DOI:10.21276/ijaq.2017.14.1.2
المجلة العراقية للاستزراع المائي المجلد (14) العدد (1)–2017: 13–28

تأثير نوع الهرمون ومقدار الجرعة في مستوى هرمونات الجونادوتروبين في بلازما دم اسماك الكارب الشائع (*Cyprinus carpio* L.) اثناء عمليات التكثير الاصطناعي

فالح موسى الزيدي ساجد سعد النور* باسم محمد جاسم*
قسم الفقريات البحرية / مركز علوم البحار / جامعة البصرة، بصرة، العراق
* قسم الاسماك والثروة البحرية\كلية الزراعة / جامعة البصرة، بصرة، العراق
E mail: falihjaafer@gmail.com

الخلاصة

استخدام ثلاثة انواع من الهرمونات وهي هرمون luteinizing hormone releasing hormone–A2 (LHRH-A2) بمقادير جرع (10، 20، 30) ميكروغرام/ كغم وخليط من هرمونLHRH-A2 بمقادير جرع (10، 20، 30) ميكروغرام/كغم مع Domperidone (Dom) بجرعة مقدارها 5 ملغم/كغم ومستخلص الغدة النخامية لأسماك الكارب (PEC) بمقادير جرع (3، 4) ملغم/كغم لدراسة تأثير نوع الهرمون ومقدار الجرعة المستخدمة في مستوى هرمونات الجونادوتروبين المفرزة من الغدة النخامية لإناث اسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* خلال عمليات التلقيح الاصطناعي. قيست تراكيز هرمونات GtHs (LH,FSH) باستخدام طريقة ELISA وعدة التحاليل الجاهزة في بلازما الدم للعينات التي اخذت من المضيق الذنبي للأسماك في الاوقات (2، 6، 12) ساعة بعد الحقن للأسماك التي عوملت بهرمون LHRH-A2 والخليط الهرموني و(2، 6، 8) ساعة للأسماك التي عوملت بمستخلص الغدة النخامية. وأظهرت النتائج أنّ مستوى هرمونات الجونادوتروبين GtHs (FSH و LH) كانت منخفضة في الاسماك التي عوملت بهرمون LHRH-A2 وحده او Dom+ LHRH-A2 لكل الجرع المستخدمة وإن مستوى هرمونات الجونادوتروبين كانت اعلى في الاسماك التي عوملت بمستخلص الغدة النخامية بالجرع 3 و 4 ملغم/كغم وان مستويات الFSH و LH كانت في الجرعة 4 ملغم/كغم اعلى من مستوياتها في الجرعة 3 ملغم/ كغم.

كلمات مفتاحية: هرمونات الجونادوتروبين، الكارب الشائع، هرمون LHRH-A2، مستخلص الغدة النخامية.

المقدمة

التنظيم الهرموني العصبي لإفرازِ هرمونات الجونادوتروبين gonadotropin (GtH) بواسطة الهورمونِ المحرر للهرمونات المغذية للمناسل Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) والدوبامين Dopamine (DA) الذي يعمل على منعِ اطلاقِ GtH أعطت تقنية فعّالة جداً لإحداث

التبويض في العديد مِنْ اسماكِ التربية (Peter, 1982) وهذا يتضمن الحقن في التجويف البريتوني intraperitoneal او في العضلات intramuscular لنظير الهرمون المحرر للهرمونات المغذية للمناسل (GnRH) على وجه الخصوص لأسماك السالمون (sGnRH-A) [D-Arg6, Pro9 NET] او هرمون-[D-Ala6, Pro9Net] LHRH-A مع مضاد الدوبامين (PIM) pimozide او (DOM) لإزالة تأثير الدوبامين الذي يمنع افراز هرمونات الغدة النخامية (Lin *et al*., 1988; Peter *et al*., 1991) هذا الخليط حفز افراز هرمونات الغدة النخامية GtH بشكل جيد في السمك الذهبي *Carussius* goldfish *aurutus* (Chang and Peter, 1983; Sokolowska *et al*., 1984) واسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* (Lin *et al*., 1988; Peter *et al*., 1988) واسماك القط الافريقي *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Goos *et al*., 1987) وهذه الطريقة من استعمال الخليط من GnRH او LHRH-A مع مضاد الدوبامين (PIM) او(DOM) لأجل احداث التبويض في الاسماك المرباة سميت بطريقة LinPe (Peter *et al*., 1988) هذه التقنية اعدت بشكل خاص لأسماك السلمونيات والشبوطيات فضلاً عن عدد من اسماك المياه العذبة المرباة الاخرى وحصلت استجابات ممتازة (Lin and Peter, 1996; Peter and Yu, 1997).

استخدمت عِدّة انواع من نظائرGnRH-as مَع العديد من مضادات الدوبامينَ haloperidol، pimozide أو metoclopramide لإحداث التبويـــض بنجاح (Arabaci *et al*., 2004; Mikolajczyk *et al*., 2004؛Brzuska, 2004). استعملَ مربو الاسماك الغدة النخاميَة لأسماك الكارب (CPE) وهذا مازالَ مستخدماً، خصوصاً لمجموعة اسماك الكارب الهندي والكارب الصيني والكارب الشائع (Park *et al*., 1994; Lam, 1983). استُعمِلت نظائر هورمون(LHRH-a) luteinizing hormone releasing hormone-analogue فائق النشاط [des-Gly10D-Ala6] و LHRH Ethylamide بنجاح لإحداث النضجِ النهائيِ وتوقيت التبويض للكثيرِ من الاسماك المرباة بشكل تجاري (Donaldson and Hunter, 1983; Park *et al*., 1997). الطرائق التقليدية المستخدمة في التفقيس الاصطناعي للاسماك المرباة تعتمد على الحقن بهرمون (LH) من عدة مصادر، من ضمنها مستخلص الغدة النخامية الخام لاسماك الكارب الشائع و(LH) المنقى بصورة جزئية من الاسماك وجونادوتروبين الثدييات خاصة Human chorionic gonadotropin (HCG) (Lam 1683; Donaldson and Hunter 1983; Peter *et al* ., 1988.

