

پاسخ های هورمونی طی استرس حاد و مزمن مواجهه با بنزوآلفاپایرن در ماهی شانک زردباله،

Acanthopagrus latus

سارا رستگار و عبدالعلی موحدی نیا*

۱. دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، گروه بیولوژی دریا.
۲. پژوهشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر.

* نویسنده مسئول: amovahedinia@yahoo.com

چکیده:

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تاثیر بنزوآلفا پایرن (BaP) به عنوان یکی از مهم ترین هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs) بر سطوح پلاسمایی هورمون های کورتیزول و تری یدوتیرونین (T_3) در جنس نر ماهیان شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) صورت گرفت. بدین منظور و برای بررسی اثرات کوتاه مدت بنزوآلفاپایرن، به یک گروه از ماهیان بنزوآلفاپایرن محلول در روغن گیاهی (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۲ میکرولیتر بر گرم روغن به ازای وزن بدن) به صورت درون صفاقی تزریق شد و به گروه شاهد 2 میکرولیتر بر گرم به ازای وزن بدن روغن گیاهی به تنهایی تزریق شد. از هر دو گروه پس از ۳ ساعت نمونه خون تهیه شد. برای بررسی اثرات دراز مدت، ایمپلنت ۱۰ میکرولیتر بر گرم روغن گیاهی حاوی ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بنزوآلفاپایرن به ازای وزن بدن انجام گرفت. برای ماهیان شاهد ایمپلنت درون صفاقی با روغن به میزان ۱۰ میکرولیتر بر گرم انجام و پس از ۷۲ ساعت نمونه گیری صورت گرفت. بر اساس نتایج سطوح پلاسمایی کورتیزول در شانک زرد باله هم در استرس کوتاه مدت و هم در بلند مدت مواجهه با BaP افزایش یافت. در حالیکه سطوح هورمون T_3 تنها پس از استرس مزمن کاهش معنی داری را نشان داد. به نظر می رسد افزایش کورتیزول پاسخی سازشی به نیاز بیشتر به انرژی باشد، زیرا کورتیزول با افزایش فرایند گلیکونئوژنز موجب افزایش قند در دسترس سلول ها برای تامین انرژی مورد نیاز می شود. کاهش T_3 احتمالاً به علت فعال شدن رسپتورهای آریل هیدروکربن تحت تاثیر BaP و اثر باز دارندگی آنها بر این هورمون بوده است.

واژه های کلیدی: هیدروکربن آروماتیک چندحلقه ای، اکوفیزیولوژی، کورتیزول، تری یدوتیرونین.

۱. مقدمه

هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی (PAHs) از جمله مهمترین مواد سمی و پایدار در اکوسیستم‌های آبی می‌باشند، که در نتیجه تولیدات نفتی به دریا آزاد می‌شوند. این آلاینده‌های آلی در همه اکوسیستم‌های آبی یافت می‌شوند (Leonard and Hellou, 2001).

این ترکیبات می‌توانند اثرات مخربی بر سیستم‌های بیولوژیکی بگذارند، برخی از این اثرات شامل جهش زایی و سرطانی‌زایی (Malins et al., 1987) و اثرات ژنوتوکسیک (Pacheco and Santos, 2001) در ماهیان تایید شده است. PAHها و سایر آلاینده‌های آلی علاوه بر اثرات سمی در سطح سلول و بافت موجب ایجاد پاسخ‌های جامعی در جمعیت‌های ماهیان می‌شوند (Wendelaar Bonga, 1997).

به نظر می‌رسد تعدادی از PAHها می‌توانند با سیستم درون ریز در ماهیان بر هم کنش داشته و به دلیل شباهت با هورمون‌ها و یا با بلوکه کردن رسپتورهای هورمونی در وظایف اندوکرینی و ترشح هورمون‌ها اختلال ایجاد کنند (Navas et al., Hontela, 1997, 2004). این مواد شیمیایی همچنین می‌توانند موجب اختلال در وظایف محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-اینترنال (HPI) و محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تیروئید (HPT) شوند (Brar et al., 2010). PAHها سبب فعال شدن رسپتورهای آریل هیدروکربن (AhR) در ماهیان می‌شوند، این فعال شدن با محدوده وسیعی از واکنش‌های آگونیستیک و آنتاگونیستیک از قبیل تاثیر بر رسپتورهای بافت هدف، تغییر در مسیرهای سنتز هورمون‌های تیروئیدی و یزدایی از بافت‌ها همراه است، که نتیجه آن اختلالاتی در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تیروئید (HPT) می‌باشد (Teles et Crofton, 2008, 2005). فعال شدن AhR با تغییر در بیوسنتز استروئیدها، تنظیمات فیدبکی آنها و همچنین حساسیت زدایی و اختلال در ترشح هورمون آدرنوکورتیکوتروپین (ACTH) و سایر مکانیسم‌های دخیل در پاسخ به استرس، محور هیپوتالاموس-

