سه مولد طی دوره خونگیری علایم رفتاری حاکی از آمادگی جهت تخم‌ریزی مشاهده شد (تورم و نرم شدن شکم، تورم منفذ تناسلی)، اما تخم‌ریزی در طول دوره خونگیری مشاهده نشد (۴۰ روز پس از القاء ایمپلنت در این دو مولد تخم‌ریزی مشاهده شد). در مطالعه حاضر، افزایش سطح هورمون E2 پس از القاء هورمون (گروه تزریقی و ایمپلنت) به این دلیل است که طی فرایند زرده‌سازی داخلی، غلظت E2 افزایش می‌یابد و به حداکثر میزان خود می‌رسد و حین فرایند زرده‌سازی خارجی، در همان سطح باقی می‌ماند. سپس در مرحله بلوغ و سیال شدن تخمک‌ها (تخمک‌گذاری)، غلظت هورمون به‌سرعت کاهش می‌یابد (King and Pankhurst, 2003). غلظت هورمون در روزهای پایانی خونگیری تیمار القاء شده با ایمپلنت در یک سطح ثابتی قرار داشت. تخمدان‌های سیکلید ماهیان در گروه تخمدان‌های ناهمزمان گروهی قرار دارند، در تخمدان این خانواده از ماهیان، در همه حال چند گروه از فولیکول‌های در حال رشد وجود دارد. به عبارت دیگر، تخمک‌ها در مراحل مختلفی از رشد قرار دارند و این می‌تواند حاکی از این موضوع باشد که برخی از تخمک‌ها در مرحله ۳ و ۴ از مراحل رسیدگی جنسی و یکسری از