تأتي أهمية الدراسة في استخدام هرمونات جديدة ومعرفة تأثيرها على الفعالية التكاثرية للأسماك من خلال قياس مستويات هرمونات GtHs في الدم، وبالتالي تعيين نوع الهرمون ومقدار الجرعة المؤثرة التي ستستخدم في التكثير الاصطناعي لأسماك الكارب.

مواد و طرق العمل

جلبت أُمهات الاسماك من محطة استزراع الاسماك الخاصة بمركز علوم البحار في موسم التكثير، عام 2013 ونقلت الى مفقس مركز علوم البحار ووضعت في احواض حضانة الأمهات داخل المفقس، أجري فحص أولي لغرض تمييز الجنس وتحديد الحالة النضجية للأسماك وسلامتها من الجروح.

بلغ عدد الاسماك المستخدمة في الدراسة الحالية (75) سمكة منها (58) انثى و(17) ذكرا وتراوحت اوزانها بين 600 الى 2500 غم بمعدل (1233) غم واطوالها بين 30 و54 سم بمعدل (40.32) سم. وضعت الذكور في احواض منفصلة عن الاناث وعلمت بعلامة خاصة. استعملت مادة MS-222 بتركيز 0.1 غم\ لتر كمادة مخدرة استخدمت قبل اجراء عملية الحقن الهرموني (Akcay *et al.*, 2004) وعند اخذ عينات الدم لغرض تسهيل عملية الحقن وعملية أخذ الدم من الاسماك الحية ولتجنب تعرضها للإجهاد بسبب كثرة التداول. استخدمت ثلاثة انواع من الهرمونات في عمليات الحقن وهي مستخلص الغدة النخامية P G بجرعتين(4، 3) ملغم / كغم وهرمون LHRH-A2 بثلاث جرع (10، 20 ،30) ميكروغرام / كغم وبثلاث جرع (30، 20، 10) ميكروغرام / كغم بالنسبة لهرمون LHRH-A2، مع مضاد الدوبامين(Dom) بجرعة مقدارها 5 ملغم/كغم.

تمت عملية الحقن في المنطقة تحت الزعنفة الظهرية وفوق الخط الجانبي. اخذت عينات الدم من الاسماك قبل وبعد حقنها بالهرمون بمدة (2، 6 ،12) ساعة بالنسبة للأسماك المعاملة بهرمون (LHRH-A2) والخليطDom+ LHRH-A2 و(2، 6،8) ساعة للأسماك المعاملة بمستخلص الغدة النخامية، باستعمال حقن بلاستيكية قياس 3 سم^3 تغرز في منطقة المضيق الذنبي. بعد الحصول على كمية مناسبة من الدم ووضعها في انابيب اختبار زجاجية، تترك لمدة 30 دقيقة لتتجلط ثم توضع في جهاز الطرد المركزي 1500 دورة / دقيقة مدة 15 دقيقة وأخذ الراشح ووضع في انابيب ابندورف سعة 0.5 مل وحفظ بدرجة 20- م° بالتجميد لحين اكتمال جميع العينات وفحصها.

استخدمت طريقة الاختبار المناعي للممتص المرتبط إنزيمياً (ELISA) في تقدير مستوى الهرمونات في الدم على طول موجي 450 نانوميتر. كما استعملت عدة التحاليل kit الخاصة بكل هرمون LH و FSH المنتجة من قبل شركة (WUHAN EIAAB SCIENCE) في قياس كل هرمون اعتماداً على الطريقة المعروفة (ELISA) باستخدام جهاز ELISA Reader.أجريت التحليلات الاحصائية باستخدام البرنامج الاحصائي (SPSS) بطريقة اختبار تحليل التباين (ANOVA) باتجاه واحد لإيجاد أقل فرق معنوي (LSD) لمعرفة وجود الفروق المعنوية بين المعاملات المختلفة. واسْتُخْرِجَ شكل المنحنيات القياسية باستخدام البرنامج Curve Expert الاصدار 1.4 ومنه تستخرج قيمة مستوى الهرمون في العينات.

النتائج

أظهرت النتائج أنَّ الاسماك المعاملة بهرمون LHRH-A2 وحده بالجرع (10، 20، 30) ميكروغرام / كغم والخليط LHRH-A2 + الدومبريدون (Dom) بالجرع (10، 20، 30) ميكروغرام/كغم لم تستجب للتحفيز الهرموني وبالتالي لم يكن الهرمون قادرا على تحفيز الاناث على الاباضة ووضع البيض. وفي قبال ذلك فان الاسماك التي عوملت بمستخلص الغدة النخامية بالجرع 3 و4 ملغم/ كغم كانت استجابتها 100% موضحة بالجدول (1).

بلغ تركيز هرمون FSH 0.104 ±0.6 mIU/ mL بعد 2 ساعة من الحقن عند استخدام الجرعة 10 ميكروغرام/كغم، بينما بلغ تركيزه 0.26±0.76 mIU/ mL بعد مرور 6 ساعات على الحقن وهو اعلى من التركيز السابق في حين انخفض قليلا الى0.557 ± 0.13 mIU/ mL بعد مرور 12 ساعة على الحقن.