هیپوفیز-اینترنال (HPI) را دچار آشفتگی می‌کند (Tintos et al., 2007; Hontela, 2005; Wilson et al., 1998; Tintos et al., 2008) فیزیولوژیک مرتبط با تحریک ترشح کورتیزول نقش مهمی را در مقاومت موجود در شرایط استرس بر عهده دارند (Vijayan et al., 1997).

ماهی شانک زردباله از خانواده sparidae هم‌افروودیت و پروتاندروس (Abu-Hakima, 1984)، ساکن نواحی ساحلی آب‌های اقیانوس آرام و هند و دارای اهمیت اقتصادی و تجاری (Hussain and Abdullah, 2011) می‌باشد. به منظور ارزیابی اثرات اکوفیزیولوژیک PAHها در ماهیان، در این مطالعه اثرات کوتاه مدت (۳ ساعت) و بلند مدت (۷۲ ساعت) بنزوالفاپایرن بر سطوح پلاسمایی هورمون کورتیزول و تری‌یدوتیرونین (T_3) در ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) بررسی شده است.

۲. مواد و روش‌ها

ماهیان شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) مورد استفاده برای این مطالعه از منطقه خور موسی واقع در حاشیه شمالی خلیج فارس (ایران) با استفاده از قلاب صید و به مرکز تحقیقات ماهیان دریایی بندر امام خمینی منتقل شدند. سپس تعداد ۴۰ ماهی نر شانک زردباله (میانگین وزنی 7.28 ± 1.56) به تانک های ۳۰۰ لیتری منتقل و به مدت ۲ هفته جهت سازگاری با شرایط نوری و دمایی جدید نگهداری گردیدند و تا ۲۴ ساعت قبل از مواجهه با BaP، به مقدار ۱٪ وزن بدن غذادهی شدند.

۲۴ عدد ماهی به سه گروه پایه، شاهد و تیمار در تانک‌های ۳۰۰ لیتری مجزا تقسیم شدند. قبل از تزریق، ماهیان با استفاده از محلول ۲-فنوکسی اتانول (۲٪ درصد) بیهوش و وزن شدند. به گروه تیمار مقدار 50 mg/kg بنزوالفاپایرن محلول در $2 \mu\text{l/g}$ روغن آفتابگردان به ازای وزن بدن بصورت داخل صفاقی تزریق شد. به گروه شاهد تنها $2 \mu\text{l/g}$ روغن آفتابگردان به ازای وزن بدن تزریق گردید. در مورد

یکطرفه (One-way ANOVA) استفاده شد، جهت مقایسات چندگانه پس آزمون Student-Newman-Keuls به عمل آمد. مقایسه هورمون T3 در دو گروه شاهد و تیمار با آزمون t-test انجام گرفت. ضریب اطمینان در هر دو آزمون ۰/۹۵ ($p \leq ۰/۰۵$) است. در تحلیل داده‌ها و رسم نمودار از نرم افزار Sigma plot ver.11 استفاده شد.

۳. نتایج

در طی دوره آزمایش هیچ گونه رفتار غیر عادی در شنا و حرکات و همچنین مرگ و میری در ماهیان دیده نشد. در بررسی استرس مواجهه حاد و مزمن با بنزوالفاپایرین، سطوح کورتیزول پلاسما در گروه های پایه (بدون تزریق)، شاهد (تزریق یا ایمپلنت شده تنها با روغن گیاهی) و تیمار (تزریق یا ایمپلنت بنزوالفاپایرین محلول در روغن گیاهی) با یکدیگر اختلاف معنی داری نشان دادند. بدین صورت که سطوح کورتیزول در نمونه‌های گروه تیمار نسبت به هر دو گروه شاهد و پایه افزایش معنی داری را نشان داد. همچنین میزان کورتیزول پلاسما در گروه شاهد که مورد تزریق روغن قرار گرفته بود نسبت به گروه پایه بیشتر بود (شکل ۱).

