

تأثیر سطوح مختلف نوکلئوتید جیره بر فعالیت تنظیم اسمزی زواید باب المعدی بچه ماهی آزاد خزر (*Salmo trutta caspius*)

صادق اولاد^۱ صابر خدابنده^{*۱} عبدالمحمد عابدیان^۲

(۱) گروه زیست شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی مازندران، مازندران - ایران.
(۲) گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، مازندران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۹ بهمن ماه ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۲۸ دی ماه ۱۳۸۸)

چکیده

نوکلئوتیدها از جمله ترکیبات داخل سلولی محسوب می شوند و نقش کلیدی در تنظیم تمام پروسه های بیولوژیکی دارند. تأثیر نوکلئوتید افزودنی جیره در ۳ سطح صفر (گروه کنترل)، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد (گروه تیمار)، بر فعالیت زواید باب المعدی (ساک های پیلوریک) در تنظیم اسمزی بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) بود. بدین منظور ماهیان با وزن متوسط ۱۲ گرم (۳۵ قطعه در سه تکرار برای هر تیمار) برای مدت ۸ هفته پرورش داده شدند. در پایان دوره پرورش تعداد ۱۲ قطعه بچه ماهی از هر تیمار با میانگین وزن ۲۶ گرم به شوری ۱۸ گرم در لیتر معرفی گردید. پس از ۷۲ ساعت جهت بررسی حضور و میزان فعالیت ایمنیایی آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ ، به روش بافت شناسی و ایمونوهیستوشیمی، از هر تیمار تعداد ۴ قطعه ماهی صید و در محلول بوئن به مدت ۲۴ ساعت فیکس گردیدند و در ادامه مراحل قالب گیری و برش انجام شد. مکان یابی ایمنیایی آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ (Immunolocalization) در زواید باب المعدی در تیمار صفر و تیمار ۰/۲۵ درصد داشته است. در مجموع آنزیم در نمونه های جیره غذایی نوکلئوتید ۰/۵ درصد افزایش معنی داری ($p < 0.05$) نسبت به تیمار صفر و تیمار ۰/۲۵ درصد داشته است. در مجموع می توان نتیجه گیری کرد که حضور قابل توجه این آنزیم در زواید باب المعدی آزاد ماهی خزر دلالت بر نقش تنظیم اسمزی این زواید داشته و تفاوت حضور آن در تیمارهای مختلف نوکلئوتید نشان می دهد که این ماده افزودنی می تواند با افزایش توان تنظیم یونی بچه ماهیان، نقش مهمی در سازش آنها به شوری ۱۸ گرم در لیتر داشته باشد.

واژه های کلیدی: نوکلئوتید جیره، آزاد ماهی دریای خزر، زواید باب المعدی، تنظیم اسمزی.

گذراندن دوران پر خطر اولیه در رودخانه های منتهی به دریا رهاسازی می شوند.

انتقال از آب شیرین به آب شور یا لب شور در چرخه زندگی آزاد ماهیان (سالمونیده ها) یک دوره بسیار مهم و بحرانی است که در ماهی تغییرات اساسی در رفتار، فیزیولوژی و مرفولوژی ایجاد خواهد کرد (۱۳). این فرایند در طبیعت در آزاد ماهیان وحشی با یک سری تغییرات محیطی همراه است که این انطباق و هماهنگی (طبیعت و تغییرات ماهی) در شرایط پرورشی وجود ندارد. از این رو ماهیان پرورشی در هنگام انتقال به آب شور میزان ظرفیت کمتری در هماهنگی با شرایط جدید دارند. به همین خاطر امروزه اکثر تحقیقات روی بهبود عوامل مؤثر بر فرآیند اسمزی و ظرفیت انتقال یون، از جمله تغییر شرایط محیط پرورشی، تغییرات ژنتیکی و تغذیه مناسب و استفاده از ترکیبات حمایت کننده از فرایند تنظیم اسمزی شبیه بتائین، فین استیم، نمک، ویتامین ها و نوکلئوتیدها متمرکز شده است (۸، ۹).

آبشش ها، پوست، مثانه و مجرای گوارشی نقشی مهم و هماهنگ با کلیه ها، در جهت کنترل مایعات و تنظیم یون های بدن دارند (۱۲). از میان این اندام ها، مجرای گوارشی دارای یک نقش حیاتی در تنظیم آب و وضعیت الکترولیت ها در ماهی می باشد (۳۲). در آزاد ماهیان، دستگاه گوارش محل هضم و جذب غذا، تنظیم یون و تعادل آب و همچنین سدی

مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر با نام علمی *Salmo trutta caspius* از جمله ماهیان بومی و مهاجر (آنادرموس) دریای خزر می باشد که از ارزش غذایی و اقتصادی ویژه ای برخوردار است. این ماهی به طور عمده در جنوب دریای خزر در سواحل ایران وجود داشته و برای تخم ریزی به آب شیرین رودخانه مهاجرت می نماید. با توجه به آلودگی منابع آبی و خصوصاً رودخانه، از بین رفتن زیستگاه ها و مناطق تخم ریزی در رودخانه ها و وجود مشکلات متعددی که بر همگان روشن است بقای نسل برخی گونه های مهاجر خزر، نظیر ماهی آزاد دریای خزر که از ارزش اقتصادی بالایی برخوردارند، به خطر افتاده است.