لا توجد فروق معنوية في مستوى الهرمون بعد مرور (2، 6، 12) ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية (P>0.05). اما بالنسبة للجرعة 20 ميكروغرام/كغم فكان تركيز الهرمون 0.245 ± 0.097 mIU/ mL بعد مرور 2 ساعة على الحقن (وهو اقل من مستوى الهرمون في الجرعة10 ميكروغرام/ كغم عند الوقت نفسه) ليرتفع الى 0.414±0.67 mIU/ mL بعد مرور 6 ساعات على الحقن وبلغ 0.13±0.557 mIU/ mL بعد مرور12 ساعة على الحقن. لا توجد فروق معنوية في مستوى الهرمون للجرعة 20 ميكروغرام/كغم مع مرور الوقت (2، 6، 12) ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية (P>0.05) في حين ان مستوى الهرمون عند استخدام الجرعة 30 ميكروغرام/كغم كان 0.067±0.142 mIU/ mL عند الوقت 2 ساعة بعد الحقن ارتفع المستوى ليصل الى0.677±0.444 mIU/ mL بعد مرور 6 ساعات وانخفض قليلا الى 0.464±0.287 mIU/ mL بعد مرور 12 ساعة على الحقن. لا توجد فروق معنوية في مستوى الهرمون عند استخدام الجرعة 30 مع مرور الوقت(2، 6، 12) ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية (P>0.05). أظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروق معنوية في مستوى الهرمون بين الجرع الثلاث في الاوقات المختلفة بعد الحقن(P>0.05). الجدول رقم (2).

بلغ مستوى هرمونLH 0.70 ±0.25 mIU/ mL في الجرعة 10 ميكروغرام/كغم بعد 2 ساعة على الحقن في ما ارتفع مستواه الى 1.27±4.066 mIU /mL بعد 6 ساعات على الحقن. وبعد مرو 12 ساعة على الحقن كان مستواه 1.425± 0.93 mIU/ mL منخفضا عن السابق واظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين مستوى الهرمون في الوقت 2 و 6 ساعة بعد الحقن (P<0.05) في حين لم تظهر النتائج وجود فروق معنوية بين تركيز الهرمون بعد 2 و 12 ساعة وبين 6 و 12 ساعة لهذه الجرعة.

جدول (1): تأثير مقدار الجرعة المستخدمة من مستخلص الغدة النخامية وهرمون LHRH-A2 والخليط LHRH-A2+الدومبريدون(Dom) على كمية البيض المنتجة من الاسماك بأطوال واوزان مختلفة.

الطول (سم)	الوزن (غم)	نوع الهرمون	مقدار الجرعة	وزن البيض (غم)	وزن البيض / وزن الاسماك (غم/كغم)
41	1500	PG	4 ملغم / كغم	305	233
45	2250	PG	4 ملغم / كغم	461	204
38	1000	PG	4 ملغم / كغم	300	300
36.5	1000	PG	4 ملغم / كغم	379	379
33	750	PG	4 ملغم / كغم	90	120
48	2500	PG	3 ملغم / كغم	418	167.2
38	1000	PG	3 ملغم / كغم	305	305
37.5	1000	PG	3 ملغم / كغم	292	292
36	1000	PG	3 ملغم / كغم	145	145
33	750	PG	3 ملغم / كغم	60	80
42	1400	LHRH-A2	10 ميكروغرام / كغم	0	
41	1250	LHRH-A2	10 ميكروغرام / كغم	0	
41	1100	LHRH-A2	10 ميكروغرام / كغم	0	
40	1100	LHRH-A2	20 ميكروغرام/ كغم	0	
43	1500	LHRH-A2	20 ميكروغرام / كغم	0	
39	1100	LHRH-A2	20 ميكروغرام / كغم	0	
43	1250	LHRH-A2	30 ميكروغرام / كغم	0	
43	1300	LHRH-A2	30 ميكروغرام / كغم	0	
43	1300	LHRH-A2	30 ميكروغرام / كغم	0	
34	600	LHRH-A2	10 ميكروغرام / كغم	0	
44	1350	Dom+ LHRH-A2	10 ميكروغرام / كغم	0	
36	750	Dom+ LHRH-A2	10 ميكروغرام / كغم	0	
33	600	Dom+ LHRH-A2	20 ميكروغرام / كغم	0	
40	1000	Dom+ LHRH-A2	20 ميكروغرام / كغم	0	
38.5	800	Dom+ LHRH-A2	20 ميكروغرام / كغم	0	
34	600	Dom+ LHRH-A2	30 ميكروغرام / كغم	0	
46	2000	Dom+ LHRH-A2	30 ميكروغرام / كغم	0	
45	1700	Dom+ LHRH-A2	30 ميكروغرام / كغم	0	

جدول (2): تأثير مقدار الجرعة(30,20,10) ميكروغرام/كغم من هرمون LHRH –A2 في مستوى هرمون FSH في بلازما دم اسماك *C. carpio* بعد 2، 6، 12 ساعة على الحقن

الوقت (ساعة) / مقدار الجرعة	FSH (mIU/mL)		
	2	6	12
10	0.6± 0.104 Aa	0.26 ± 0.76 Aa	0.13± 0.557 Aa
20	0.097±0.245 Aa	0.414 ± 0.676 Aa	0.342 ± 0.624 Aa
30	0.067±0.142 Aa	0.444± 0.677 Aa	0.287± 0.464 Aa

تمثل الارقام المعدل ± الانحراف القياسي

الأحرف المختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية ($P< 0.05$) الاحرف الكبيرة للفروق بين الجرع والصغيرة بين اوقات الجرعة.