در بررسی استرس مواجهه حاد با بنزوالفاپایرین در مقدار تری یدوتیرونین پلاسما بین دو گروه شاهد و تیمار ۳ ساعت پس از تزریق تغییر معنی داری دیده نشد ($P > ۰/۰۵$). اما در استرس طولانی (۷۲ ساعت پس از ایمپلنت)، سطوح هورمون T₃ کاهش معنی داری بین گروه شاهد و تیمار را نشان داد ($P < ۰/۰۵$)، (شکل ۲).

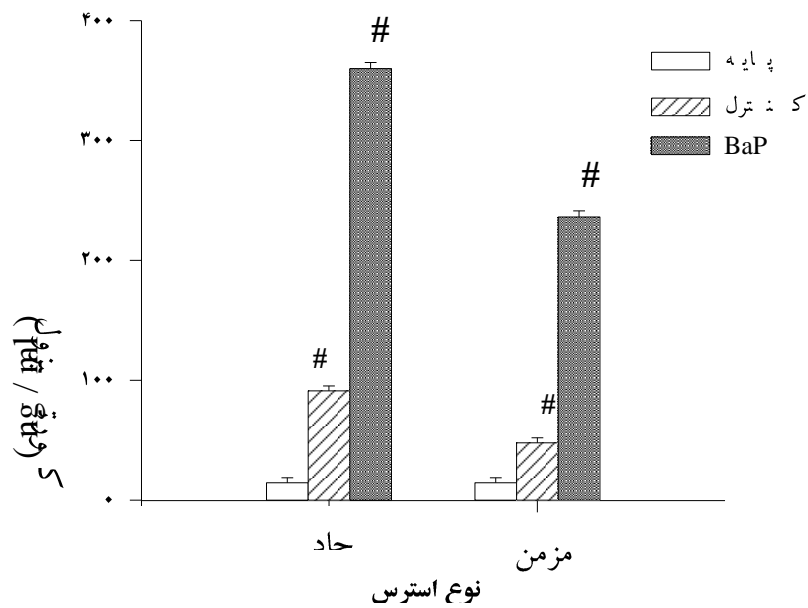
ماهیان گروه پایه به منظور تعیین اثر استرس دستکاری و تزریق، هیچ گونه تزریقی صورت نگرفت. از تمامی این ماهیان، ۳ ساعت پس از تزریق نمونه گیری به عمل آمد.

جهت تشخیص اثرات بلند مدت بنزوالفاپایرین بر سیستم درون ریز، ۱۶ عدد ماهی به دو گروه شاهد و تیمار تقسیم شدند. ماهیان به کمک محلول ۲- فنوکسی اتانول (۰/۲ درصد) بیهوش و توزین شدند؛ در گروه تیمار مقدار ۵۰ mg/kg بنزوالفاپایرین حل شده در ۱۰ μl/g روغن نارگیل به ازای وزن بدن ایمپلنت داخل صفاقی شد. در گروه شاهد تنها از ایمپلنت ۱۰ μl/g روغن نارگیل به ازای وزن بدن استفاده شد. ۳ روز پس از کاشت ایمپلنت نمونه‌گیری از ماهیان صورت گرفت.

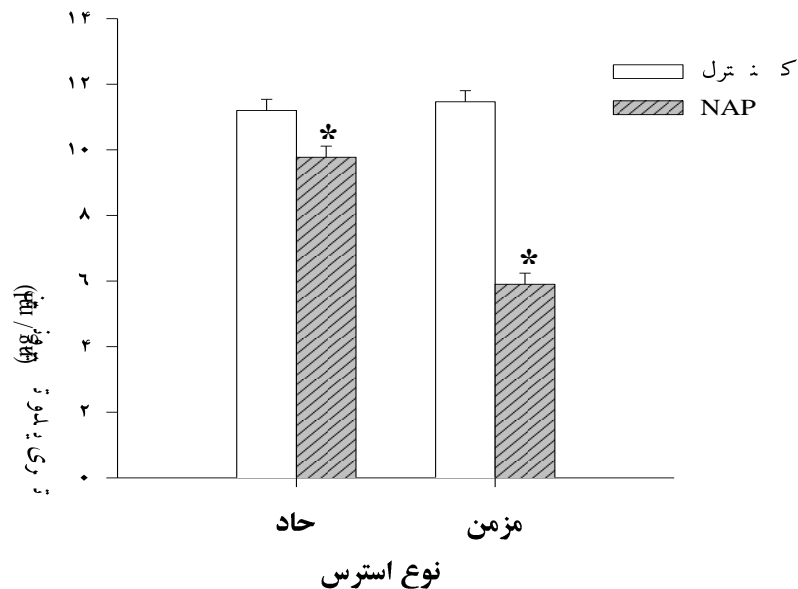
در زمان نمونه گیری با کاهش سطح آب تانک‌ها (تا حدود ۲۰ لیتر) و افزودن ۲- فنوکسی اتانول (جهت ایجاد غلظت ۰/۲ درصد) ماهیان را بیهوش کرده، با استفاده از سرنگ هپارینه، خونگیری از سیاهرگ ساقه دمی انجام و تا پایان خونگیری از سایر ماهیان نمونه‌های خون روی یخ نگهداری شدند. سپس سانتریفیوژ نمونه های خون (۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۶ دقیقه) انجام و پلاسمای بدست آمده پس از انجماد سریع در نیتروژن مایع تا انجام سنجش‌های هورمونی در فریزر ۸۰°C - نگهداری شد.