در شرایط طبیعی (که امروزه بسیار کم صورت می گیرد) مولدین از دریا به این رودخانه ها مهاجرت کرده و عمل تخم ریزی انجام می دهند. نوزاد های به وجود آمده بعد از طی مراحل مختلف رشد و نمو (نوزاد با کیسه زرده = آلووین - بچه ماهی نوری = فرای - پار و اسمولت) به دریای خزر مهاجرت می کنند. یکی از مهمترین تغییرات در طی این مراحل رشد، کسب توان مقابله کردن با شوری ۱۳ گرم در هزار آب دریای خزر می باشد. به منظور بازسازی ذخایر ماهی آزاد دریای خزر تکثیر و پرورش مصنوعی آن در کارگاه تکثیر شیلات واقع در کلاردشت انجام شده و بچه ماهیان پس از



(۱۱). تحقیقات در زمینه تأثیر نوکلئوتید جیره در موجودات مختلف در طی ۳۵ سال اخیر شروع شد که در ابتدا بیشتر تحقیقات در رابطه با امکان تأثیر این مواد به عنوان جاذب غذا انجام می‌شد اما با گزارش Burrells و همکاران (۷، ۸) تحقیقات در این زمینه شکل تازه‌ای به خود گرفت و تا کنون ادامه دارد. با توجه به این تحقیقات نوکلئوتید جیره در بهبود افزایش رشد ماهیان، توسعه میکروفلور روده (۴)، افزایش سطح جذب دستگاه گوارش ماهی (۷)، امکان افزایش توانایی در تنظیم اسمزی ماهی (۸) نقش ایفا می‌کنند. اخیراً استفاده از نوکلئوتید در جیره غذایی بچه ماهیان آزاد خزر مبین اثرات مثبت آن در افزایش راندمان رشد بوده است (۳۶). در این راستا تحقیق حاضر با هدف پی بردن به نقش نوکلئوتیدها در زواید باب‌المعدی در افزایش قدرت مقابله بچه ماهیان با شوری انجام گردید.

مواد و روش کار

شرایط نگهداری ماهیان: این آزمایش در بهار سال ۸۷ در کارگاه تحقیقات آبریان دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. برای این کار ابتدا با توجه به آزمایش‌های معتبر انجام شده در دنیا مبنی بر استفاده از مکمل حاوی نوکلئوتید که دارای استانداردهای لازم برای انجام کارهای تحقیقاتی است، مکمل اپتیمون (کمفورم اوگست سوئیس) با درصد خلوص ۱۷/۳ درصد، حاوی: (سیتیدین-۵-مونوفوسفات، دی سدیم اوریدین-۵-مونوفوسفات، آدنوزین-۵-مونوفوسفات، دی سدیم اینوزین-۵-مونوفوسفات، دی سدیم گوانین-۵-مونوفوسفات)، انتخاب و از طریق نمایندگی این شرکت در ایران (شرکت توران تو) خریداری گردید. بچه ماهیان آزاد دریای خزر با میانگین وزنی ۱۲ گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهید باهنر کلاردشت پس از طی عملیات رقم‌بندی تهیه شدند. قبل از ذخیره‌سازی، تانک‌ها به وسیله مواد ضد عفونی نظیر هیپو کلریت سدیم کاملاً ضد عفونی، سپس با آب شستشو داده شدند. ماهیان نیز ابتدا با محلول نمک ۴ درصد ضد عفونی و سپس در داخل تانک‌های ۰/۳ متر مکعبی (آبگیری ۲۵۰ لیتر) به تعداد ۳۵ عدد در هر تانک قرار گرفتند. ماهیان بعد از ۲۴ ساعت گرسنگی به دلیل حمل و نقل، به مدت یک هفته با جیره کنترل (حاوی پودر ماهی با محتوای پروتئین حدود ۵۰ درصد، چربی ۱۷ درصد، رطوبت ۱۲/۵ درصد، خاکستر ۱۰ درصد، کربوهیدرات ۹/۵ درصد) به منظور سازگاری تغذیه شدند. سپس با توجه به تیمارهای تعیین شده، مکمل اپتیمون خریداری شده به صورت ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد به جیره ساخته شده اضافه گردید. تیمار سوم صفر درصد هم به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. جیره ماهیان بر اساس مواد اولیه داخلی و با استفاده از نرم افزار لیندو (LINDO Systems Inc. Chicago, IL, USA) فرمولبندی گردید. غذاهای بچه ماهیان روزانه به میزان ۴-۷ درصد وزن بدن و در ۵ وعده در ساعات ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۸ انجام شد. مدفوع و دیگر مواد باقیمانده هر روز از مخازن سیفون می‌گردید.

