بررسی تغییر سطوح انتقال‌دهنده‌های عصبی مونوآمینرژیک مغز و کورتیزول پلاسما در شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) در مواجهه حاد و مزمن بنزوآلفاپایرن

- **سارا رستگار**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکدهٔ علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ٦٦٩
- **عبدالعلی موحدی‌نیا***: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکدهٔ علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ٦٦٩
- **احمد سواری**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکدهٔ علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ٦٦٩
- **حسین پاشا زانوسی**: پژوهشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ٦٦٩
- **مرتضی بهنام‌رسولی**: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، صندوق پستی:۹۱۷۷۵-۱٤۳٦
- **زهرا یاراحمدی**: گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکدهٔ علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ٦٦٩

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۲

چکیده

در این مطالعه به بررسی اختلالات احتمالی بنزوآلفاپایرن (BaP) در سطوح کورتیزول پلاسما و غلظت انتقال‌دهنده‌های عصبی مغز، در شانک زرد باله پرداخته شده است. در آزمایش اول (استرس حاد) به گروه تیمار، ۵۰ میلی‌گرم بنزو آلفا پایرن در ۲ میکرولیتر روغن گیاهی به‌ازای وزن بدن و به گروه شاهد ۲ میکرولیتر روغن گیاهی به‌ازای هر گرم وزن بدن تزریق گردید. در گروه پایه هیچ‌گونه تزریقی صورت نگرفت. از هر گروه پس از ۳ ساعت نمونه‌گیری شد. برای بررسی اثرات دراز مدت (استرس مزمن)، ۵۰ میلی‌گرم بنزو آلفا پایرن در۱۰میکرولیتر روغن گیاهی (به‌ازای وزن بدن) ایمپلنت گردید، در ماهیان شاهد ۱۰میکرولیتر روغن گیاهی (به‌ازای وزن بدن) ایمپلنت شده و ۷۲ ساعت بعد، نمونه‌گیری صورت گرفت. سطوح کورتیزول پلاسما و غلظت انتقال‌دهنده‌های عصبی در مناطق مختلف مغز سنجش با روش HPLC-EC سنجش شد.BaP موجب افزایش سطوح کورتیزول پلاسما و تغییر در سطوح انتقال‌دهنده‌های عصبی طی هر دو آزمایش حاد و مزمن شد. BaP می‌تواند به‌صورت اختصاصی سبب اختلال در سنتز، آزادسازی، ذخیره‌سازی و باز جذب انتقال‌دهنده‌های عصبی در مناطق مختلف مغز به‌خصوص در هیپوفیز گردد. ضمن این‌که سیستم سروتونینی بسیار بیش‌تر از سایر مونوآمین‌ها تحت تاثیر BaP قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: هیدروکربن‌های حلقوی آروماتیک، مونوآمین‌ها، استرس، نورواندوکرین، شانک زرد باله

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: amovahedinia@yahoo.com

مقدمه

انتقال‌دهنده‌های عصبی مونوآمین ترکیبات شیمیایی ایندول‌آمین، کتکول‌آمینی و یا ایمیدازول‌آمینی هستند که از برخی نورون‌های عصبی ترشح می‌شوند. این ترکیبات در سیستم عصبی علاوه بر ایجاد ارتباط و تنظیم سیگنال‌های بین دو سلول وکنترل عصبی که مهم‌ترین وظیفه آن‌هاست؛ دارای برخی وظایف در سیستم درون‌ریز و وظایف ایمنیایی نیز می‌باشند (Wong و همکاران، ۲۰۰۲). سیستم مونوآمینی دستگاه عصبی طی دوران تکامل مهره‌داران بدون تغییر باقی مانده است (Parent، ۱۹۸۴). این سیستم پل ارتباطی رفتار و فیزیولوژی جانور می‌باشد و این فرصت را برای آلاینده‌هایی که انتقال‌دهنده‌های عصبی را تحت تاثیر قرار می‌دهند فراهم می‌کند تا با تحت تنش و استرس قرار دادن جانور، اثر خود را در سطوح فردی و جمعیتی اعمال کنند (Øverli و همکاران، ۱۹۹۸؛ De Pedro و همکاران، ۱۹۹۸). پاسخ به استرس در ماهیان،مشخصاًبا تحریک محور هیپوتالاموس- هیپوفیز-اینترنال[1] (HPI) شروع شده و با تغییرات متابولیسمی و فیزیولوژیکی به ماهی در تحمل شرایط جدید کمک می‌کند. در ماهیان نیز مانند سایر مهره‌داران پاسخ‌های فیزیولوژیک مربوط به استرس به‌وسیله مکانیسم‌های معمول در مغز از جمله انتقال‌دهنده‌های عصبی سروتونین (5-HT)، دوپامین (DA) و نورآدرنالین (NA) که نقش حیاتی در این زمینه دارند، کنترل می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند سروتونین ترشح شده از هسته‌های رافه و قسمت پاراونتریکولارهیپوتالاموس درمغز قزل‌آلای‌رنگین‌کمان در هنگام استرس می‌تواند در تحریک محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- اینترنال HPI نقش اساسی داشته باشد (Höglund، ۲۰۰۱). در پستانداران استرس موجب افزایش ترشح NE در مغز می‌شود که ترشح CRF از هیپوتالاموس را تسهیل می‌کند (Mattinez-Porchas و همکاران، ۲۰۰۹). ارتباط بین سطوح کورتیزول و ترشح NE در قزل‌آلای‌رنگین‌کمان و تغییر در سطوح کورتیزول هم‌زمان با تغییرات غلظت DA در مغز ماهی *Arctic charr* پس از استرس طولانی مدت نیز گزارش شده است (Höglund، ۲۰۰۱؛ Øverli و همکاران، ۱۹۹۹).

امروزه آلاینده‌های آلی در محیط‌های آبی می‌توانند به‌عنوان عامل استرس‌زا بر حیات بسیاری از آبزیان از جمله ماهیان موثر واقع شوند (Pauka و همکاران، ۲۰۱۱). PAHها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های محیطی می‌توانند سبب ایجاد استرس و برهم زدن تعادل هومئوستاز بدن شوند. این آلاینده اثر استرس بیولوژیکی خود را از طریق فعال کردن رسپتورهای (آریل هیدروکربن) اعمال می‌کند؛ BaP هم‌چنین به‌دلیل چربی دوست‌بودن می‌تواند در بافت لیپیدی مغز حل شده و در عملکرد غشا نورونی ایجاد اختلال کند. با توجه به‌میزان جذب آلاینده، این اختلال می‌تواند به‌صورت اختصاصی در میزان سنتز، رهایش، انباشت و بازجذب مونوآمین‌ها در قسمت‌های مختلف مغز بروز نماید (Gesto و همکاران، ۲۰۰۸؛ Gesto و همکاران، ۲۰۰۶).