مقادیر هورمون‌های کورتیزول و تری یدوتیرونین به روش ELISA و به ترتیب با به کار گیری کیت‌های تجاری DIMETRA (ساخت ایتالیا) و Monobind (ساخت فرانسه) اندازه گیری شد. (Barry et al., 1993; Tintos et al., 2006)

برای مقایسه میانگین مقادیر هورمون کورتیزول در سه گروه پایه، شاهد و تیمار از آزمون آنالیز واریانس



شکل ۱- تغییرات سطوح کورتیزول پلاسما پس از تزریق بنزوآلفا پایرن (3hr) گروه پایه: بدون تزریق، گروه شاهد: تزریق درون صفاقی ۲µl/g روغن آفتابگردان به ازای وزن بدن، گروه تیمار تزریق مقدار ۵۰ mg/kg بنزوآلفا پایرن در ۲µl/g روغن آفتابگردان به ازای وزن بدن. گروه پایه: بدون تزریق، گروه شاهد: تزریق درون صفاقی ۱۰µl/g روغن نارگیل به ازای وزن بدن، گروه تیمار تزریق مقدار ۵۰ mg/kg بنزوآلفا پایرن در ۱۰µl/g روغن نارگیل به ازای وزن بدن. داده‌ها بر اساس (mean ± SE) می‌باشد. * اختلاف معنی دار بین گروه پایه و شاهد ($P < 0.05$)، # اختلاف معنی دار بین گروه شاهد و تیمار ($P < 0.05$) را نشان می‌دهد.



شکل ۲- تغییرات سطح تری یدوتیرونین (T3) پس از تیمار با بنزوآلفا پایرن (3hr) گروه شاهد: تزریق داخل صفاقی ۲µl/g روغن آفتابگردان به ازای وزن بدن، گروه تیمار: تزریق مقدار ۵۰ mg/kg بنزوآلفا پایرن در ۲µl/g روغن آفتابگردان به ازای وزن بدن. گروه شاهد: ایمپلنت داخل صفاقی ۱۰µl/g روغن نارگیل به ازای وزن بدن، گروه تیمار: ایمپلنت مقدار ۵۰ mg/kg بنزوآلفا پایرن در ۱۰µl/g روغن نارگیل به ازای وزن بدن. داده‌ها بر اساس (mean ± SE) می‌باشد. * اختلاف معنی دار بین گروه شاهد و تیمار ($P < 0.05$).