أما في الجرعة 20 ميكروغرام/كغم فكان مستوى الهرمون 1.84± 0.67 mIU/mL بعد 2 ساعة على الحقن. في حين بلغ 1.905± 1.018 mIU/ mL بعد مرور 6 ساعات على الحقن وانخفض عند الوقت 12 ساعة الى 0.17±0.465 mIU/ mL. لا توجد فروق معنوية في مستوى الهرمون لهذه الجرعة مع مرور الوقت(2، 6، 12) ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية ($P>0.05$). وعند استخدام الجرعة 30 ميكروغرام/كغم بلغ مستوى الهرمون 0.16±0.4 بعد 2 ساعة على الحقن. وكان مستوى الهرمون بعد مرور 6 ساعات على الحقن 0.890±1.755 mIU/ mL وبلغ 0.466 ± 0.675 mIU /mL بعد مرور 12 ساعة على الحقن. لا توجد فروق معنوية في مستوى الهرمون بين الاوقات (2، 6، 12) ساعة بعد الحقن. اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية في مستوى الهرمون بين الجرعة 20 و 30 ميكروغرام/كغم في الوقت 2 ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية($P<0.05$). الجدول رقم (3)

يبين الجدول (4) تأثير مقدار الجرع (10، 20، 30) ميكروغرام/كغم من هرمون LHRH–A2 مع 5 ملغم/كغم من(DOM) في مستوى هرمون FSH المفرز من الغدة النخامية. إذ بلغ مستوى الهرمون للجرعة 10 ميكروغرام/كغم 0.028±0.05 mIU/mL بعد ساعتين على الحقن. وارتفع الى 0.23±0.45 mIU/ mL بعد مرور 6 ساعات. وبعد 12 ساعة كان0.03 ±0.01 mIU/mL . لا توجد فروق معنوية في مستوى الهرمون لهذه الجرعة مع مرور الوقت(2، 6، 12) ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية ($P>0.05$).

جدول (3): تأثير مقدار الجرعة (10،20،30) ميكروغرام/كغم من هرمون LHRH –A2 في مستوى هرمون LH في دم اسماك *C. carpio* بعد (2، 6، 12) ساعة من الحقن.

الوقت(ساعة) / مقدار الجرعة	LH (mIU/mL)		
	2	6	12
10	0.70 ±0.25 AB a	1.27 ± 4.066 A b	0.93 ± 1.425 A ab
20	0.67 ± 1.84 A a	1.018 ±1.905 A a	0.169 ±0.465 A a
30	0.16 ± 0.40 B a	0.890 ± 1.755 A a	0.466 ± 0.675 A a

تمثل الارقام المعدل ± الانحراف القياسي.

الأحرف المختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية ($P< 0.05$)الاحرف الكبيرة للفروق بين الجرع والصغيرة بين اوقات الجرعة .

اما عند استخدام مقدار الجرعة 20 ميكروغرام/كغم، فكان مستوى الهرمون 0.53±0.30 mL mIU/ عند الوقت 2 ساعة بعد الحقن لينخفض الى 0.166±0.023 mIU/ mL بعد مرور 6 ساعة من الحقن. وبعد مرور 12 ساعة من الحقن بلغ 0.16±0.03 mIU/ mL. لا توجد فروق معنوية في مستوى الهرمون لهذه الجرعة مع مرور الوقت (2، 6، 12) ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية ($P>0.05$).

اما بالنسبة لمستوى الهرمون FSH عند استخدام مقدار الجرعة 30 ميكروغرام/كغم فقد كان0.037 ± 0.02 mIU/ mL بعد 2 ساعة على الحقن ولم تحصل سوى تغيرات طفيفة عن هذا المستوى للأوقات 6 ساعة ±0.05 0.007 mIU/ mL و 12 ساعة ±0.182 0.13 mIU/ mL. لا توجد فروق معنوية في مستوى الهرمون بين الاوقات المختلفة (2، 6، 12) ساعة بعد الحقن لهذه الجرعة لمستوى المعنوية ($P>0.05$). اظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروق معنوية في مستوى الهرمون بين الجرع الثلاث في الاوقات المختلفة بعد الحقن لمستوى المعنوية ($P>0.05$).

يوضح الجدول (5) تأثير مقدار الجرع (10، 20، 30) ميكروغرام/كغم من هرمون LHRH –A2 مع 5 ملغمِ /كغم من (DOM) على تركيز هرمون LH في بلازما دم اسماك الكارب الشائع في الاوقات (2، 6، 12) ساعة بعد الحقن. بلغ مستوى هرمونLH 0.43 ±0.32 mIU/mL في الجرعة10 ميكروغرام/كغم بعد مرور 2 ساعة على الحقن فيما ارتفع مستواه الى 0.95 ±0.40 mIU/ mL بعد 6 ساعات من الحقن وبعد مرور 12 ساعة بلغ مستواه 1.64 ±0.83 mIU/mL.

جدول (4): تأثير مقدار الجرع (30، 20، 10) ميكروغرام/كغم من الخليط الهرموني LHRH –A2 +5 ملغم/كغم Dom في مستوى هرمون FSH في دم اسماك *C. carpio* بعد مرور 2، 6، 12 ساعة على الحقن

الوقت(ساعة) / مقدار الجرعة	FSH (mIU/mL)		
	2	6	12
10	0.05 ± 0.028 Aa	0.45 ± 0.23 Aa	0.032 ±0.01 Aa
20	0.53 ± 0.30 Aa	0.166 ± 0.08 Aa	0.16 ± 0.03 Aa
30	0.037 ±0.02 Aa	0.05 ± 0.01 Aa	0.182 ± 0.1 Aa

تمثل الارقام المعدل ± الانحراف القياسي

الأحرف المختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية ($P< 0.05$) الاحرف الكبيرة للفروق بين الجرع والصغيرة بين اوقات الجرعة.

لا توجد فروق معنوية في مستوى الهرمون لهذه الجرعة مع مرور الاوقات (2، 6، 12) ساعة من الحقن لمستوى المعنوية ($P>0.05$). اما في مقدار الجرعة 20 ميكروغرام/كغم، فكان مستوى الهرمون 0.21±0.62 mIU/ mL بعد مرور 2 ساعة على الحقن، وبلغ 0.43±0.95 mIU/mL بعد مرور 6 ساعات من الحقن وعند الوقت 12 ساعة ارتفع ليبلغ 0.47±2.21 mIU/ mL.