از آن‌جایی‌که سازگاری ماهیان استخوانی با شرایط استرس و حفظ بقا و تولیدمثل موفق در این موقعیت از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است، لذا سنجش میزان سطوح انتقال‌دهنده‌های عصبی در مغز می‌تواند به درک هر چه بهتر پیچیدگی‌های فیزیولوژیک و رفتاری ماهیان در مواجهه با استرس کمک کند. مطالعات بسیار اندکی در مورد اثر آلاینده‌های آلی بر انتقال‌دهنده‌های عصبی مغز در آبزیان انجام شده است و شناخت کمی پیرامون اثر کنترلی فرآیندهای شیمیایی مغز بر ترشحات هورمونی دخیل در فرآیند استرس وجود دارد، این مطالعه بر آن است که به بررسی اثر حاد و مزمن استرس شیمیایی بنزوآلفاپایرن بر سطوح انتقال‌دهنده‌های عصبی مونوآمینرژیک در مغز و ارتباط آن با تغییرات کورتیزول پلاسما بپردازد. علاوه براین با توجه به این‌که سیستم عصبی مرکزی به‌همراه سیستم درون‌ریز قسمت اعظم اعمال کنترلی بدن را انجام می‌دهند شناخت آسیب‌های وارد به آن بسیار حایز اهمیت است.

مواد و روش‌ها

ماهیان: ماهیان شانک مورد استفاده برای مطالعه حاضر از منطقه خورموسی واقع در حاشیه شمالی خلیج فارس (ایران) با استفاده از قلاب صید و به مرکز تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام خمینی انتقال داده شدند. تعداد ۴۵ ماهی شانک زرد باله با میانگین وزنی (۷/۲۸ ± ۱۵۶/۰۴) به تانک‌های ۳۰۰ لیتری منتقل و به‌مدت ۱ هفته جهت سازگاری با محیط جدید در شرایط شوری، نوری و دمای طبیعی نگه‌داری و تا ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌گیری، ماهیان به مقدار ۱٪ وزن بدن غذادهی شدند.

[1] Hypothalamus- Pituitary-Interrenal

طراحی آزمایش و نمونه‌گیری

بررسی اثر حاد BaP: ۲۴ عدد ماهی به سه گروه پایه، شاهد و تیمار تقسیم شدند. قبل از تزریق، ماهی‌ها با استفاده از محلول ۲- فنوکسی اتانول (۰/۲ درصد) بی‌هوش و وزن شدند. به گروه تیمار مقدار ۵۰ میلی‌گرم بنزوآلفاپایرن (B1760-Sigma) به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن حل شده در ۲ میکرولیتر روغن آفتابگردان به‌ازای هر گرم وزن بدن بصورت داخل صفاقی تزریق شد. به گروه شاهد تنها ۲ میکرولیتر روغن آفتابگردان به‌ازای هر گرم وزن بدن تزریق گردید. در مورد ماهیان گروه پایه به‌منظور تعیین اثر استرس دستکاری و تزریق، هیچ‌گونه تزریقی صورت نگرفت. از ماهیان این آزمایش، ۳ ساعت پس از تزریق نمونه‌گیری به‌عمل آمد.

بررسی اثر مزمن BaP: ۱۲ عدد ماهی به دو گروه شاهد و تیمار تقسیم کرده، سپس ماهیان به‌کمک محلول ۲- فنوکسی اتانول (۰/۲ درصد) بی‌هوش شده و وزن گردیدند. در گروه تیمار مقدار ۵۰ میلی‌گرم بنزوآلفاپایرن به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن حل شده در ۱۰ میکرولیتر روغن نارگیل به‌ازای هر گرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی ایمپلنت شد. در گروه شاهد تنها از ایمپلنت ۱۰ میکرولیتر روغن نارگیل به‌ازای هر گرم وزن بدن استفاده گردید. از ماهیان این آزمایش، ۳ روز پس از ایمپلنت نمونه‌گیری صورت گرفت. دوز مورد استفاده در این مطالعه بر اساس مطالعات قبلی که بر روی اثرات وابسته به زمان و غلظت هیدروکربن‌های نفتی و مشتقات آن‌ها بر چندین بافت و پروسه سلولی صورت گرفته، انتخاب شد (Gesto و همکاران، ۲۰۰۸؛ Pacheco و Santos، ۱۹۹۸؛ Wilson و همکاران، ۱۹۹۸).

نمونه‌گیری: ماهیان با استفاده از ۲-فنوکسی‌اتانول ۰/۲درصد بی‌هوش شده و خون‌گیری به‌کمک سرنگ آغشته به هپارین از سیاهرگ ساقه دمی انجام شد. نمونه خون با دور ۶۰۰۰ دردقیقه به‌مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ و پلاسمای به‌دست آمده را در نیتروژن مایع به سرعت منجمد کرده و تا انجام مطالعات بعدی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

پس از خون‌گیری از هر ماهی، سر ماهی به‌سرعت جدا گردید. پس از خارج کردن مغز قسمت‌های هیپوفیز، تلن‌سفالون (به‌استثنای لوب بویایی)، منطقه پیش‌بینایی مغز (شامل تارهای عصبی نوری)، هیپوتالاموس و اپتیک تکتوم جدا و وزن هر قسمت اندازه‌گیری گردید، زمان تشریح هر مغز ۴ تا ۸ دقیقه بود. کلیه بافت‌ها در نیتروژن مایع سریعاً منجمد و تا انجام سنجش سطوح انتقال‌دهنده‌های عصبی در فریزر ۸۰- سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (Cerdá - Reverter و Canosa، ۲۰۰۹؛ Butler و Hodos، ۲۰۰۵).

سنجش سطوح پلاسمایی کورتیزول: غلظت هورمون کورتیزول به‌روش الایزا با استفاده از کیت تجاری DAIMETRA (ساخت ایتالیا) در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Tintos و همکاران، ۲۰۰۶).

سنجش سطوح انتقال‌دهنده‌های عصبی: سنجش سطوح انتقال‌دهنده‌های عصبی (دوپامین، سروتونین، نوراپی‌نفرین و مهم‌ترین آمین‌های اکسید شده آن‌ها) براساس روش (Miguez و همکاران، ۱۹۹۹) که توسط Gesto و همکاران (۲۰۰۶) اصلاح شد و با دستگاه HPLC مدل Waters 2695 مجهز به آشکارساز الکتروکمیکال Waters 2465 صورت گرفت. ستون HPLC مورد استفاده جهت جداسازی ۱۸کربنه ۲۵ سانتی‌متری با قطر ۴ میکرومتر (Waters Associates) بود، الکترود اول روی ۴۰+ میلی‌ولت و الکترود دوم روی ولتاژ ۳۴۰+ میلی‌ولت تنظیم گردید.