تخمک‌ها در مراحل ۱ و ۲ از مراحل رسیدگی جنسی است و این علت تفاوت در سطوح هورمون ۱۷ بتا استرادیول است. همسو با مطالعه حاضر، اثر تزریقی هورمون $LHRHa_2$ بر سطوح هورمون‌های استروئیدی ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*)، ۶۶ درصد موفقیت در تخم‌ریزی مشاهده شد که سطح هورمون بتا استرادیول در سرم خون ماهیانی که تخم‌ریزی کردند در مقایسه با گروه شاهد، کاهش یافته و سطح هورمون E2 در سرم خون ماهیانی که تخم‌ریزی نکردند، در قیاس با گروه شاهد افزایش یافت (Ahmadnezhad *et al.*, 2012). همسو با مطالعه حاضر، سطح هورمون ۱۷-بتا استرادیول در سرم خون ماهیان پس از القاء هورمون $LHRHa_2$ افزایش یافت و حتی پس از تخم‌ریزی نیز در سطح بالایی قرار داشت (Mohammadian *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای بر ماهیان پیش مولد سیچلاید آمریکایی (*Aequidens pulcher*)، به‌کارگیری هورمون استروئیدی به صورت تجویز محیطی، موجب افزایش هورمون ۱۷-بتا استرادیول و به دنبال آن، کاهش رفتار پرخاشگرانه‌ی ماهی و بروز بیشتر رفتار مسالمت‌آمیز در سیکلید ماهیان شده است (Munro and Pitcher, 1985). در مطالعه حاضر، هورمون تستوسترون در گروه تزریقی، ۶ ساعت پس از تزریق، افزایش قابل‌توجهی نسبت به پیش از القاء هورمون داشت که این می‌تواند به‌علت تأثیر هورمون $LHRHa_2$ به عنوان آزاد کننده گنادوتروپین بر هیپوفیز و به‌دنبال آن اثر بر سلول‌های لایه تکا تخمدان و به دنبال آن ترشح هورمون پروژسترون و تبدیل این هورمون به هورمون تستوسترون در سلول‌های لایه گرانولوزا باشد. در ۱۸ ساعت پس از تزریق در مقایسه با پیش از القاء، هورمون به صورت معنی‌داری کاهش یافت که این می‌تواند به علت تبدیل هورمون تستوسترون به‌وسیله آنزیم آروماتاز به هورمون ۱۷-بتا استرادیول باشد که فعالیت این آنزیم بیشتر در ماهیان مولد ماده مطرح است و در ماهیان نر فعالیت جزئی دارد. در گروه ایمپلنت، در زمان ۲۴ ساعت پس از کارگذاری ایمپلنت، سطح هورمون تستوسترون افزایش قابل‌توجهی داشت و سپس روند کاهشی یافت و در زمان ۳۳۶ ساعت پس از کارگذاری ایمپلنت به حداقل میزان خود رسید و در ۴۸۰ ساعت پس از کارگذاری، مجدداً افزایش یافت و این موضوع مطابق با روند آزادسازی ایمپلنت کارگذاری شده تا زمان ۳۳۶ ساعت بود که روند آزادسازی هورمون $LHRHa_2$ به‌اتمام رسید. در واقع، در زمان ۴۸۰ ساعت ماهی به فعالیت تولیدمثلی طبیعی خود بازگشته است. همسو با مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای دیگر، در تیمار ماهیان القاء شده با هورمون $LHRHa_2$، سطح هورمون تستوسترون در ماهیانی که پس از القاء هورمون، موفق به تخم‌ریزی نشدند، کاهش یافته و سطح هورمون تستوسترون در ماهیانی که موفق به تخم‌ریزی شدند، افزایش یافته بود و بالعکس سطح هورمون ۱۷-بتا استرادیول کاهش یافته که حاکی از ارتباط معنی‌دار میان این دو هورمون در زمان فرایند تولیدمثلی بوده است (Ahmadnezhad *et al.*, 2012). همسو با مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای دیگر سطح هورمون تستوسترون پس و پیش از تخم‌ریزی نسبت به پیش از تزریق، کاهش یافته است (Maboudi *et al.*, 2022). همسو با مطالعه حاضر، در پژوهشی دیگر، سطح هورمون تستوستون ۶ ساعت پس از تزریق هورمون افزایش یافته و ۶ ساعت پس از تزریق دوم کاهش یافته، ولی همچنان از سطح هورمون تستوسترون پیش از تزریق بالاتر بوده است (Mohammadian *et al.*, 2015). در مطالعه حاضر، هورمون پروژسترون، ۶ ساعت پس از تزریق، افزایش قابل‌توجهی داشت و سپس ۱۸ ساعت پس از تزریق، کاهش یافت، ولی همچنان سطح هورمون در مقایسه با پیش از زمان تزریق، بالاتر بود. در واقع، در زمان ۶ ساعت پس از تزریق با اثر هورمون $LHRHa_2$ و بر طبق روند مذکور، سطح هورمون پروژسترون افزایش یافته و ۱۸ ساعت پس از تزریق، به‌دنبال تبدیل پروژسترون به ۱۷-آلفا هیدروکسی پروژسترون، سطح این هورمون کاهش یافت. در مطالعه حاضر، احتمالاً ماهیان در مراحل مختلفی از رسیدگی جنسی قرار داشتند و ازآن‌جایی‌که ۲۴ ساعت پس از تزریق، دو مولد ماده از سه مولد تخم‌ریزی کردند، حاکی از است که تخمدان‌های این دو مولد در مرحله ۳ و ۴ از رسیدگی جنسی قرار داشتند و به این دلیل ۱۸ ساعت پس از تزریق سطح هورمون پروژسترون کاهش یافت و از آن‌جایی که در یکی از مولدین هیچ نشانه‌ای از تخم‌ریزی مشاهده نشد، در مرحله ۱ و ۲ از رسیدگی جنسی قرار داشتند. در گروه