لا توجد فروق معنوية في مستوى الهرمون لهذه الجرعة مع مرور الوقت (2، 6، 12) ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية ($P>0.05$). وعند استخدام مقدار الجرعة 30 ميكروغرام/كغم بلغ مستوى الهرمون 1.73 ± 0.20 mIU/ mL بعد 2 ساعة من الحقن. وبعد مرور 6 ساعات من الحقن كان مستوى الهرمون قد ارتفع ليبلغ 2.98± 1.10 mIU/mL والى 5.22± 0.77 mIU/ mL بعد 12 ساعة. أظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية لهذه الجرعة في مستوى الهرمون بين الوقتين 2 و12 ساعة وبين الوقتين 6 و12 ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية ($P<0.05$). وكانت هناك فروقات معنوية في مستويات هرمون LH بين الجرع مع مرور الوقت بعد الحقن بين مستواه في الجرعة10 و30 ميكروغرام/كغم عند الاوقات (2، 6، 12) ساعة على التوالي وايضا بين مستواه في الجرعة 20 و30 ميكروغرام/كغم عند الوقت 6 ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية ($P<0.05$).

جدول (5): تأثير مقدار الجرع (10، 20، 30) من الخليط هرمون LHRH –A2 مع 5 ملغم/كغم من (DOM) في مستوى هرمون LH في دم اسماك *C. carpio* بعد 2، 6، 12 ساعة من الحقن

الوقت (ساعة) / مقدار الجرعة	LH (mIU/mL)		
	2	6	12
10	0.43±0.32 aA	0.95 ±0.40 aA	1.64± 0.83 aA
20	0.62 ±0.21 aAB	0.95 ±0.43 aA	2.21 ±0.47 aAB
30	1.73 ±0.20 aB	2.98±1.105 abB	5.22 ±0.77 cB

تمثل الارقام المعدل ± الانحراف القياسي

الأحرف المختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية ($P< 0.05$) الاحرف الكبيرة للفروق بين الجرع والصغيرة بين اوقات الجرعة.

استعمل مستخلص الغدة النخامية بجرعة مقدارها 3 ملغم/ كغم وقيس مستوى هرمون FSH في بلازما دم الاسماك للأوقات (2، 6، 8) ساعة بعد الحقن الموضحة في الجدول رقم (6). إذ بلغ مستوى هرمونFSH 0.014±0.064 mIU/ mL بعد ساعتين من الحقن، وارتفع الى 0.533± 0.428 mIU /mL بعد 6 ساعات، وارتفع اكثر بعد 8 ساعات من الحقن ليصل الى 1.074± 0.33 mIU/mL، سجلت فروق معنوية ($P<0.05$) في مستوى الهرمون بعد الاوقات 2 و 6 و 8 ساعة.

اما عند استخدام الجرعة 4 ملغم/ كغم من مستخلص الغدة النخامية قيس مستوى هرمون FSH في بلازما دم الاسماك للأوقات (2، 6، 8) ساعة بعد الحقن (جدول، 5) فقد كان مستوى الهرمون 0.68 ± 0.219 mIU /mL بعد مرور ساعتين على الحقن وسجل ارتفاع تدريجي في مستوى الهرمون ليصل الى 0.306±0.965 mIU/ mL بعد 6 ساعات على الحقن، بينما ارتفع الى 1.636 ± 0.825 mL mIU/ بعد مرور 8 ساعات من الحقن.

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية لهذه الجرعة في مستوى الهرمون بين الوقت 2 و 6 و12 ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية ($P<0.05$)، لم تسجل فروق معنوية بين الجرعتين 3 و4 ملغم/كغم مع مرور الوقت بعد الحقن، بالرغم من ان مستوى الهرمون FSH كان اعلى في الجرعة 4 ملغم/ كغم عند الاوقات 2 و 6 و 8 ساعة بعد الحقن عما هو عليه الحال في الجرعة 3 ملغم/كغم.

جدول (6): تأثير مقدار الجرع 3 و4 ملغم/كغم من مستخلص الغدة النخامية على مستوى هرمون FSH في بلازما دم اسماك *C . carpio.* بعد 2، 6، 8 ساعة على الحقن

الوقت بعد الحقن (ساعة)	FSH (mIU/mL)		
	2	6	8
مستوى الهرمون جرعة 3 ملغم	0.548 ± 0.244 a	0.533 ± 0.428 B	1.074 ± 0.336 c
مستوى الهرمون جرعة 4 ملغم	0.219 ± 0.688 a	0.306 ±0.965 B	0.825 ±1.636 c

تمثل الارقام المعدل ± الانحراف القياسي. الأحرف المختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية (P< 0.05).

أظهر مستوى هرمون LH في بلازما دم الاسماك اختلافاً واضحا عند استخدام مقادير جرع مختلفة من مستخلص الغدة النخامية في الاوقات (8،6،2) ساعة بعد الحقن (جدول، 7)، إذ بلغ مستوى الهرمون 0.41±1.52 mIU/ mL بعد مرور ساعتين على الحقن بجرعة مقدارها3 ملغم/كغم وارتفع هذا المستوى ليصل الى 1.37±8.57 بعد مرور 6 ساعات على الحقن. وعند الوقت 8 ساعة بعد الحقن كان 1.51±20.73 mIU/ mL. واشارت نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروق معنوية في مستويات الهرمون عند الوقت 2، 6 و 8 ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية (P<0.05). اما عند استخدام الجرعة 4 ملغم/كغم من مستخلص الغدة النخامية فقد كان مستوى الهرمون 0.99±2.84 mIU/ mL بعد مرور ساعتين على الحقن وبلغ 13.202±20.85 mIU/ mL بعد 6 ساعات على الحقن ليصل الى اعلى مستوى 12.59±34.51 mIU/ mL بعد 8 ساعات على الحقن. واظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية لهذه الجرعة في مستوى الهرمون بين الوقت2 و6 و8 ساعة بعد الحقن لمستوى المعنوية (P<0.05).