فاز مایع دستگاه محلولی بود شامل: ۶۳/۹ میلی‌مول NaH2PO4 (Merck)، ۰/۱ میلی‌مول Na2EDTA (Sigma)، ۱/۶۳ میلی‌مول سدیم ۱- اکتانوسولفونات (Merck) و ۱۴/۹٪ متانول (Merck) بود. pH به‌کمک اسید ارتوفسفات (Merck) روی ۲/۷۹ تنظیم شد.

جهت آماده‌سازی نمونه‌ها هر یک از بافت‌های مغز ماهی جداگانه با به‌کارگیری هموژنایزر اولتراسونیک هموژن شدند. برای این کار حجمی از فاز مایع که برای هیپوفیز ۰/۱ میلی‌لیتر و برای هیپوتالاموس، تلن‌سفالون، ناحیه پیش‌بینایی و اپتیک تکتوم ۰/۵ میلی‌لیتر می‌باشد، به ویال محتوی بافت مغز اضافه نموده و هموژن شدند. در مرحله بعد عصاره بافت‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. فاز رویی، جدا شده و با فاز مایع رقیق شد بدین‌ترتیب که تلن‌سفالون، اپتیک‌تکتوم و پیش‌بینایی به نسبت ۱:۱ و هیپوتالاموس به نسبت ۱:۲ با فاز مایع رقیق (فاز مایع/ روشناور) شدند. رقیق‌سازی برای بافت هیپوفیز صورت نگرفت. با انجام این مرحله نمونه‌ها آماده تزریق به دستگاه هستند. حجم هر تزریق ۳۰ میکرولیتر، زمان اجرا[1] برای هر یک از نمونه‌ها ۱۵ دقیقه، دامنه نوسانات تصادفی[2] ۳ و شدت جریان[3] ایزوکراتیک[4] ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه در دمای

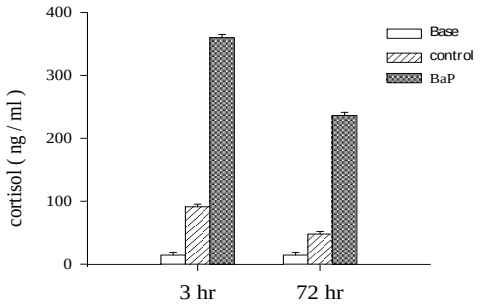
[1] Run time
[2] noise
[3] Flow rate
[4] Isocratic

اتاق بود. به‌منظور به‌دست آوردن غلظت هریک از مونوآمین‌ها از کروماتوگرام‌های به‌دست آمده (مساحت زیر هر منحنی) با استفاده از نرم‌افزار Millennium ver.32 انتگرال‌گیری صورت گرفت.

آنالیز آماری: داده‌های مربوط به سطوح هورمون کورتیزول و انتقال‌دهنده‌های دوپامین، سروتونین، نوراپی‌نفرین و متابولیت‌های 3 و 4 دی‌هیدروکسی‌فنیل ۳-اسیداستیک (DOPAC) و ۵-هیدروکسی‌ایندول ۳- اسیداستیک (5-HIAA) به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شده است. برای مقایسه میانگین مقادیر هورمون کورتیزول و غلظت انتقال‌دهنده‌های عصبی در سه گروه پایه، شاهد و تیمار از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد، جهت مقایسات چندگانه پس آزمون Student-Newman-Keuls به‌عمل آمد. ضریب اطمینان در هر دو آزمون ۹۵٪ ($p<۰/۰۵$) است. در تحلیل داده‌ها و رسم نمودار از نرم‌افزار Sigma plot ver.11 استفاده گردید.

نتایج

در طی دوره آزمایش هیچ‌گونه رفتار غیرعادی در شنا و حرکات و هم‌چنین مرگ و میری در ماهیان دیده نشد. سطوح کورتیزول پلاسما در استرس حاد، به‌طور معنی‌داری از گروه‌های پایه و شاهد بیش‌تر بود. در همین زمان سطوح پلاسمایی کورتیزول در گروه شاهد نیز از گروه پایه به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود. اگرچه با اعمال استرس مزمن بنزوآلفاپایرن هم‌چنان سطوح هورمون کورتیزول پلاسما بیش‌تر از گروه‌های پایه و شاهد بود ($P<۰/۰۵$)، اما سطوح این هورمون نسبت به استرس حاد کم‌تر شده بود (شکل ۱).



شکل ۱: تغییرات سطوح کورتیزول پلاسما پس از مواجهه (3 hr) و (72 hr) با BaP.

*: اختلاف معنی دار با گروه کنترل ($P<۰/۰۵$)، #: اختلاف معنی دار با گروه پایه ($P<۰/۰۵$). نمودار براساس (Mean ± SE)

غلظت DOPAC در استرس حاد در هیپوفیز افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های پایه و شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$). ضمن این‌که ۷۲ ساعت پس از مواجهه با BaP میانگین غلظت DOPAC در اپتیک‌تکتوم افزایش معنی‌داری را نسبت به‌گروه‌های پایه و شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$)، در سایر مناطق مورد بررسی، تفاوت معنی‌داری در غلظت DOPAC بین گروه‌های پایه، شاهد و تیمار شده با BaP ایجاد نشد ($P>۰/۰۵$) (شکل ۲).

براساس داده‌های به‌دست آمده، شاخص فعالیت دوپامین (DOPAC/DA) پس از ۳ ساعت در هیپوفیز افزایش معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) را نشان داد. ضمناً طی استرس مزمن نسبت DOPAC/DA در اپتیک‌تکتوم افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های پایه و شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$) (شکل ۲).