ایمپلنت، سطح هورمون پروژسترون تا زمان ۲۱۶ ساعت پس از کارگذاری روند افزایشی داشت و به حداکثر میزان خود رسید و سپس در زمان ۳۳۶ ساعت پس از کارگذاری کاهش یافت، که در واقع، در این زمان فرایند تبدیل هورمون پروژسترون به ۱۷-آلفا هیدروکسی پروژسترون صورت گرفت، اما در زمان ۴۸۰ ساعت پس از کارگذاری، مقداری افزایش یافت که این زمان فعالیت تولیدمثلی به‌حالت طبیعی خود بازگشت. در گروه ایمپلنت، دو مولد از سه مولد ۴۰ روز پس از کارگذاری ایمپلنت، ۳ مرتبه به فاصله ۷۲ ساعت تخم‌ریزی کردند. افزایش پروژسترون در یک دوره کوتاه می‌تواند نشان‌دهنده نقش محدود این هورمون بر عملکرد تخمدان و نقش غیرمستقیم آن در رسیدگی نهایی تخمک‌ها از طریق دی هیدرو اکسی پروژسترون در مرحله تخم‌ریزی باشد. همسو با مطالعه حاضر، تغییرات سطوح هورمون پروژسترون در مراحل مختلف رسیدگی جنسی در جنس ماده مولدین کپور نقره‌ای نشان داد که سطوح آن در مراحل ۳ و ۴ رسیدگی جنسی به طور معنی‌داری بیشتر از مراحل ۱ و ۲ رسیدگی جنسی بود (Yasemi *et al.*, 2017). در گروه تزریقی هورمون $LHRHa_2$، سطح هورمون پروژسترون ۷۲ ساعت پس از تزریق افزایش یافت و در گروه ایمپلنت، ۷۲ ساعت پس از کارگذاری افزایش یافت و سپس به طور قابل‌توجهی کاهش یافت (Poortenaar and Pankhurst, 2000). نتایج این مطالعه با بررسی سطوح هورمون‌های استروئیدی تحت القاء هورمون $LHRHa_2$، به دو روش تزریقی و ایمپلنت در ماهی اسکار پرتغالی، نشان می‌دهد که ماهیان ایمپلنت گذاری شده به صورت طبیعی دوران پس از جراحی را پشت سر گذاردند و تلفاتی دیده نشد و میزان ترشح هورمون‌های استروئیدی جنسی در این دسته از ماهیان در مقایسه با گروه تزریق به صورت مدت‌دار در سطح بالایی قرار داشت. پس از گذشت مدت زمان القاء تولید مثلی با روش ایمپلت، کاهش استرس و به دنبال آن رهاسازی بهتر تخمک را به‌همراه داشت که می‌تواند دلیلی بر موفقیت‌آمیز بودن ایمپلنت‌گذاری جهت القاء تولید مثلی در ماهی اسکار پرتغالی قلمداد نمود.

منابع

Ahmadnezhad, M., Oryan, S., Hosseinzadeh Sahafi, H., Khara, H. and Sattari, M., 2012. Effects of LHRH-A2 and chlorpromazine (dopamine antagonists) on inducing spawning in Caspian Kutum, *Rutilus frisii kutum*, from the southwest of the Caspian Sea. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 10(1):33-42. (In Persian)

Avgoustakis, K., 2004. Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Preparation, properties and possible applications in drug delivery, *Current Drug Delivery*, 1(4):321-333. DOI:10.2174/1567201043334605

Caldas, J.S., da Silva, A.L., de Sousa, L.M., de Sousa, E.B., Monteiro, I.L.P., de Barros, F.J.T. and Godoy, L., 2021. Effects of hormonal treatment on induced spermiation and semen quality in the endangered Amazonian fish *Hypancistrus zebra* (Siluriformes, Loricariidae). *Aquaculture*, 533:736140. DOI:10.1016/j.aquaculture.2020.736140

Erdogan, F., Erdogan, M. and Gümüş, E., 2012. Effects of dietary protein and lipid levels on growth performances of two African cichlids (*Pseudotropheus socolofi* and *Haplochromis ahli*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12(3):635-640.

King, H.R. And Pankhurst, N.W., 2003. Ovarian growth and plasma sex steroid and itellogenin profiles during vitellogenesis in Tasmanian Female Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 219(1-4):797-813. DOI:10.1016/s0044-8486(02)00647-6

Locatelli, E. and Franchini, M.C., 2012. Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system, Journal of Nanoparticle Research, 14:1-17. DOI:10.1007/s11051-012-1316-4

Maboudi, H., Eslamizadeh, E., Rumiani, L., Javaheri, B. M., Chaleh, M. and Dezfulnejad, M., 2022. Comparative Study of Pituitary Extract, LHRH, and Thyroxine on Sex steroids, Histochemistry and (*Labeo rohita*) Producing Fatty Acids. *Journal of Animal Biology*, 14 (4):135-152. (In Persian)

Marino, G., Panini, E., Longobardi, A., Mandich, A., Finoia, M.G., Zohar, Y. and Mylonas, C.C., 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture*, 219(1-4):841-858.