جدول (7): تأثير مقدار الجرعة 3 و4 ملغم/كغم من مستخلص الغدة النخامية في مستوى هرمون LH في دم اسماك *C. carpio* بعد 2، 6، 8 ساعة على الحقن

الوقت بعد الحقن (ساعة)	LH (mIU/mL)		
	2	6	8
مستوى الهرمون جرعة 3	0.41 ±1.52 a	1.37 ± 8.57 B	1.51 ±20.73 C
مستوى الهرمون جرعة 4	0.99 ± 2.84 a	13.202±20.85 B	12.59 ±34.51 C

تمثل الارقام المعدل ± الانحراف القياسي، الأحرف المختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية (P< 0.05).

المناقشة

اظهرت نتائج الدراسة الحالية أَنَّ مستويات هرمونات GtH منخفضة عند استخدام هرمونLHRH-A2 بمقادير جرع (10، 20، 30) ميكروغرام/كغم في اسماك الكارب ولم يحفز الاسماك على الاباضة وهذه النتيجة مماثلة لنتائج عدد من الدراسات، منها الدراسة التي اجراها Wen&Lin (2004)، التي تحرت تأثير المعاملات المختلفةِ من الهورمونِات على مستوى هرموناتGtH والاباضة، في محاولةِ لتَطوير طريقة موثوقة في إحداث الاباضة في أسماك القط *Silurus asotus*، حيث اتفقت النَتائِج مع السمك الذهبي واسماك loach الصيني *Paramisgurnus dabryanus*، أما في إناث السمك الذهبي فإنَّ حُقَنَةً مفردةً أَو حقنتين بفارق 12 ساعة مِنْ هرمون LHRH -A كلٌّ على حِدة، قد زادا في مستوى هرمونات GtH، لكن لَمْ يصل الى المستوى الذي يُحفّزْ البيض للوصول الى مرحلة النضج النهائي أَو الاباضة (Chang & Peter, 1983)، بينما حقن هرمون LHRH -A وحده زادَ مستويات GtH و لم يكن مؤثّراً نسبيا لإحداث الاباضة بنسبةِ 25% في السمك الذهبي (Sokolowska *et al*., 1984). وقد وجد ان استخدام جرعة مقدارها 10 ميكروغرام/كغم مِنْ هرمون LHRH-A وحده في اسماك loach الصيني، حفّزتْ زيادةً في مستوىGtH، لكن أخفقَت في إحداث الإباضة (Lin *et al*., 1986,1985). ذكر Lin *etal*. (1988) أنَّ حقن هرمون LHRH- A أَو sGnRH وحده كَانَ غير مؤثّرَ في إحداث الاباضة في أسماك الكارب. وأشار Tan-Fermin *et al*. (1997) الى أَنَّ الحقن بجرعة مقدارها 50 ميكروغرام/كغم مِنْ هرمون LHRH -A لَمْ تحدث الاباضة بأي مرحلة من مراحل الدورةِ التكاثرية في اسماك القط *Clarias macrocephalus*، وإن حقنة مفردة من هرمون LHRH- A بجرعة مقدارها50 ميكروغرام/كغم لَمْ تُحدث الاباضة في سمكة القط الآسيوي *Clarias batrachus*، وقد يكون ذلك بسبب التأثيرُ التثبيطي القويُ الذاتي النشوء للدوبامينِ الذي يُقاومُ قدرةَ الهرمون المستعمل من مصدر خارجي لزيَاْدَة إطلاقِ هرمون LH ولذلك يُخفقُ السمكُ في الاباضة (Yaron, 1995). وذكر Lin and Peter (1996) أَنَّ مستوى هرمون LH في الدم يبقى منخفضاً لأسماك العينة الضابطة وللأسماك التي فشلت في الاباضة والتسرئ. لكن على الرغم من هذه النتائج السابقة الذكر وُجِدَ أَنَّ هرمون LHRH -A كَان فعّالاً لحثِّ اسماك من عائلة Cyprinidae على الاباضة وخصوصا في أسماك الكارب الفضّيِ *Hypophthalichthys molitrix* والكارب كبير الرأس *Aristichthys nobilis* وتصل نسبةِ الاباضة إلى100% (Ngamvongchon *et al*., 1988). أما في أسماك القط (Siluriformes) فان مستوىGtH وحدوث الاباضة كان متفاوتاً بين الأفراد والانواع المختلفة. في اسماك السلورِ الأوروبي *Silurusglanis* حفّزت الاباضةَ عند معاملتها بجرعة مقدارها20 ميكروغرام/كغم مِنْ هرمون LHRH-A وبلغت بنسبةِ الاباضة 100% (Brzuska and Adamek, 1999).

فضلاً عن ذلك وُجِدَ أَنَّ حقنة وحيدة من هرمون LHRH- A أحدثت الاباضة خلال 16–18 ساعة بمعدّل إبـاضة بلغ 70% في اسماك القط *Clarias macrocephalus* (Ngamvongchon *et al.*, 1988).

بينت دراسة Koohilai *et al.* (2010) أنَّ افضل مقدار جرع من هرمون LHRH-A2 الذي تم استخدامه مع اسماك *Abramis brama* تراوحت بين1–4 ميكروغرام/كغم، واعتمدت هذه الدراسة على مستوى هرمون GtH II (LH) في تحديد الجرعة المثالية وذكرت الدراسة أَنَّ الابحاث السابقة كانت تحدد الجرع المثالية عن طريق نضج البيض والاباضة وطرح السرئ. أمّا في هذه الطريقة فإن تركيز هرمون GtH II (LH) المحرك للنضج هو المهم، وهو الذي يجب أنْ يقاس لتمييز الجرعة المؤثرة سواء كانت منفردة ام مركبة مع مواد اخرى ولذلك فإن الزيادة في مستوى GtH II (LH) يعني تحرك النضج بشكل اكبر.