در مقابل هجوم عوامل بیماری‌زا می‌باشد (۱۹). در این ماهیان ظرفیت جذب آب روده در طی تغییر شکل پار به اسمولت جهت آماده‌سازی افزایش میزان نوشیدن آب پس از مهاجرت به دریا، افزایش می‌یابد، که دلیل آن افزایش فعالیت نقل و انتقال یون با استفاده از پمپ سدیم-پتاسیم در سلول‌های لایه موکوسی روده می‌باشد (۲۹). همچنین گزارش شده که در ماهیان مذکور افزایش چربی‌های غیر اشباع غشاء پس از انتقال به آب دریا، سبب افزایش نفوذپذیری غشاء به آب می‌شود (۲۷). زواید باب‌المعدی ماهیان در قسمت ابتدایی روده بلافاصله بعد از اسفنگتر باب‌المعدی واقع شده‌اند که تنوع زیادی از نظر اندازه، شکل و تعداد (۱ تا ۱۰۰۰ عدد) دارا بوده و در تعداد اندکی از ماهیان استخوانی دیده می‌شوند (۲۰)، که یکی از عمده محل‌های جذب مواد غذایی و یون می‌باشند (۶، ۱۰، ۳۴). زواید باب‌المعدی ماهیان نوعی استراتژی تکاملی برای افزایش سطح جذب روده بدون افزایش طول یا ضخامت خود روده محسوب می‌گردد (۶، ۴۶، ۴۷). جابه‌جایی یون‌ها به کمک آنزیم‌های مختلفی انجام می‌شود که مهم‌ترین آنها آنزیم $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ است که در پمپ سدیم-پتاسیم حضور دارد (۴۵). پمپ سدیم-پتاسیم در غشای پایه‌ای-جانبی تمامی سلول‌های بدن وجود دارد ولی میزان آن در سلول‌های که نقش اساسی در تنظیم یونی دارند به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر می‌باشد (۱۷، ۲۲). علاوه بر این آنزیم، انتقال دهنده‌های یونی و کانال‌های یونی مرتبط با پروتئین‌های انتقال دهنده غشایی نیز که در غشاء‌های قاعده‌ای-جانبی یا رأسی یونوسیت‌ها جای گرفته‌اند در تبادلات یونی نقش دارند (۴۲، ۴۳، ۴۷). در کنار مطالعات سلولی، تعیین میزان حضور، فعالیت و فراوانی $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ اغلب به عنوان شاخص برای سنجش توانایی تنظیم اسمزی اندام‌ها در ماهیان جوان و بالغ سازگار شده با شوری‌های مختلف به کار می‌رود (۱۸). در بررسی‌های انجام شده (۱۶، ۴۳) مشاهده شده که آزاد ماهیان سازگار شده به آب دریا سطح بالاتری از فعالیت $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ در آبشش و روده در مقایسه با آزاد ماهی‌آداپته به آب شیرین داشته‌اند.

عملکرد تنظیم اسمزی دستگاه گوارش بوسیله تکنیک‌های مختلف در لارو ماهیان به اثبات رسیده است (۱۵، ۳۸). با توجه به خصوصیات ویژه سلول‌های اپی‌تلیال روده، این سلول‌ها علاوه بر جذب مواد غذایی، در تنظیم اسمزی نیز نقش ایفا می‌کنند (۱، ۵، ۴۰، ۴۸). در گونه‌های دیگری مثل باس دریایی و مار ماهی نیز به نقش تنظیم اسمزی روده اشاره شده است (۱۴، ۳۲).

یکی از ترکیباتی که امروزه به دلایل مختلفی در آبی‌پرویی استفاده می‌شود نوکلئوتیدها می‌باشند. نوکلئوتیدها از جمله ترکیبات داخل سلولی با وزن ملکولی پایین، از یک بنیان پورین یا پیریمیدین و یک قند ریبوز یا ۲-دی اکسی ریبوز و یک یا تعدادی گروه فسفات تشکیل می‌شوند. به‌طور کل، نوکلئوتیدها تقریباً در تمام فرایندهای سلولی دخالت داشته و نقش مهمی در وظایف ساختاری، تنظیمی بدن دارند



جهت هوادهی و تأمین اکسیژن به هر یک از مخازن ۲ عدد سنگ هوا که به منبع هواده متصل بودند، نصب گردید. آزمایش در یک سالن سرپوشیده با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۸ هفته انجام شد. اندازه‌گیری عوامل کیفی آب، هم‌چون دمای آب، میزان اکسیژن و pH ۲ بار در هفته انجام گرفت. در کل دوره آزمایش میزان دمای آب ۱۶-۱۴ درجه سانتی‌گراد، میزان اکسیژن ۷/۵-۸/۵ میلی‌گرم بر لیتر و pH آب ۷/۸-۸/۲ در نوسان بود. پس از اتمام دوره پرورش جهت انجام آزمایش از هر تیمار ۱۲ قطعه ماهی به شوری ۱۸ گرم در هزار معرفی گردید. پس از ۷۲ ساعت جهت بررسی فعالیت تنظیم اسمزی زوائد باب المعدی بچه ماهیان تعداد ۴ قطعه ماهی از هر تیمار صید و بلافاصله در محلول بوئن فیکس گردید.