Mohammadian, T., Malekpouri, P., Zare, M. and Zainodini, M.A., 2015. Effects of different spawning agents on serum levels of reproductive steroid hormones and cortisol level in adult female *Barbus sharpeyi* (Gunther, 1874). *Fish physiology and biochemistry*, 41:1475-1489. DOI:10.1007/s10695-015-0100-7

Munro, A.D. And Pitcher, T.J., 1985. Steroid hormones and agonistic behavior in a cichlid teleost, *Aequidens pulcher*. *Hormones and Behavior*, 19(4):353-371. DOI:10.1016/0018-506X(85)90034-0

Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2000. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in fish biology and fisheries*, 10:463-491. DOI:10.1023/A:1012279814708

Mylonas, C.C., Bridges, C., Gordin, H., Ríos, A.B., García, A., De La Gándara, F. and Zohar, Y., 2007. Preparation and administration of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) implants for the artificial control of reproductive maturation in captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Reviews in Fisheries Science*, 15(3):183-210. DOI: 10.1080/10641260701484572

Ohta, K., Sakai, M., Sundaray, J.K., Kitano, T., Takeda, T., Yamaguchi, A. and Matsuyama, M., 2012. Bidirectional sex change induced by sex steroid implantation in the hermaphrodite fish, *Pseudolabrus sieboldi*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 317(9):552-560. DOI:10.1002/jez.1747

Pawar, S.S., Lokhande, P.C., Sharangdhar, M.T., Gitte, M.J., ST Sadawarte, V.R., Sharangdhar, H.S. and Sharangdhar, A.M., 2018. Effect of various lipid sources on the growth and survival of juveniles of Oscar, *Astronotus ocellatus*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(5):304-310.

Poortenaar, C.W. and Pankhurst, N.W., 2000. Effect of luteinising hormone-releasing hormone analogue and human chorionic gonadotropin on ovulation, plasma and ovarian levels of gonadal steroids in greenback flounder *Rhombosolea tapirina*. *Journal of the World Aquaculture*

Society, 31(2): 175-185. DOI:10.1111/j.1749-7345.2000.tb00351.x

Rainis, S., Mylonas, C.C., Kyriakou, Y. and Divanach, P., 2003. Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRHa implants. *Aquaculture*, 219(1-4): 873-890. DOI:10.1016/S0044-8486(03)00028-0

Varela, M.L., Ferreira, M.F., Da Cuña, R.H., Lo Nostro, F.L., Genovese, G. and Meijide, F.J., 2017. Dynamics of ovarian maturation throughout the reproductive cycle of the Neotropical cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). *Canadian Journal of Zoology*, 95(7):485-498. DOI:10.1139/cjz-2016-0198

Yamaguchi, S., Kagawa, H., Gen, K., Okuzawa, K. and Matsuyama, M., 2004. Silicone implants for delivery of estradiol-17β and 11-ketotestosterone to red seabream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 239(1-4):485-496. DOI:10.1016/j.aquaculture.2004.05.031

Yasemi, M., rafiparhizkar, H., tizkar, B. and Yusefi Joordehi, A., 2017. Fluctuations of sexual steroid hormones, calcium ion and alkalinephosphatase enzyme during different sexual maturation stages in broodstock of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix L.*). *Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology)*, 29(4):503-514. (In Persian)

Investigating the comparative effect of slow releasing hormone implants and intraperitoneal injection of LHRHa2 hormone on sexual maturity indicators in oscar fish

Toobaee F.[1]; Mohammadian T.[2]; Sabiza S.[3*]; Moghimipour E.[4]

*s.sabiza@scu.ac.ir

1- Department of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Department of Animal, Poultry and Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Ahvaz Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- Department of Pharmaceutics, Faculty of Pahrmacy, Jondi Shapour University of medical sciences, Ahvaz, Iran.

Introduction
In this study, $LHRHa_2$ hormone was induced in Portuguese Oscar fish by two methods: intraperitoneal injection and slow-release implant implantation (made with innovative PLGA_b_PEG copolymer), and the levels of steroid hormones in the blood serum of the fish and sexual maturity indices were investigated. Oscar fish are among the most famous ornamental fish of the Cichlid family with high commercial importance, which accounts for 95% of the world's ornamental fish. The ovaries of these fish are classified as asynchronous (multiple spawning) and problems in the absence of natural spawning in certain seasons of the year have been reported in this family (Mylonas and Zohar, 2000). For this purpose, the use of exogenous hormones to control their reproductive cycles is of great use. According to studies, the use of hormones by injection is ineffective in some fish due to problems such as rapid hormone clearance, excessive stress, gonadal atresia, and pre-spawning mortality. Also, in studies, slow-release hormone implants have been successfully used in fish such as European sea bass (Dicentrarchus labrax) and northern bluefin tuna (Thunnus thynnus) to gradually release the hormone over days to weeks in the fish's circulatory system, and good results were obtained (Rainis et al., 2003; Mylonas et al., 2007). Therefore, this study attempts to compare these two methods with each other and investigate the effectiveness of the hormone $LHRHa_2$, which has generally been limited in this field.