وكانت النتائج التي حصل عليها أن جميع التراكيب في عملية التحفيز أدت إلى زيادة في مستوى GtH-II، و إن الجرعة الأمثل من هرمون LHRH-A2 كانت 3 ميكروغرام/كغم بلغ عندها مستوى هرمون GtH-II 0.554 وحدة دولية/لتر، وعند استخدام ميتوكلوبراميد 5 ملغم/كغم تسبب في ارتفاع مستوى GtH-II بمقدار0.618 وحدة دولية/لتر، وأيضا الكلوربرومازين10 ملغم/كغم كان مستوى هرمون-IIGtHبمقدار 0.522 وحدة دولية/لتر.

بينت نتائج الدراسة الحالية أَنَّ جميع الاسماك التي عوملت بمستخلص الغدة النخامية بمقادير جرع 3 و4 ملغم/كغم، قد تمت فيها الاباضة والوضع وكانت نسبة الوضع 100% لكلتا الجرعتين وان وقت اخذ البيض كان 9 ساعات بعد الحقنة الثانية للجرعة 3 ملغم/كغم، في حين كان 8 ساعات للجرعة 4 ملغم/كغم .ويظهر من خلال النتائج ان لتركيز هرمونLH (GtH II) تأثيرا واضحاً على نسب الاباضة والوضع إذ سجل أعلى مستوى (12.59±34.51) mIU/ mL عند استخدام مستخلص الغدة النخامية بجرعة مقدارها 4 ملغم/كغم، وفي مقدار الجرعة 3 ملغم/كغم بلغ مستوى هرمونLH 20.73 ±1.51 mIU/ mL ويعتبر مرتفعاً ايضا، لكنه كان منخفضاً بصورة كبيرة عند استخدام هرمون LHRH-A2 وحده او مركب مع مضاد الدوبامين، ولم يؤثر الهرمون في رفع مستويات هرمون LH ما أدى الى إباضة الاسماك. ذكر Ahmadnezhad *et al.* (2013) أَنَّ التفسير المحتمل لهذا الاختلاف بين المجاميع، هو أَنَّ هرمون LHRH–A2 الصناعي لم يكن قادراً على تحفِيز الاندفاع الحقيقي لهرموناتGtH لإحداث الاباضة، والعوامل البيئية الاخرى مثل درجة الحرارة والفترة الضوئية، تعمل على توفير اشارات ضرورية تكون محسوسة من قبل النظام العصبي المركزي لبدء عمليات تطور الخلايا البيضية.

شكر وتقدير

أتوجه بالشكر والتقدير الى قسم الفقريات البحرية والى كادر مفقس مركز علوم البحار للمساعدة في انجاز البحث

المصـــادر

Ahmadnezhad, M.; Oryan, S.; Sahafi, H.H. and Khara, H. (2013). Effect of Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH-A2) Plus Pimozide and Chlorpromazine on Ovarian Development and Levels of Gonad Steroid Hormones in Female Kutum *Rutilus frisiikutum* .Turk. J. Fish. Aquat. Sci., 13: 95-100

Akcay, E.; Bozkurt, S. and Tekun, N. (2004). Cryopreservation of mirror carp semen. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 28: 837-843.

Arabaci, M.; Cegirgan, H. and Sari, M. (2004). Induction of ovulation in ornamental common carp (Koi, *Cyprinus carpio* L.) using LHRHa ([D-Ser (tBu 6), Pro9-Net]- LHRH) combined with haloperidol and carp pituitary extract.Aquac. Res., 35: 10-14.

Brzuska, E. (2004). Artificial spawning of carp *Cyprinus carpio* L. differences between the effects of reproduction in females of Hungarian, Polish and French origin treated with carp pituitary homogenate or [d-Tle6, ProNHEt9] GnRH (Lecirelin). Aquacult .Res., 35: 1318-1327.

Brzuska, E. and Adamek, J. (1999). Artificial spawning of European catfish, *Silurus glanis* L.: Stimulation of ovulation using LHRH-a, Ovaprim and carp pituitary extract. Aquacult. Res., 30(1): 59-64.

Chang, J.P. and Peter, R.E. (1983). Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish. Neuroendocrinology, 36: 351-357.

Donaldson, E.M. and Hunter, G.A. (1983). Induced final maturation, ovulation and spermation in cultured fish. In: Hoar, W. S. Rondall, D. J. and Donalson, E. M. (Eds.). Fish Physiology. Vol. IX, Part B: Reproduction. Academic Press, Orlando, Florida, pp: 351-403.

Goos, H.J. Th.; Joy, K.P.; De Leeuw, R.; Van Oordt, P. G. W. J.; VanDelft, A. M. L. and Gielen, J. T. (1987). The effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa) in combination with deferent drugs with ant dopamine and anti-serotonin properties on gonadotropin release and ovulation in the African catfish, *Clarias gariepinus*. Aquaculture. 63:143-156.

Koohilai, S.; Oryan, Sh. and Hosseinzadeh Sahafi, H. (2010).The study of LHRHa2, Metoclopramide and Chlorpromazine's optimum dose, by measurment of GTH II plasma in female bream *Abramis brama*

orientalis (Berg, 1905). Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Resources) 63(1): 37-29.

Lam, T.J. (1982). Applications of endocrinology to fish culture. Can .J .Fish. Aquat. Sci., 39: 11-137.

Lam, T.J. (1983). Environmental influences on gonadal activity in fish. In Hoar, W.S.; Randall, D.J. and Donaldson, E. M. (Eds.).Fish Physiology. Academic Press, London. pp: 65-116.

Li, M.D. and Ford, J.J. (1998). A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of thea- andb-subunits of glycoprotein hormone gene family. J. Endocrinol., 156: 529-542.