بافت‌شناسی: به منظور عکس برداری و مشاهده بخش‌های مختلف زوائد باب المعدی، بافت‌شناسی کلاسیک انجام گردید. نمونه‌ها بعد از فیکس، آبگیری و پارافینه شدن، با استفاده از میکروتوم برش‌های ۴ میکرومتری از آنها تهیه و برای مطالعات بافت‌شناسی کلاسیک نمونه‌ها بعد از پارافین زدایی و آبگیری، با استفاده از همتاکسیلین - ائوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری Nikon مطالعه و عکس برداری مورد بررسی قرار گرفتند (۲۴،۲۶).

ایمونوهیستوشیمی: برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی از قالب‌ها، به وسیله میکروتوم، برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرومتر تهیه و روی لام‌هایی با پوشش Poly-L-Lysin قرار داده شدند. تعیین مکان حضور آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ با استفاده از آنتی بادی IgG±5، تهیه شده توسط Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa, USA، آنتی بادی FITC (Jackson Immuno Research, USA) و میکروسکوپ نوری فلوروسانس انجام گرفت.

برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی، لام‌ها بعد از پارافین زدایی در (Histochoice Clearing Agent: HCA) و آب دهی در الکل اتانول به ترتیب ۱ دقیقه در محلول (Phosphate Buffered Saline: PBS)، ۱۰ دقیقه در محلول A (۴۰۰ سی سی PBS ۱۰ میلی مول + ۳/۵ گرم کلرید سدیم) و ۲ دقیقه در محلول B (۵۰ درصد PBS و ۵۰ درصد Regiler که نوعی شیر خشک است) قرار داده شدند. سپس لام‌ها به مدت ۲ دقیقه در PBS شستشو داده شد و داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب، به طوری که سطح دارای برش به طرف بالا باشد، چیده شد. بر روی هر لام ۲-۳ قطره از آنتی بادی IgG±5 رقیق شده (۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی با ۹۰۰ میکرولیتر BS در یک میلی لیتر محلول) به میزان ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر برای ۱۰ لام در PBS اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از شستشوی آنتی بادی اضافی با PBS، ۲-۳ قطره از آنتی بادی FITC (۵ میکرولیتر FITC به علاوه ۹۹۵ میکرولیتر PBS در یک میلی لیتر محلول) روی هر لام اضافه و به مدت یک ساعت در محیط کاملاً تاریک نگه داشته شد. سپس لام‌ها با PBS شستشو و با استفاده از مایع مخصوص، مونتاژ

شدند.

برای پی بردن به درستی کارکرد این آنتی بادی به صورت یک در میان به تعدادی از لام‌ها آنتی بادی IgG±5 اضافه نشد اما آنتی بادی FITC به لام‌های شاهد منفی اضافه شد تا این لام‌ها با فلوروسانس نشدن متمایز شوند. کلیه لام‌ها بعد از قرار دادن لامل روی آنها در جعبه‌های مخصوص چیده و برای حفظ خواص فلوروسانسی در جای کاملاً تاریک نگهداری شد. لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری فلوروسانس (1-Lambda Lamp) با فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر مشاهده و عکس برداری شد (۲۵،۳۱).