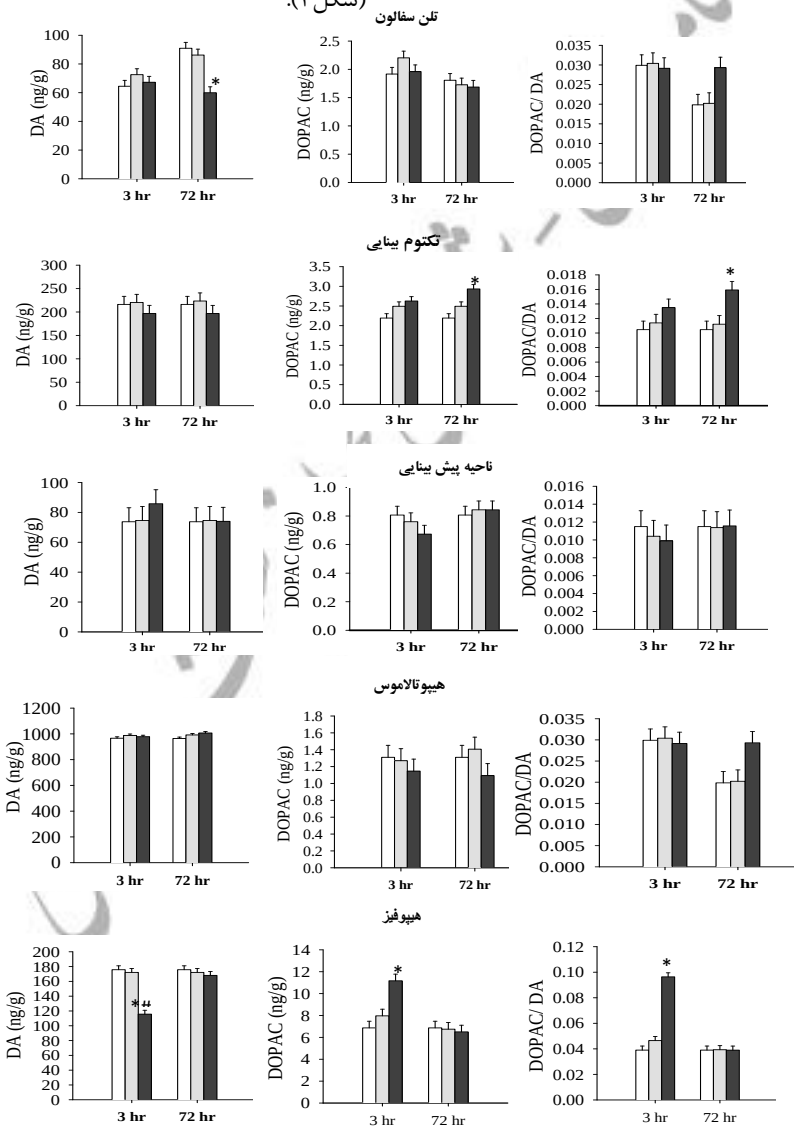
سیستم سروتونینی بیش از سایر مونوآمین‌های مغز تحت تاثیر BaP قرارگرفته است که این تاثیر در استرس حاد مشهودتر به‌نظر می‌آید، براساس نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر، به‌نظر می‌رسد تغییرات ناشی از تیمار BaP سیستم سروتونینی را بیش‌تر تحت تاثیر قرار داده و سیستم دوپامینی احتمالاً برای تغییر به زمان بیش‌تری نیاز دارد. براساس نتایج، میانگین غلظت دوپامین در استرس حاد در هیپوفیز کاهش معنی‌داری نسبت به گروه پایه و شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$). اما در سایر مناطق مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. هم‌چنین غلظت این انتقال‌دهنده ۷۲ ساعت پس از مواجهه با آلاینده، در تلن‌سفالون کاهش معنی‌داری را نسبت به هر دو گروه شاهد و پایه نشان داد ($P<۰/۰۵$) (شکل ۳).

میانگین غلظت سروتونین در استرس حاد در مناطق تلن‌سفالون، ناحیه پیش‌بینایی، هیپوتالاموس و هیپوفیز،

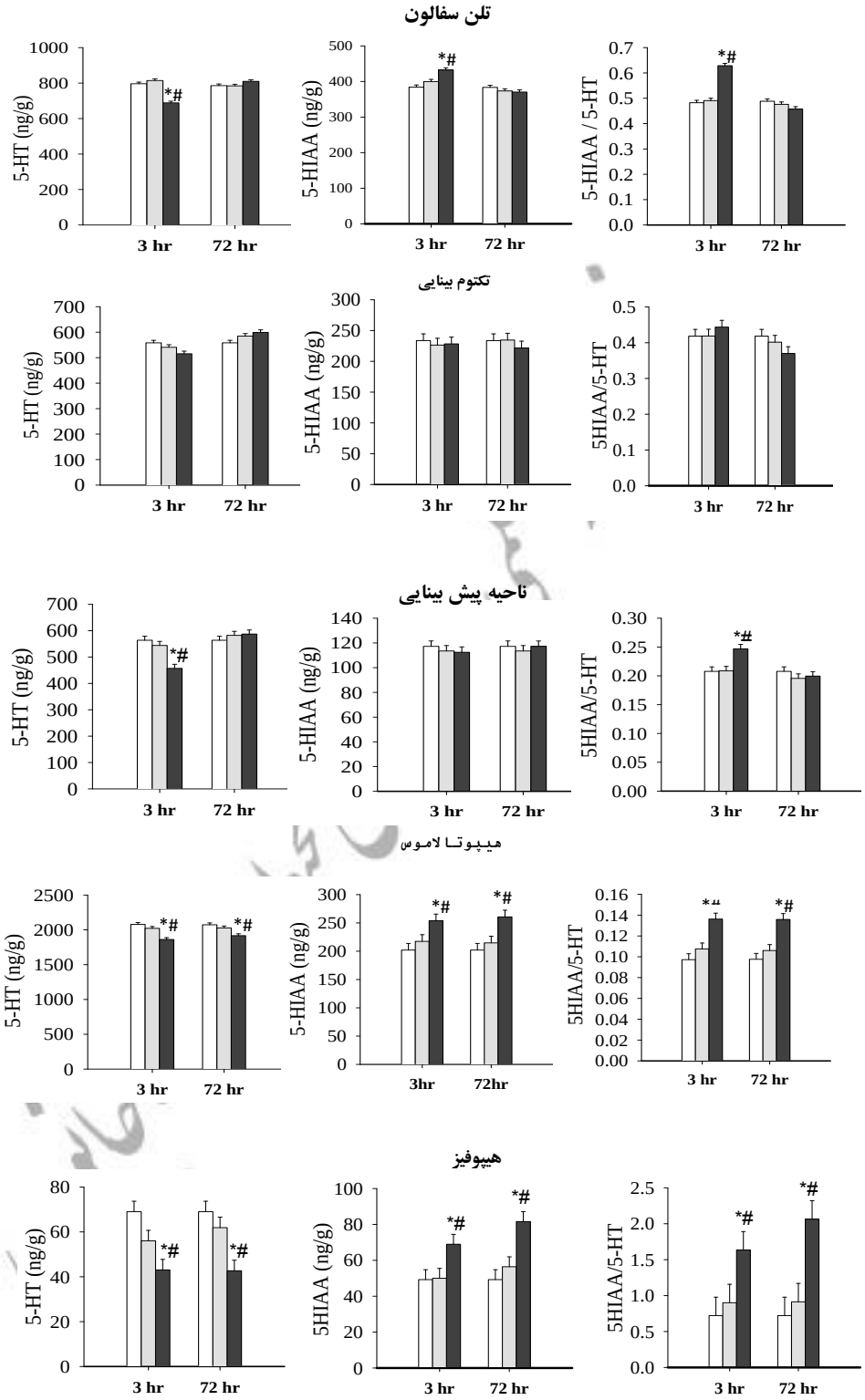
کاهش معنی‌داری را نسبت به هر دو گروه پایه و شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). غلظت این انتقال‌دهنده در مواجهه مزمن با BaP تنها در هیپوتالاموس و هیپوفیز کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های پایه و شاهد نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل۳). میانگین غلظت 5-HIAA پس از مواجهه حاد با بنزوآلفاپایرن در تلن‌سفالون، هیپوتالاموس و هیپوفیز افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) (شکل۳). در استرس مزمن غلظت 5-HIAA در هیپوتالاموس و هیپوفیز افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵) و در دیگر مناطق مورد بررسی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل۳).