Lin, H.R.; Peng, C.; Lu, L.Z.; Zhou, X.J.; Van Der Kraa, G. and Peter, R.E. (1985). Induction of ovulation in the loach (Paramisgurnus dabryanus) using pimozide and [D-Ala6, Pro9-Nethylamide]-LHRH. Aquaculture 46, 333-340.

Lin, H. R.; Peng, C.;Van Der; Kraak, G.; Peter, R. E. and Breton, B. (1986). E ¡ ect s o f [D-Ala6, Pro9-N-ethylamide]-LHRH and catecholaminergic drµgs on gonadtropin secretion and ovulation in the Chinese loach (Paramisgurnus dabryanus). General and Comparative Endocrinology 64:389-395

Lin, H. R.; Van Dcr Kraak, G.; Zhou, X. J.; Liang, J. Y.; Peter, R. E.; Rivier, J. E. and Vale, W. W. (1988). Effects of [D-Arg6, Trp7, Leu8, Pro9-NEt]-luteinizinghormone-releasing hormone (sGnRH-A) and [Dal a6Pro9-NEt]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRHA), in combination with pimozide ordomperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese bach and common carp. Gen. Comp. Endocrinology, 69: 31-40.

Lin, H.R. and Peter, R.E. (1996). Hormones and spawning in fish. Asian Fisheries Sci., 9: 21-23.

Mikolajczyk ,T.; Chyb, J.; Szczerbik, P.; Sokolowska-Mikolajczyk, M.; Epler , P.; Enright, W.J.; Filipiak, M. and Breton, B. (2004). Evaluation of the potency of azagly-nafarelin (GnRH analogue), administered in combination with different formulations of pimozide, on LH secretion, ovulation and egg quality in common carp Cyprinus carpio L. under laborator y, commercial hatchery and natural conditions. Aquaculture, 234: 447-460.

Ngamvongchon, S. O.; Pawaputanon, W.; Leelapatra, and Johnson, W.E. (1988). Effectiveness of LHRH analogous for the induced spawning of carp and catfish in Northeast Thailand.Aquaculture, 74: 35 -40.

Park, I. S.; Chung, E. Y. and Hong, K. P. (1997). Hormonal induction of ovulation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. J. Aquaculture, 10: 485-486.

Park, I.S.; Kim, H.B.; Choi, H.J.; Lee, Y.D. and Kang, H.W. (1994). Artificial induction of spawning by human chorionic gonadotropin (HCG) or carp pituitary extract (CPE) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Aquaculture, 7: 89-96.

Peter, R.E. (1982).Neuroendocrine control of repro duction in teleosts. Canad. J. Fish. Aqua. Sci. 39: 48-55.

Peter, R.E. and Yu, K.L. (1997). Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. Rev. Fish Biol. Fish., 7:173-197.

Peter, R.E.; Trudeau, V.L. and Sloley, B.D. (1991). Brain regulation of reproduction in teleosts. Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica, 16, 89-118.

Peter, R.E.; Lin, H.R. and Van Der Kraak, G. (1988). Induced ovulation and spawning in cultured fresh water fish in China: advanced in applicationof GnRH analogue and dopamine antagonists. Aquaculture, 74: 1-10.

Sokolowska, M.; Peter, R.E. ; Nahomiak, C.S. ; Pan, C.H.; Chang, J.P.; Grim, L.W. and Weil, C. (1984). Induction of ovulation in goldfish, Carassius auratus, by pimozide and analogues of LHRH. Aquaculture, 36: 71-83.

Tan-Fermin, J.D., Pagador, R.R. and Chavez, R.C. (1997). LHRHa and pimozide-induced spawning of Asian catfish Clarias macrocephalus (Günther) at different time during an annual reproductive cycle. Aquaculture, 148: 323-331.

Wen, H.Sh. and Lin, H.R. (2004). Effects of exogenous neuro hormone, gonadotropin (GTH) and dopaminergic drugs on the serum GTH content and ovulatory responsiveness of wild catfish, *Silurus asotus* (Linnaeus, 1758). Aquaculture Research, 35: 204-212.

Wistom, G.B. (1976). Enzyme Immuno Assay. clin. chem. 22 : 1243-1245.

Yaron, Z. (1995). Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. Aquaculture 129: 49-73.

The effect of hormone type and amount of dose on gonadotropin hormones levels in blood plasma of common carp *(Cyprinus carpio)* during artificial spawning processes

Faleh, M. Al Zaidy , Sajed S. Al-Noor* and Basem M. Jasim*

Dept. of Marine Vertebrate/ Marin Science Center/ Basra University, Basra, Iraq.
*Dept. of Fisheries and Marin resources/ Agriculture College/ Basra University, Basra, Iraq

Abstract

The study included the utilization of three types of hormones, i.e. LHRH-A2 with dosages of 10, 20 or 30 µg / kg, a mixture of LHRH-A2 with dosages of 10, 20, and 30 µg / kg with Domperidone (DOM) at 5 mg / kg and carp pituitary gland extract (CPE) at 3 and 4 mg / kg, in order to study the effect of hormone type and used dosage on the level of gonadotropins secreted from the pituitary gland of the common carp *Cyprinus carpio* L. females during the artificial fertilization. Concentrations of GTHs (FSH and LH) were measured using ELISA kit on blood samples collected from fish caudal peduncle after 2, 6 and 12 hours of injection with LHRH-A2 and hormone mixture or 2, 6 and 8 hours for fish treated with CPE .Results showed that GTHs levels were low in fish treated with LHRH-A2 for all the utilized dosages LH (4.66 ± 1.27 mIU / mL) or LHRH-A2+ DOM LH (5.22 ± 0.77 mIU / mL). In contrast, GTHs levels in fish treated with CPE at 3 and 4 mg / kg were higher and levels of FSH and LH were higher with 4 mg / kg LH (34.51 ±12.59 mIU/mL) than it with 3 mg / kg,

Key words: Gonadotropin Hormon, Common carp, LHRH-A2, pituitary gland extract.