نتایج

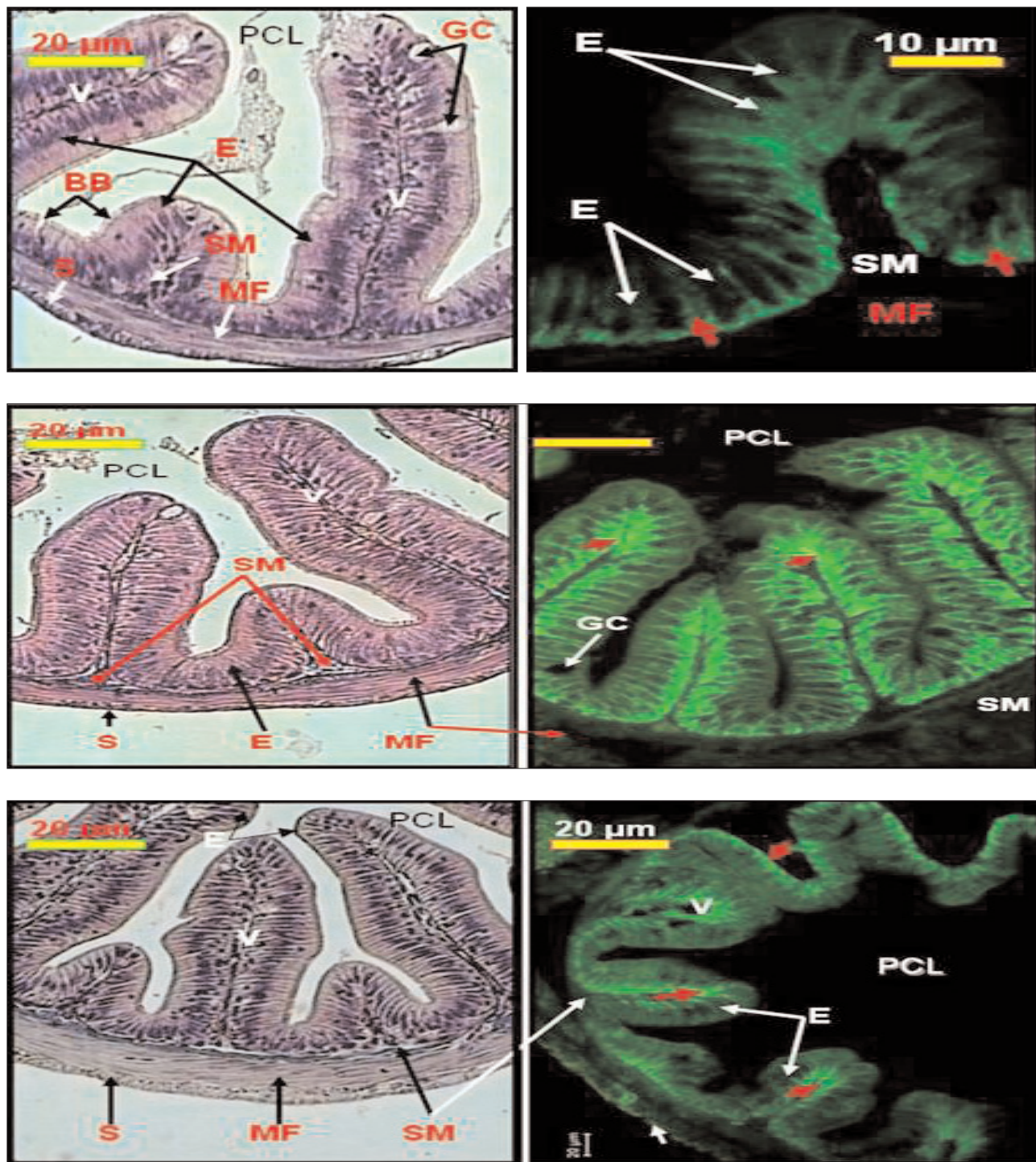
در بررسی بافت‌شناسی زوائد باب المعدی، بخش‌های مختلف از جمله لایه پوششی (سلول‌های انتروسیست)، لایه زیر موکوس، لایه سروزا، پرزها، فیبر عضلانی، سلول‌های موکوسی مشاهده گردیدند (تصاویر ۵، ۳، ۱). همچنین مقایسه تصاویر بافت‌شناسی زوائد باب المعدی نشان داد که در تیمارهای حاوی نوکلئوتید، لایه پوششی رشد فاحش و معنی داری نسبت به گروه شاهد دارد (تصاویر ۵، ۱، ۳).

در روش ایمونوهیستوشیمی، آنتی بادی IgG±5 روی آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ قرار گرفته و با حضور آنتی بادی دوم این آنزیم را به صورت فلوروسانس (به رنگ سبز مایل به زرد) نشان می‌دهد (سر فلش‌ها در تصاویر ۶، ۴، ۲). هر چه شدت فلوروسانت بیشتر باشد میزان حضور آنزیم بیشتر خواهد بود. بررسی ایمونوفلوروسانس در لام‌های هر سه تیمار نشان داد که در لایه‌های سروزی، ماهیچه‌ای و زیر موکوسی سلول‌ها ایمونوفلوروسانس قابل ملاحظه‌ای نداشته و فقط سلول‌های لایه پوششی (انتروسیست‌ها) فلوروسانت می‌باشند (تصاویر ۶، ۴، ۲). تیمار شاهد سلول‌های انتروسیست فلوروسانت ضعیفی در ناحیه قاعده‌ای و اندکی در قسمت جانبی از خود نشان دادند و فلوروسانسی در بخش رأسی سلول‌ها و همچنین هسته سلول‌ها مشاهده نشد (تصویر ۲). در بررسی به عمل آمده سلول‌های لایه پوششی زوائد باب المعدی در تیمار ۰/۲۵ درصد، ایمونوفلوروسانس بیشتری نسبت به تیمار شاهد از خود نشان دادند که دلالت بر حضور بیشتر آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در نمونه‌های این تیمار می‌باشد (تصویر ۴) و در نهایت در بررسی نمونه‌های تیمار ۰/۵ درصد، سلول‌های انتروسیست ایمونوفلوروسانس قوی‌تری نسبت به ۲ تیمار قبلی از خود نشان دادند (تصویر ۶). در این تیمار ایمونوفلوروسانس به طور مشهودی در بیشتر بخش‌های سلول (به‌غیر از هسته و ناحیه رأسی) خصوصاً ناحیه قاعده‌ای - جانبی مشخص می‌باشد.