نتایج افزایش معنی‌دار نرخ 5-HIAA/5-HT را در تلن‌سفالون، ناحیه پیش‌بینایی، هیپوتالاموس و هیپوفیز پس از استرس حاد نشان داد (P<۰/۰۵). شاخص فعالیت سیستم سروتونینی هیپوفیز و هیپوتالاموس پس از مواجهه مزمن با BaP به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) (شکل۳).

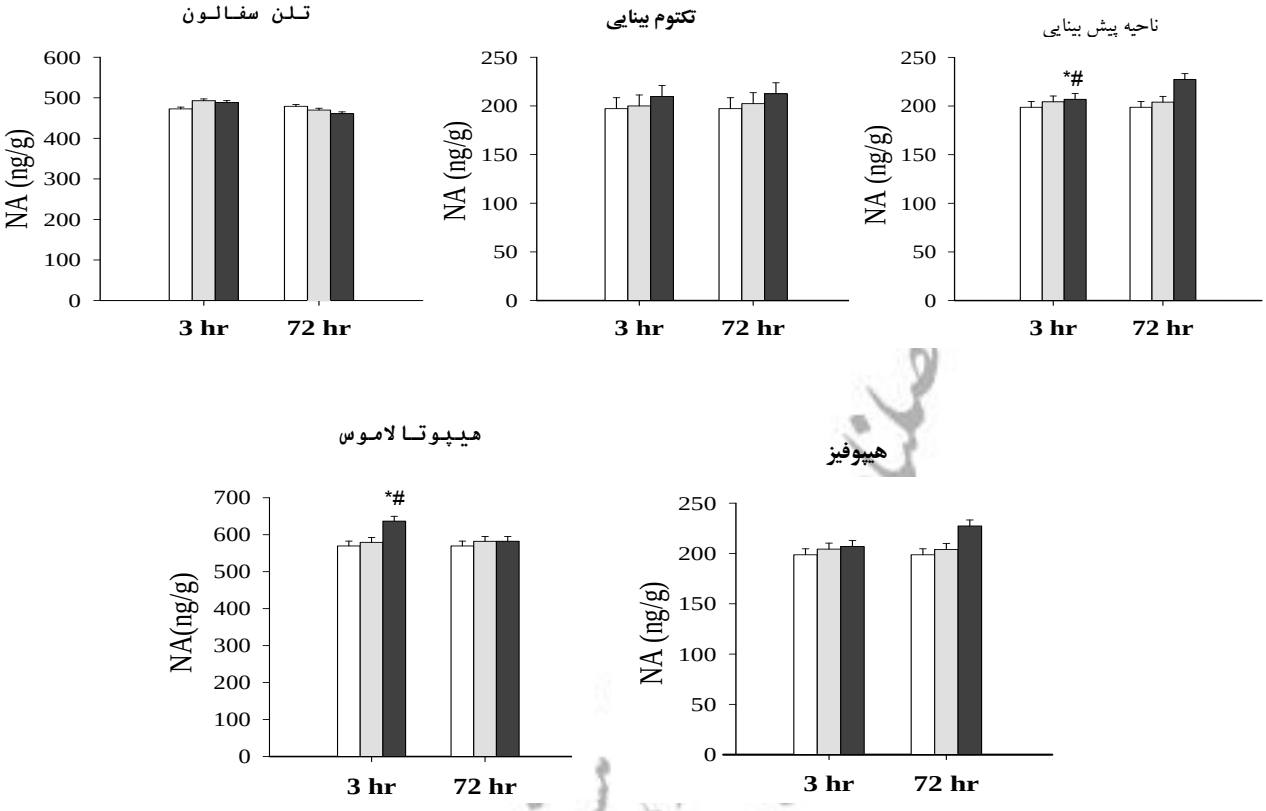
میانگین غلظت نورآدرنالین طی استرس حاد تنها در هیپوتالاموس و ناحیه پیش‌بینایی به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵)، در حالی‌که در سایر مناطق مورد بررسی در مغز در هیچ‌کدام از دو مواجهه‌ی حاد و مزمن با BaP در غلظت این انتقال‌دهنده تفاوت معنی‌داری دیده نشد (P>۰/۰۵) (شکل۴).



شکل ۲: تغییرات غلظت دوپامین و DOPAC و نرخDA/ DOPAC در تلن‌سفالون، لب‌های بینایی، منطقه پیش‌بینایی، هیپوتالاموس و هیپوفیز۳ و ۷۲ ساعت پس از تزریق و ایمپلنت BaP، سفید: گروه پایه، خاکستری روشن گروه شاهد، خاکستری تیره: گروه تیمار شده با BaP. *: تفاوت معنی‌دار با گروه پایه. # تفاوت معنی‌دار با گروه پایه شاهد. نمودار براساس (Mean ± S.E.M)



شکل ۳: **تغییرات غلظت سروتونین و 5-HIAA و نرخ 5-HIAA/ 5-HT در تلن‌سفالون، لب‌های بینایی، منطقه پیش‌بینایی، هیپوتالاموس و هیپوفیز ۳ و ۷۲ ساعت پس از تزریق و ایمپلنت BaP**، سفید: گروه پایه، خاکستری روشن گروه شاهد، خاکستری تیره: گروه تیمار شده با BaP. *: تفاوت معنی‌دار با گروه پایه. #: تفاوت معنی‌دار با گروه پایه شاهد. نمودار براساس (Mean ± S.E.M)