۴. بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر نتایج حاکی از آن است که بنزوالفاپایرن موجب افزایش معنی داری در سطوح کورتیزول پلازما در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد و پایه شده است. از آنجایی که در هنگام استرس سطوح پلاسمایی کورتیکواستروئیدها نسبت به کتکول آمین ها به آرامی بالایی رود (Grutter and Pankhurst, 2000)، تغییر در سطوح کورتیزول معیار با ارزشی است که شرایط استرس را به خوبی نشان می دهد. همانگونه که انتظار می رفت استرس ناشی از تزریق و دستکاری نیز سبب افزایش سطوح کورتیزول پلازما شود (Hontela, 1997)، افزایش کورتیزول در گروه پایه نسبت به گروه شاهد نیز مشاهده شد. مطالعه Thomas و همکاران (۱۹۸۰) در مورد کفال راه راه و همچنین مطالعه Tintos و همکاران (۲۰۰۸) در قزل آلای رنگین کمان که پیرامون اثر هیدروکربن های حلقوی بر سطوح کورتیزول پلازما صورت گرفته اند، نتایج این مطالعه را تایید می کنند. البته کاهش کورتیزول پلازما در اثر مواجهه با این آلاینده ها که به دلیل غیرکارآمد شدن محور HPI یا از کار افتادن آنزیم های میتوکندریایی سنتز کورتیزول می باشد، نیز گزارش شده است (Wilson et al., 1998). بنزوالفاپایرن به محض ورود به بدن ماهی سبب فعال کردن رسپتورهای آریل هیدروکربن (AhRs) می شود این رسپتورها با اختلال در بیان ژن های کورتیکوتروپ در هیپوتالاموس سبب فعال شدن بیش از اندازه آنها و به دنبال آن بالا رفتن سطح کورتیزول می شوند (Hinton et al., 1992). بر اساس نتایج، سطوح کورتیزول در استرس مزمن پایین تر از استرس حاد بود که علت آن را می توان به خستگی محور HPI و حساسیت زدایی ACTH نسبت داد (Hontela, 2005).

در این مطالعه کاهش سطوح هورمون T_3 (فرم فعال بیولوژیکی هورمون های تیروئیدی) پس از تیمار با بنزوالفاپایرن مشاهده شد. که با نتایج مطالعه ای اثر آلاینده های آلی نظیر PCB ها و هیدروکربن حلقوی

BNF بر سطوح پلاسمایی T_3 مطابقت داشت (Hontela, 1997; Hood et al., 2003). زنبویوتیک ها با مکانیسم های متعددی روی سطوح هورمون T_3 اثر می گذارند و سبب کاهش آنها می شوند. این مکانیسم ها شامل تاثیر منفی بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تیروئید (Alkindi et al., 1996)، تاثیر بر بیوسنتز و ترشح T_3 (Capen, 1997)، اختلال در عملکرد آنزیم کبدی 5α -مونویدیناز (Waring et al., 1996) و یا اختلال در کاتابولیسم و نرخ رها سازی T_3 (Hontela, 1997) می باشند. بنزوالفاپایرن همچنین سبب تاثیر بر بیان ژن CYP1A1 و گیرنده های آریل هیدروکربن می شود که بیان این ژن ها سبب تغییر در تولید رسپتورهای هورمون های تیروئیدی و آشفتگی در بیان ژن های مربوط به آنها می شود (Brar et al., 2010). دو محور HPT و HPI نقش اساسی را در حفظ هومئوستاز در بدن ماهیان بازی می کنند و هورمون های تیروئیدی و کورتیزول هر دو متابولیسم کربوهیدرات ها را تحت تاثیر قرار می دهند (Hontela, 1997). افزایش کورتیزول سبب تولید بیشتر انرژی و حفظ هومئوستاز در شرایط استرس حاد PAH ها می شود. اما در استرس مزمن (پس از گذشت مدت زمانی از شروع استرس) با وجود بالا بودن کورتیزول، فیدبک ناشی از کاهش هورمون T_3 و خستگی ناشی از آتروفی سلول های ترشح کننده ACTH، ماهی با کمبود انرژی مواجه می شود. استرس شیمیایی بنزوالفاپایرن از طریق آشفتگی در سیستم اندوکربن به صورت غیر مستقیم سبب از بین رفتن شرایط نرمال بدن و به خطر افتادن بقا در ماهیان می شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر در قالب سمینار کارشناسی ارشد مصوب گروه بیولوژی دریا دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انجام شده است. در انجام این پروژه از کمک های محققین و کارشناسان متعددی بویژه جناب آقای دکتر مرتضی بهنام رسولی (استاد دانشگاه فردوسی مشهد)، آقای محمدرضا صحرائیان

Mehrle-Jr, P. (1992). "Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.

Hontela, A. (2005). "Adrenal toxicology: environmental pollutants and the HPI axis." *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 6: 331-363.

Hontela, A. (1997). "Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: role of glucocorticosteroid hormones." *Reviews in Toxicology* 1(5): 1-46.

Hood, A., Allen, M. L., Liu, Y. P., Liu, J. and Klaassen, C. D. (2003). "Induction of T4 UDP-GT activity, serum thyroid stimulating hormone, and thyroid follicular cell proliferation in mice treated with microsomal enzyme inducers." *Toxicology and applied pharmacology* 188(1): 6-13.