بحث

مطالعه بافت‌شناسی زوائد باب المعدی نشان داد که بافت این زوائد همانند روده از چهار لایه شامل لایه سلول‌های پوششی، زیر موکوس، فیبر





تصویر ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ - لایه نوار مسواکی= Brush border (BB)، سلول های بافت پوششی روده= Enterocyte (E)، سلول های جامی شکل= Goblet cell (GC)، فیبر عضلات= fiber، فضای داخلی زواید باب المعدی= Pyloric ceca lumen (PC)، خارجی ترین لایه اندام گوارشی= serosa (S)، لایه زیرین لایه سلول های موکوسی= Sub mucosa (SM)، پرز= Villi (V)، هسته= Nucleus (N)، عضله= Muscle (MF).

رنگین کمان (۴۱)، باس دریایی (۴۴، ۳۹، ۳۸)، گویی (۴۲)، سالمون چام (۳۹)، خامه ماهی (۲۱) و گربه ماهی (۲۶) از موفق ترین روش هاست. نتایج تحقیق حاضر روی زوائد باب المعدی نشان داد این آنتی بادی در واکنش با آنزیم Na^+, K^+ -ATPase قابل ملاحظه ای خصوصاً

عضلانی و سرورزا تشکیل شده است. تحقیقات نشان داده که استفاده از آنتی بادی $IgG \pm 5$ جهت مکان یابی آنزیم Na^+, K^+ -ATPase و در واقع سلول های دخیل در تنظیم اسمزی (یونوسیت) در حشرات آبی (۲۲)، سخت پوستان (۲۲، ۲۵، ۳۰، ۳۸، ۳۹، ۴۲، ۵۰، ۵۱) و ماهیان از جمله قزل آلا



نتایج بررسی ایشان (۸) نشان داد که سالمون آتلانتیک تغذیه شده با نوکلئوتید جیره بعد از انتقال به آب شور به طور معنی داری میزان کلر کمتری نسبت به گروه کنترل نشان دادند که بر این اساس فرض کردند که احتمالاً بهبود توانایی تنظیم اسمزی می تواند ناشی از افزایش فعالیت پمپ سدیم-پتاسیم یا افزایش در تعداد سلول های کلراید یا ترکیبی از هر دو باشد. Jutfelt و همکاران (۱۹) گزارش کردند که اسیدهای چرب غیر اشباع HUFA (n-3) سبب افزایش توانایی سالمون آتلانتیک برای مقاومت در شرایط استرس زا از جمله شوک های اسمزی می شود و هر چه نرخ DHA/EPA بیشتر شود مقاومت موجود به شوک های اسمزی بیشتر می شود. از آن جایی که نوکلئوتید جیره می تواند بر متابولیسم اسیدهای چرب (Elongation and desaturation)، فسفولیپیدها و پروتئین ها تأثیر داشته باشد (۱۱)، احتمالاً بر خاصیت فیزیکی و شیمیایی غشای سلول ها نظیر انتقال و نفوذپذیری غشاء و گیرنده ها و آنزیم های غشاء اثر می گذارد. همچنین بیان شده که ترکیب فسفولیپیدی غشاء بر خاصیت جنبشی آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ که در تنظیم اسمزی نقش مهمی ایفا می کند تأثیر گذار است. اسیدهای چرب غیر اشباع در فسفولیپیدها سبب افزایش فعالیت $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ می شوند (۳۷). در تحقیق حاضر همچنین مشخص گردید که نوکلئوتید جیره غذایی تأثیر مثبت و معنی داری ($p < 0.05$) بر میزان حضور آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در ساک های پیلوریک داشته و میزان آن در تیمار ۵/۰ درصد بیشتر از سایر تیمارهاست. با توجه به این نتایج و توضیحات می توان گفت که نوکلئوتید جیره می تواند با تقویت میزان حضور آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ و تغییر اسیدهای چرب غشاء و افزایش ذخیره انرژی در سلول های انتروسیت بر انتقال الکترو لیت ها در ماهی آزاد دریای خزر تأثیر گذار باشد که این فرایند منجر به افزایش توان دفعی $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^- \text{ Co-transporter}$ شده و در نهایت مقاومت ماهی را در مقابل شوری آب محیط بیشتر می کند.

خلاصه این که، یافته های این تحقیق مشخص می کند که آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در زوائد باب المعدی حضور داشته و این آنزیم نقش بسزایی در تبادلات یونی ایفا می کند. همچنین مشخص گردید که نوکلئوتید جیره غذایی (خصوصاً در تیمار ۵/۰ درصد) تأثیر مثبت معنی داری ($p < 0.05$) بر میزان حضور آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ و افزایش توان تنظیم اسمزی بچه ماهیان آزاد خزر داشته و می تواند به عنوان یک ماده افزودنی تقویت کننده رشد و توان تنظیم اسمزی مورد استفاده قرار گیرد.