شکل 4: تغییرات غلظت نورآدرنالین در تلن‌سفالون، لب‌های بینایی، منطقه پیش‌بینایی، هیپوتالاموس و هیپوفیز ۳ و ۷۲ ساعت پس از تزریق و ایمپلنت BaP، سفید: گروه پایه، خاکستری روشن گروه شاهد، خاکستری تیره: گروه تیمار شده با BaP. *: تفاوت معنی‌دار با گروه پایه. #: تفاوت معنی‌دار با گروه پایه شاهد. نمودار براساس (Mean ± S.E.M)

بحث

پاسخ‌های فیزیولوژیک مرتبط با تحریک کورتیزول نقش مهمی را در تحمل شرایط استرس بازی می‌کنند (Mattinez-Porchas و همکاران، ۲۰۰۹). این نتایج حاکی از آن است که با ورود بنزوآلفاپایرن به بدن ماهی، موجود تحت تنش قرار گرفته و به‌منظور تامین انرژی برای مقابله با شرایط تحمیل شده جدید، سطوح پلاسمایی کورتیزول را بالا می‌برد. ارتباط مثبت بین سطوح کورتیزول و استرس در بسیاری از مطالعات تایید شده است (Pankhurst، ۲۰۱۱؛ Barton، ۲۰۰۲). در مطالعات Thomas و همکاران (۱۹۸۰) در کفال راه‌راه، Kennedy و Farrell (۲۰۰۵) در هرینگ اطلس، Tintos و همکاران (۲۰۰۸) و Gesto و همکاران (۲۰۰۹) هر دو در قزل‌آلای رنگین‌کمان، افزایش سطوح کورتیزول را در مواجه با آلاینده‌های هیدروکربنی گزارش شد. اگرچه Wilson و همکاران (۱۹۹۸) کاهش سطوح کورتیزول پلاسما را در اثر مواجهه با PAHها به‌دلیل غیرکار آمد شدن محور HPI و یا از کار افتادن آنزیم‌های میتوکندریایی سنتز کورتیزول گزارش کرده‌اند، که این تفاوت می‌تواند به‌دلیل تفاوت مکانیسم اثر PAH مورد مطالعه آنان یعنی بتانفتوفلاون و همین‌طور اختلاف در محل اثرگذاری آلاینده در مغز و یا بافت اینتررنال ماهی باشد.

Hontela (۲۰۰۵) در مورد اثرات مزمن مواجهه با PAHها مشابه نتایج اثر BaP بر شانک زردباله در مطالعه حاضر، نشان داد که سطوح کورتیزول در استرس مزمن پایین‌تر از استرس حاد بود که علت آن‌را به خستگی محور HPI و حساسیت‌زدایی از سلول‌های ترشح‌کننده ACTH ناشی از بیش فعالی طولانی مدت آن‌ها نسبت داد.

براساس نتایج سطوح کورتیزول گروه شاهد بالاتر از گروه پایه بود که این امر نشان می‌دهد تزریق در ماهی شانک زرد باله استرس خود به‌نوعی در ایجاد استرس نقش داشته است، بنابرین می‌توان چنین نتیجه گرفت که بخشی از افزایش کورتیزول به استرس ناشی از تزریق و یا ایمپلنت مربوط می‌شود و مابه‌التفاوت آن به احتمال زیاد می‌توان مربوط به اثر استرس‌زای بنزوآلفاپایرن دانست.

مطالعات نشان می‌دهند که، تنظیم عملکرد محور HPI تحت کنترل انتقال‌دهنده‌های مونوآمینرژیک مغز می‌باشد. این انتقال‌دهنده‌ها در کنترل و یکپارچگی پاسخ‌های رفتاری و فیزیولوژیک مربوط به استرس در ماهیان استخوانی نقش دارند (Cerdá-Reverter and Canosa، ۲۰۰۹؛ Barton، ۲۰۰۲؛ Höglund، ۲۰۰۱۲).

فعالیت دوپامینرژیک طی استرس حاد مواجهه با بنزوآلفاپایرن دستخوش تغییرات زیادی نشد. براساس نتایج، تنها تغییر در این شرایط کاهش محتوای دوپامین هیپوفیز به‌همراه افزایش غلظت DOPAC و افزایش نرخ آن بود. BaP احتمالاً سبب افزایش فعالیت نورون‌های دوپامینی شده و از این طریق سرعت جذب و بازجذب و نیز کاتابولیسم دوپامین را بالا برده است؛ هم‌چنین BaP ممکن است به‌طور غیرمستقیم و از طریق کاهش ورودی‌های تحریک‌کننده و یا افزایش ورودی‌های مهارکننده به نورون‌های دوپامینی، آزادسازی دوپامین را از پایانه‌های سیناپسی آن‌ها کاهش داده و همین امر عامل افزایش فعالیت دوپامین در هیپوفیز باشد. کاهش غلظت دوپامین بدون تغییر در سطوح DOPAC و نیز نسبت DOPAC/DA در تلن‌سفالون شانک زردباله نیز رخ داد. به‌نظر می‌رسد در این منطقه از مغز BaP از تبدیل اسیدآمینه تیروزین به دوپامین جلوگیری کرده و یا مانع از انتقال تیروزین از پلاسما به‌درون نورون‌های‌مغزی شده است که البته مکانیسم عمل آن ناشناخته است (Gesto و همکاران، ۲۰۰۸). نتایج فوق حاکی از آن است که بین تغییرات کورتیزول و تغییرات فعالیت دوپامین ارتباط مثبتی وجود دارد، ضمن این‌که Barrot (۲۰۰۱) و همین‌طور Øverli و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی تاثیر استرس بر انتقال‌دهنده‌ها در قزل‌آلای رنگین‌کمان همین نتیجه را گزارش کردند. Winberg و همکاران (۱۹۹۷) و هم‌چنین Höglund (۲۰۰۱) افزایش فعالیت دوپامین را در مغز ماهی چار قطبی، هنگامی که به‌مدت طولانی در معرض استرس قرار گرفت؛ گزارش کردند.

طی استرس کوتاه‌مدت، BaP بر سیستم سروتونینی نسبت به سایر مونوآمین‌ها اثرات وسیع‌تری در مغزگذاشت و سبب کاهش ۵-HT و افزایش ۵-HIAA در تلن‌سفالون، ناحیه پیش‌بینایی، هیپوتالاموس و هیپوفیز شد. جهت توصیف فعالیت انتقال‌دهنده‌های عصبی، بررسی نسبت متابولیت اصلی یک مونوآمین به خود آن مونوآمین در مقایسه با بررسی سطوح مطلق مونوآمین‌ها شاخص مناسب‌تری محسوب می‌شود (Hernandez-Rauda و همکاران، ۱۹۹۹؛ Dulka و همکاران، ۱۹۹۲).