Methodology
For this purpose, 18 adult male and female Oscar fish were randomly selected into 3 groups (3 pairs of adult fish in each group) and kept in 150 liter aquariums with water temperature of 25-27 degrees Celsius and identical light conditions (each pair in one aquarium) and fed twice a day. The first group was induced with $LHRHa_2$ hormone by injection (2 stages for the female: 10% of the first stage and 90% of the second stage), the second group was induced with hormone by implant, and the third group was injected with only physiological serum. $LHRHa_2$ hormone was calculated at a dose of 80 micrograms per kilogram according to the weight of each fish and injected intramuscularly under the pectoral fin. The implants were made of PLGA-b-PEG copolymer, which coated 75 μg of $LHRHa_2$ hormone by double emulsion method (Avgoustakis., 2004; Locatelli and Franchini., 2012), and were made into oval tablets, sterilized with an ultraviolet device, and implanted under the pectoral fin by observing the principles of surgery and anesthesia. The drug release rate from slow-release implants was also evaluated by making a drug model and using the Franz chamber diffusion method. Blood samples were taken from female fish after anesthesia, before injection or implant placement, and at specific intervals after injection for up to 24 hours and after implant placement for up to 20 days. Then, the levels of steroid hormones in the fish's

blood serum, including 17-beta estradiol, progesterone, testosterone, and cortisol, were determined by ELISA using commercial monobind kits.

Result

Results of serum steroid hormones in Oscar fish in injection treatment are shown in Figure 1. As can be seen, the amount of cortisol hormone in the blood serum of fish after injection of $LHRHa_2$ hormone had a significant difference at the level of $p\leq0.05$ compared to before injection, and the level of cortisol hormone in the blood serum after injection had an increasing trend. The amount of testosterone hormone in the blood serum of fish 6 hours after injection of the hormone increased compared to the level of hormone in the blood serum before injection, and the level of testosterone hormone in the serum, 18 hours after injection of the hormone, compared to 6 hours after injection, decreased, and there was a significant difference at the level of $p\leq0.05$. The amount of progesterone hormone in the blood serum of fish 6 hours after injection increased compared to the level of hormone in the serum before injection, and there was a significant difference at the level of $p\leq0.05$, but 18 hours after injection, the level of hormone decreased. The level of beta-estradiol hormone in the blood serum of fish injected with $LHRHa_2$ was at its lowest level before injection and the level of E2 hormone increased 6 hours after injection but there was no significant difference with the level before injection. 18 hours after injection, the level of E2 hormone in the blood serum continued to increase and there was a significant difference with the level before hormone injection ($p\leq0.05$).

Steroid hormones in Oscar fish serum after slow-release implant induction are shown in Figure 2. As can be seen, the level of cortisol hormone in fish serum increased significantly after implant implantation up to 216 hours after implantation and then decreased. However, the hormone level was still higher on the last day of blood collection (480 hours after implantation) compared to before implant implantation, and there was a significant difference at the $p\leq0.05$ level. The level of testosterone in the serum of fish induced with $LHRHa_2$ implants increased up to 24 hours after implant placement, and then decreased until 336 hours after implantation. The hormone level was lower at 336 hours after implant placement compared to before implant placement, and there was a significant difference at the $p\leq0.05$ level. However, at 480 hours after implantation, the level of testosterone increased slightly, but was still lower than the level of testosterone before implant placement. The level of progesterone hormone in the blood serum of fish induced with $LHRHa_2$ implants showed an overall increase 216 hours after implantation and was significantly higher compared to before implantation, and there was a significant difference ($p\leq0.05$). It decreased at 336 hours after implantation and then increased. At 480 hours after implantation, the level of progesterone hormone was higher compared to before implantation, and there was a significant difference ($p\leq0.05$). The level of beta-estradiol hormone in the blood serum of fish induced with $LHRHa_2$ implants showed an increase 144 hours after implantation and there was a significant difference ($p\leq0.05$) compared to before implantation, and after that, the level of E2 hormone in the blood serum of fish decreased somewhat, but the level of E2 hormone was still higher 480 hours after implantation compared to before implantation, but there was no significant difference.

Finally, two of the three female producers in the injection treatment succeeded in spawning, but one of the two producers died due to ovarian rupture and ascites. In the implant treatment, two of the three female producers succeeded in spawning after 40 days, and one of the two producers spawned repeatedly 3 times at 3-day intervals.