در تیمار ۵/۰ درصد تولید می کند و قادر به شناسایی محل حضور آنزیم می باشد. حضور این آنزیم در بخش قاعده ای - جانبی سلول های انتروسیت زوائد باب المعدی نشان دهنده شرکت فعال این سلول ها در تبادلات یونی می باشد. در تحقیقات متعدد انجام شده به نقش زوائد باب المعدی در جذب یون ها اشاره شده ولی مکانیابی ایمینایی آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در آنها به ندرت مورد توجه قرار گرفته است (۳۴). Veillette و همکاران در سال ۱۹۹۵ بیان کردند که فیزیولوژی انتقال یون ها در زوائد باب المعدی هنگام سازگاری به آب دریا تحت کنترل محیط و غدد درون ریز بوده و این اندام، محل اصلی تنظیم اسمزی می باشد (۴۶). در سالمون چینوک انتقال یافته به آب دریا اندازه گیری مستقیم مایع بازجذبی و فعالیت $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ نشان داده که مکانیسم های تنظیم اسمزی در زوائد باب المعدی در اثر این انتقال تحریک می شود؛ تحریک ماهی به کمک کورتیکوئیدهای معدنی نیز باعث تغییرات مشابهی می شود که این نشان دهنده سهم بالای تنظیم اسمزی زوائد باب المعدی در بین سایر بخش های دستگاه گوارش می باشد (۴۶). علاوه بر این آنزیم، کوترانسپورتر $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^- \text{ Co-transporter}$ نیز نقش مهمی در تبادلات یونی ایفا می کند. در باس دریایی مکان یابی $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^- \text{ Co-transporter}$ در قسمت راسی سلول های بخش های مختلف روده ها، زمانی که در آب شیرین قرار گیرند و همچنین در قسمت بازال این سلول ها، زمانی که در آب شور قرار گیرند، نشان داده شده است (۳۷). تغییرات تنظیمی و سازشی در فیزیولوژی تنظیم اسمزی زوائد باب المعدی سالمون چینوک (*Onchorhynchus tshawytscha*) Chinook salmon نیز به اثبات رسیده که نشان می دهد سهم این زوائد در تنظیم اسمزی دستگاه گوارش بالاست (۴۶). با توجه به نتایج تحقیق حاضر و نتایج تحقیقات گفته شده به نظر می رسد که در بچه ماهیان ماهی آزاد خزر که در شوری ۱۸ گرم در لیتر قرار داده می شوند، آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در زوائد باب المعدی نقش پمپ یون های سدیم از درون سلول به خون را داشته و کار را برای کوترانسپورتر $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ ، که نقش خارج کردن یون های اضافی از بدن را دارد، مهیا می کند. حضور کم آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در زوائد باب المعدی ماهیان شاهد بیانگر توانایی کم آنها در مواجه شدن با شوری ۱۸ گرم در لیتر بوده است، لذا به نظر می رسد این شوری برای این ماهی مشکل ساز باشد.

یکی از پذیرفته شده ترین فرضیه ها در مورد اثرات مفید مشاهده شده نوکلئوتیدهای جیره در ماهیان این است که در شرایط استرس زای محیطی مثل کیفیت بد آب، تراکم و دستکاری میزان تقاضای نوکلئوتید در بدن افزایش می یابد (۲۸). Burrells و همکاران (۷، ۸) اول بار این فرضیه را مطرح ساختند که نوکلئوتیدهای جیره می توانند تحمل استرس را افزایش دهند و شواهدی را از طریق مقایسه ظرفیت تنظیم اسمزی و عملکرد رشدی آتلانتیک سالمون تغذیه شده با جیره دارای نوکلئوتید و جیره شاهد بعد از استرس حاد ناشی از انتقال به آب دریا فراهم کردند.