افزایش فعالیت سروتونرژیک در استرس حاد در تلن‌سفالون، ناحیه پیش‌بینایی، هیپوتالاموس و هیپوفیز مشاهده شد. مشابه نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، Gesto و همکاران (۲۰۰۸) افزایش فعالیت نورون‌های سروتونینی را در مغز قزل‌آلای تیمار شده با بنزوآلفاپایرن و بتانفتوفلاون گزارش کردند. هم‌چنین Stephanou و همکاران (۱۹۹۸) افزایش فعالیت نورون‌های سروتونینی را، ۶ تا ۱۲ ساعت پس از تیمار با BaP در مغز موش مشاهده کردند.

به‌نظر می‌رسد BaP از سنتز سروتونین به‌شدت جلوگیری کرده و این ممانعت در کوتاه‌مدت برروی مناطقی از مغز که اکسون نورون‌های سروتونینی در آن‌جاقرار دارد؛ نظیر تلن‌سفالون، دین‌سفالون به‌خصوص هیپوتالاموس و ناحیه پیش‌بینایی به‌صورت محسوس‌تری اعمال می‌شود (Hernandez-Rauda و همکاران، ۱۹۹۹؛ Butler و Hodos، ۲۰۰۵). مطالعات Øverli و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی تاثیر استرس بر مونوآمین‌های مغز در قزل‌آلای رنگین‌کمان و Castoldi و همکاران (2006) در بررسی اثر آلاینده‌های PCB در موش نیز، ارتباط بین سیستم سروتونین و آشفتگی در محور HPI را تایید کرده است. از آن‌جایی‌که متابولیت‌های مشترک بین DA و NA محدود هستند و نورآدرنالین از تغییر و تبدیل دوپامین حاصل می‌شود (Wu و Lin، ۲۰۰۰)، این امکان وجود دارد که تغییرات NA تابعی از تغییرات دوپامین باشد. Stanford و همکاران (۱۹۹۳) در بررسی مغز پستانداران بیان کردند، استرس سبب فعال شدن نورون‌های نورآدرنالرژیک در مغز شده و ترشح CRF از هیپوتالاموس تحریک می‌کند. هم‌چنین Øverli و همکاران (۱۹۹۹) ارتباط مثبتی بین فعالیت نورآدرنالین و سطوح پلاسمایی کورتیزول در قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش کردند. به‌همین خاطر شاید بتوان گفت که از دیگر عوامل افزایش شدید کورتیزول پلاسما، افزایش نورآدرنالین می‌باشد.

چنین به‌نظر می‌رسد که بین تغییرات سطوح کورتیزول و فعالیت نورون‌های دوپامینی، سروتونینی و نورآدرنالینی در استرس مواجهه با BaP ارتباط مستقیمی وجود دارد. تغییرات ایجاد شده توسط BaP در غلظت مونوآمین‌های مغز با گذشت زمان در استرس مزمن، به‌تدریج به سطوح نرمال مونوآمین‌ها در ماهیان گروه شاهد نزدیک می‌شود. این نتیجه به‌خوبی با پایین آمدن سطوح پلاسمایی کورتیزول در استرس مزمن هم‌خوانی داشت. می‌توان گفت تنظیم کاهشی تعداد گیرنده‌ها و یا مقاومت فیزیولوژیک نسبت به اثرات آلاینده و برقراری مجدد هومئوستاز در شرایط جدید (علی‌رغم حضور آلاینده) باشد.

تغییرات احتمالی که در متابولیسم ایندول‌آمین‌ها و کتکول‌آمین‌ها در مناطق مختلف مغز شانک زرد باله پس از تیمار با BaP رخ می‌دهد، می‌توانند در برهم‌زدن تعادل سیستم نورواندوکرین و به‌دنبال آن ویژگی‌های رفتاری که در توان سازشی ماهی موثرند؛ نقش داشته باشند و الگویی برای تغییرات نورواندوکرین در جمعیت‌هایی از ماهیان باشد که به‌صورت طبیعی در معرض PAHها قرار دارند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد مصوب در گروه بیولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انجام شده است. مولفین بر خود لازم می‌دانند از کمک‌های علمی سرکار خانم دکتر آهنگرپور (استادیار دانشگاه جندی‌شاپور اهواز)، جناب آقای دکتر غانمی (استادیار دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر) و جناب آقای مهندس محمدرضا صحرائیان (ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی جنوب) تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. **Barton, B.A., 2002.** Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integrative and Comparative Biology. Vol. 42, pp: 517-525.
2. **Butler, A.B. and Hodos, W., 2005.** Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaptation. Wiley Online Library.
3. **Cerdá-Reverter, J.M. and Canosa, L.F., 2009.** Neuroendocrine systems of the fish brain. Fish Physiology. Vol. 28, pp: 3-74.
4. **De Pedro, N.; Pinillos, M.L.; Valenciano, A.I.; Alonso-Bedate, M. and Delgado, M.J., 1998.** Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: involvement of CRF. Peptides. Vol. 19, pp: 505-511.
5. **Dulka, J.; Sloley, B.; Stacey, N. and Peter, R., 1992.** A reduction in pituitary dopamine turnover is associated with sex pheromone-induced gonadotropin secretion in male goldfish. General and comparative endocrinology. Vol. 86, pp: 496-505.
6. **Gesto, M.; Soengas, J.L. and Míguez, J.M., 2008.** Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol levels in rainbow trout are modified by PAHs (naphthalene,[beta]-naphthoflavone and benzo (a) pyrene) treatment. Aquatic Toxicology. Vol. 86, pp: 341-351.
7. **Gesto, M.; Tintos, A.; Soengas, J.L. and Míguez, J.M., 2006.** Effects of acute and prolonged naphthalene exposure on brain monoaminergic neurotransmitters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. Vol. 144, pp: 173-183.
8. **Grutter, A. and Pankhurst, N., 2000.** The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish Hemigymnus melapterus. Journal of fish biology. Vol. 57, pp: 391-401.
9. **Hernandez-Rauda, R.; Rozas, G.; Rey, P.; Otero, J. and Aldegunde, M., 1999.** Changes in the pituitary metabolism of monoamines (dopamine, norepinephrine, and serotonin) in female and male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during gonadal recrudescence. Physiological and biochemical zoology. Vol. 72, pp: 352-359.
10. **Höglund, E., 2001.** Neuroendocrinology of agonistic interaction and social signaling in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Ph.D. dissertation. Uppsala University, Sweden. 157 p.
11. **Liu, L.; Bridges, R.J. and Eyer, C.L., 2001.** Effect of cytochrome P450 1A induction on oxidative damage in rat brain. Molecular and cellular biochemistry. Vol. 223, pp: 89-94.
12. **Mattinez-Porchas, M.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L.R. and Ramos-Enriquez, R., 2009.** Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? PanAmerican Journal of Aquatic Sciences. Vol. 4, pp: 158-178.