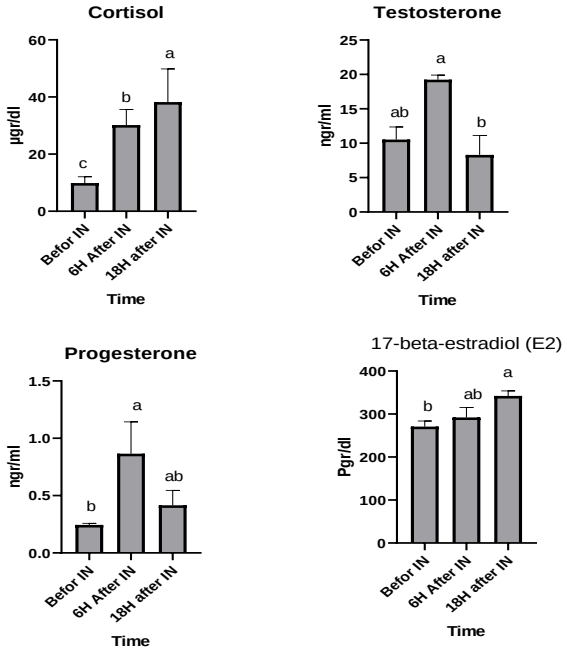


Figure 1: Comparative graphs of mean and standard deviation of steroid hormones in blood serum of Oscar fish in LHRHa2 hormone injection treatment

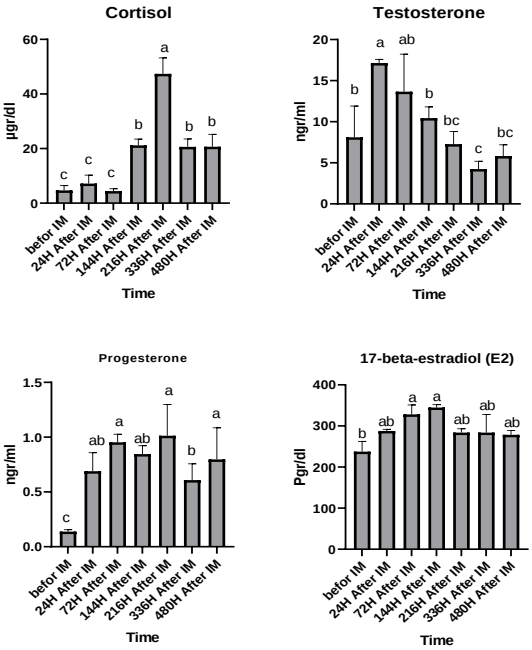


Figure 2: Comparative graphs of mean and standard deviation of steroid hormones in the blood serum of Oscar fish in LHRHa2 hormone implant treatment

Discussion and Conclusion

In the present study, the increase in cortisol levels in the injection and implant groups indicated the effect of the blood collection and manipulation stages of the fish and the indirect effect of the $LHRHa_2$ hormone on cortisol levels. In line with the present study, in the investigation of steroid hormone levels in *Chilasoma dimerus* fish, cortisol levels naturally increase before spawning (Varela et al., 2017). In this study, the level of E2 hormone increased in both groups because during the internal yolk formation process, the concentration of E2 increases and reaches its maximum level and remains at the same level during the external yolk formation process. Then, during the maturation and fluidization stage of the eggs, the hormone concentration decreases rapidly (King and Pankhurst, 2003). The level of testosterone in both groups initially increased and then decreased, which was due to the effect of $LHRHa_2$ on the pituitary gland and the effect on the cells of the ovarian theca layer, followed by the secretion of progesterone and the conversion of this hormone to testosterone in the cells of the granulosa layer, and the decrease was due to the conversion of testosterone by the aromatase enzyme to 17-beta estradiol. The level of progesterone in both groups initially increased and then decreased, which was due to the effect of $LHRHa_2$, and the level of progesterone decreased following the conversion of progesterone to 17-alpha hydroxyprogesterone. The results of this study show that the implanted fish survived the postoperative period normally and no deaths were observed, and the secretion of steroid hormones in this group of fish was at a high level compared to the long-term injection group. After a period of induction with the implant method, stress was reduced and egg release was improved, which can be considered evidence of the success of implantation for reproductive induction in Portuguese Oscar fish.

Acknowledgment

Thanks to Dr. Mohammad Vali Mohammadpour, Resident of Aquatic Health and Diseases.

*Corresponding author