Hussain, N. and Abdullah, M. (2011). Length-weight relationship, spawning season and food habits of six commercial fishes in Kuwaiti waters" *Indian Journal of Fisheries* 24(1 & 2): 181-194.

Leonard, J. D. and Hellou, J. (2001). "Separation and characterization of gall bladder bile metabolites from speckled trout, *Salvelinus fontinalis*, exposed to individual polycyclic aromatic compounds." *Environmental toxicology and chemistry* 20(3): 618-623.

Malins, D. C., McCain, B. B., Brown, D. W., Varanasi, U., Krahn, M. M., Myers, M. S. and Chan, S. L. (1987). "Sediment-associated contaminants and liver diseases in bottom-dwelling fish." *Hydrobiologia* 149(1): 67-74.

Navas, J. M., Zanuy, S., Segner, H. and Carrillo, M. (2004). "Beta-Naphthoflavone alters normal plasma levels of vitellogenin, 17 [beta]-estradiol and luteinizing hormone in sea bass broodstock." *Aquatic Toxicology* 67(4): 337-345.

Pacheco, M. and Santos, M. A. (2001). "Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters." *Ecotoxicology and environmental safety* 49(1): 64-75.

Teles, M., Oliveira, M., Pacheco, M. and Santos, M. (2005). "Endocrine and metabolic changes in *Anguilla anguilla* L. following

کارشناس ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) و آقای حسین پاشا زانوسی (عضو هیات علمی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر) استفاده شده است، که بدینوسیله تشکر و قدردانی از ایشان بعمل می آید.

منابع

Alkindi, A., Brown, J., Waring, C. and Collins, J. (1996). "Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil." *Journal of fish biology* 49(6): 1291-1305.

Abu-Hakima, R. (1984). "Some aspects of the reproductive biology of *Acanthopagrus* spp. (Family: Sparidae)." *J. Fish Biol.* 25: 515-526.

Barry, T. P., Lapp, A. F., Kayes, T. B. and Malison, J. A. (1993). "Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*)." *Aquaculture* 117(3-4): 351-363.

Brar, N. K., Waggoner, C., Reyes, J. A., Fairey, R. and Kelley, K. M. (2010). "Evidence for thyroid endocrine disruption in wild fish in San Francisco Bay, California, USA. Relationships to contaminant exposures." *Aquatic Toxicology* 96(3): 203-215.

Capen, C. C. (1997). "Mechanistic data and risk assessment of selected toxic end points of the thyroid gland." *Toxicologic Pathology* 25(1): 39.

Crofton, K. M. (2008). "Thyroid disrupting chemicals: mechanisms and mixtures". *International journal of andrology* 31(2): 209-223.

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* 57(2): 391-401.

Hinton, D., Baumann, P., Gardner, G., Hawkins, W., Hendricks, J., Murchelano, R., Okihira, M., Huggett, R., Kimerle, R. and

bream." *Journal of fish biology*, 68(1): 251-263.

Vijayan, M. M., Feist, G., Otto, D. M. E., Schreck, C. B. and Moon, T. W. (1997). "3, 3', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl affects cortisol dynamics and hepatic function in rainbow trout." *Aquatic Toxicology* 37(2-3): 87-98.

Waring, C., Brown, J., Collins, J. and Prunet, P. (1996). "Plasma prolactin, cortisol, and thyroid responses of the brown trout (*Salmo trutta*) exposed to lethal and sublethal aluminium in acidic soft waters." *General and comparative endocrinology* 102(3): 377-385.

Wendelaar Bonga, S. (1997). "The stress response in fish." *Physiological Reviews* 77(3): 591-625.

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* 157(1): 63.

exposure to [beta]-naphthoflavone--a microsomal enzyme inducer." *Environment international* 31(1): 99-104.

Tintos, A., Gesto, M., Míguez, J. M. and Soengas, J. L. (2008). "Beta-Naphthoflavone and benzo (a) pyrene treatment affect liver intermediary metabolism and plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*." *Ecotoxicology and environmental safety* 69(2): 180-186.

Tintos, A., Gesto, M., Miguez, J. M. and Soengas, J. L. (2007). "Naphthalene treatment alters liver intermediary metabolism and levels of steroid hormones in plasma of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Ecotoxicology and environmental safety* 66(2): 139-147.

Tintos, A., Míguez, J., Mancera, J. and Soengas, J. (2006). Development of a microtitre plate indirect ELISA for measuring cortisol in teleosts, and evaluation of stress responses in rainbow trout and gilthead sea