13. **Miguez, J.; Aldegunde, M.; Paz-Valinas, L.; Recio, J. and Sanchez-Barcelo, E., 1999.** Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. Journal of neural transmission. Vol. 106, pp: 1089-1098.
14. **Nguyen, L.P. and Bradfield, C.A., 2007.** The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. Chemical research in toxicology. Vol. 21, pp: 102-116.
15. **Øverli, Ø.; Harris, C.A. and Winberg, S., 1999.** Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. Brain, Behavior and Evolution. Vol. 54, pp: 263-275.
16. **Øverli, Ø.; Winberg, S.; Damsgard, B. and Jobling, M., 1998.** Food intake and spontaneous swimming activity in Arctic char (*Salvelinus alpinus*): role of brain serotonergic activity and social interactions. Canadian journal of zoology. Vol. 76, pp: 1366-1370.
17. **Øverli, Ø.; Winberg, S. and Pottinger, T.G., 2005.** Behavioral and neuroendocrine correlates of selection for stress responsiveness in rainbow trout, a review. Integrative and Comparative Biology. Vol. 45, pp: 463-474.
18. **Pacheco, M. and Santos, M., 1998.** Induction of Liver EROD and Erythrocytic Nuclear Abnormalities by Cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguillaL*. Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 40, pp: 71-76.
19. **Pankhurst, N.W., 2011.** The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. General and comparative endocrinology. Vol. 170, pp: 265-275.
20. **Parent, A., 1984.** Functional anatomy and evolution of monoaminergic systems. American Zoologist. Vol. 24, pp: 783-790.
21. **Pauka, L.M.; Maceno, M.; Rossi, S.C. and Silva de Assis, H.C., 2011.** Embryotoxicity and Biotransformation Responses in Zebrafish Exposed to Water-Soluble Fraction of Crude Oil. Bulletin of environmental contamination and toxicology. pp: 1-5.
22. **Smeets, W., 1994.** Catecholamine systems in the CNS of reptiles: structure and functional correlations. Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates. Cambridge: Cambridge University Press. pp: 103-133.
23. **Stephanou, P.; Konstandi, M.; Pappas, P. and Marselos, M., 1998.** Alterations in central monoaminergic neurotrasmission induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rats. European journal of drug metabolism and pharmacokinetics. Vol. 23, pp: 475-481.
24. **Tintos, A.; M´ıguez, J.M.; Mancera, J.M. and Soengas, J.L., 2006.** Developmentof a microtitre plate indirect ELISA for measuring cortisol in teleosts, and evaluation of stress responses in rainbow trout and gilthead sea bream. J.Fish Biol. Vol. 68, pp: 251-263.
25. **Wilson, J.; Vijayan, M.; Kennedy, C.; Iwama, G. and Moon, T., 1998.** Beta naphthoflavone abolishes interrenal sensitivity to ACTH stimulation in rainbow trout. Journal of endocrinology. Vol. 157, pp: 63-70.
26. **Wong, D.F.; Potter, W.Z. and Brasic, J.R., 2002.** Proof of concept: functional models for drug development in humans. Neuropsycho pharmacology: Fifth Generation of progress. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp: 457-473.
27. **Wu, H.F. and Lin, Y.P., 2000.** Study of ion molecule reactions and collisionally-activated dissociation of dopamine and adrenaline by an ion trap mass spectrometer with an external ionization source. European Journal of Mass Spectrometery. Vol. 6, pp: 65-78.
28. **Yu, Y.; Wong, A.O.L. and Chang, J.P., 2008.** Serotonin interferes with Ca2+ and PKC signaling to reduce gonadotropin-releasing hormone-stimulated GH secretion in goldfish pituitary cells. General and comparative endocrinology. Vol. 159, pp: 58-66.

Changes in the brain monoaminergic neurotransmitters and plasma cortisol levels after acute and prolonged benzo (a) pyrene exposure in *Acanthopagrus latus*

- **Sara Rastegar:** Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr Marine Science and Technology University, P.O.Box: 669, Khorramshahr, Iran
- **Abdolali Movahedinia*:** Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr Marine Science and Technology University, P.O.Box: 669, Khorramshahr, Iran
- **Ahmad Savari:** Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr Marine Science and Technology University, P.O.Box: 669, Khorramshahr, Iran
- **Hossein Pasha Zanousi:** Institute of Marine Sciences, Khorramshahr Marine Science and Technology University, P.O.Box: 669, Khorramshahr, Iran
- **Morteza Behnam Rasouli:** Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University, P.O.Box: 1436-91775, Mashhad, Iran
- **Zahra Yar Ahmadi:** Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr Marine Science and Technology University, P.O.Box: 669, Khorramshahr, Iran

Received: January 2013 Accepted: May 2013

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Cortisol, Neurotransmitter, *Acanthopagrus latus*

Abstract

In this study, effects of Benzo (a) pyrene (BaP) exposure on the levels of neurotransmitters in the different regions of brain and plasma levels of cortisol in the Yellowfin Seabream (*Acanthopagrus latus*) were examined. In the first protocol for assessing the acute stress responses, BaP was injected to a group of fish (50mg/kg BaP in 2µl/g per body weight). The control group for this procedure was injected with oil (2µl/g) per body weight. A group of fish was not injected to assess the basic levels of respective variables. Blood and brain samples from different groups collected 3 hours after injection. To study the long-term a group of fish was implanted with 50mg/kg BaP in 10µl/g coconut oil in respect to the body weight. As the previous protocol a control group was implanted with the same amount of oil without the BaP. Samples were collected from both implanted groups (treatment and control) after 72 hours. In the collected samples, plasma levels of cortisol and contain neurotransmitter in deferens region were assayed.

Plasma levels of cortisol in Yellowfin Seabream increased and contain neurotransmitter altered during both short term and long term exposure to the BaP. According to the results, BaP exposure may affect the synthesis, storage, uptake/release and degradation of the neurotransmitters in different regions of the brain, specially the pituitary gland. Serotonin showed more distinct responses under the BaP exposure stress than the other monoamines.

* Corresponding author`s email: amovahedinia@yahoo.com