References

1. Abaurrea-Equisoain, M. A., Ostos-Garrido, M. V. (1996) Enterocytes in the anterior intestine of *Oncorhynchus mykiss*: cytological characteristics related to osmoregulation. *Aquaculture*. 139: 109-116.
2. Alves, P., Soveral, G., Macey, R. I., Moura, T. F. (1999) Kinetics of water transport in eel intestinal vesicles. *J. Membr. Biol.* 171: 177-182.
3. Ando, M., Mukuda, T., Kozaka, T. (2003) Water metabolism in the eel acclimated to sea water: from mouth to intestine. *Comp. Biochem. Physiol.* 136B: 621-633.
4. Andres-Elias, N., Pujols, J., Badiola, I., Torrallardona, D. (2007) Effect of nucleotides and carob pulp on gut health and performance of weanling piglets. *Livestock Sci.* 108: 280-283.
5. Aoki, M., Kaneko, T., Katoh, F., Hasegawa, S., Tsutsui, N., Aida, K. (2003) Intestinal water absorption through aquaporin 1 expressed on the apical membrane of mucosal epithelial cells in sea water-adapted Japanese eel. *J. Expl. Biol.* 206: 3495-3505.
6. Buddington, R. K., Diamond, J. M. (1987) Pyloric Ceca of Fish: a "New" Absorptive Organ. *J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 252: G65-G76.
7. Burrells, C., William, P. D., Forno, P. F. (2001a) Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 1. Effects on resistance to diseases in salmonids. *Aquaculture*. 199: 159-169.
8. Burrells, C., William, P. D., Southage, P. J., Wadsworth, S. L. (2001b) Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rate and physiology of Atlantic salmon. *Aquaculture*. 199: 171-184.
9. Castro, H., Battaglia, J., Virtanen, E. (1998) Effects of FinnStim on growth and sea water adaptation of Coho salmon. *Aquaculture*. 168: 423-429.
10. Collie, N. L. (1985) Intestinal nutrient transport in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and the effects of development, starvation, and seawater adaptation. *J. Comp. Physiol. part B.* 156: 163-174.
11. Cosgrove, M. (1998) Nucleotides. *Nutr.* 14: 748-751.
12. Eldon, J. B. (2003) Regulation of renal and lower gastrointestinal function: role in fluid and electrolyte balance. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 136: 499-505.
13. Evans, D. H. (2002) Cell signaling and ion transport across the fish gill epithelium. *J. Exp. Zool.* 293: 336-347.
14. Giffard-Mena, I., Charmantier, G., Castille, R. (2007) The role of the gut in salinity adaptation of the Sea-bass, *Dicentrarchus labrax* during larval development. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 146: S87-S96.
15. Giffard-Mena, I., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Castille, R. (2006) Digestive tract ontogeny of *Dicentrarchus labrax*: implication in osmoregulation. *Dev. Growth. Differ.* 48: 139-51.
16. Handeland, S. O., Stefansson, S. O. (2002) Effects of salinity acclimation on pre-smolt growth, smolting and post-smolt performance in off-season Atlantic salmon smolts (*Salmo salar L.*). *Aquaculture*. 209: 125-137.
17. Hirose, S., Kaneko, T., Natio, N., Takei, Y. (2003) Molecular biology of major components of chloride cells. *Com. Biochem. Physiol. Part B.* 136: 593-620.
18. Imsland, S., Bronzie, P., Bryjalsen, A. (2003) Gill Na⁺,K⁺-ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scaphthalmus maximus*) reared at different temperature and salinities. *Aquaculture*. 218: 671-683.
19. Jutfelt, F., Olsen, R. E., Bjornsson, B. T., Sundell, K. (2007) Parr-smolt transformation and dietary vegetable lipids affect intestinal nutrient uptake, barrier function and plasma cortisol levels in Atlantic salmon. *Aquaculture*. 273: 298-311.
20. Karasov, W. H., Hume, I. D. (1997) Vertebrate gastrointestinal system, In: *The Handbook of Physiology Comparative Physiology*. Dantzler, W. H. (ed.), The American Physiology Society, Oxford University Press. England. 13: 409-480.
21. Karnaky, K. J., Kinter, L. B., Kinter, W. B., Stirling, C. E. (1976) Teleost chloride cell. II. autoradiographic Localization of gill Na⁺,K⁺-ATPase in killifish *fundulus heteroclitus*. *J. Cell Biol.* 70: 157-177.



22. Khodabandeh, S. (2006) Na⁺,K⁺-ATPase in the gut of the Zygoptera, *Ischnura elegans*, and Anisoptera, *Libellula lydia*, Larvae (Odonata): Activity and immunocytochemical Localization. Zool. Sci. 45: 510-516.
23. Khodabandeh, S., Chamantier, G., Blasco, C., Grousset, E., Chamantier-Daures, M. (2005a) Ontogeny of the antennal gland in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): anatomical and cell differentiation. Cell Tissue. Res. 319: 153- 165.
24. Khodabandeh, S., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. (2006b) Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase in osmoregulatory organs during the embryonic and post-embryonic development of the lobster *Homarus gammarus*. J. Crust. Biol. 26 (4), 515-523.
25. Khodabandeh, S., Kutnic, M., Aujoulat, F., Chamantier, G., Chamantier-Daures, M. (2005b) Ontogeny of the antennal gland in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase. Cell. Tiss. Res. 319: 167-174.
26. Khodabandeh, S., Taghizadeh, Z. (1385) The localization of Na⁺,K⁺-ATPase enzyme and ionocyte cell in gill of *Silurus glanis* with immunohistochemical method. Med. J. Cell. 1: 45-52.
27. Lande, M. B., Donovan, J. M., Zeidel, M. L. (1995) The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. J. Gen. Physiol. 106: 67-84.
28. Leonardi, M., Sandino, A. M., Klempau, A. (2003) Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 23: 52-59.
29. Leray, C., Chapelle, S., Duportail, G., Florentz, A. (1984) Changes in fluidity intestinal and 22 6n-3 content in phospholipids of trout *Salmo gairdneri* brush-border membrane as related to environmental salinity. Biochim. Biophys. Acta. 778: 233-238.
30. Lignot, J. H., Chamantier-Daures, M., Chamantier, G. (2001) Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase in the organs of the branchial cavity of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, decapoda). Cell. Tiss. Res. 296: 417-426.
31. Lignot, J. H., Nugroho- Susanto, G., Charmantier-Daures, M., Charmantier, G. (2005) Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase in the branchial cavity during the early development of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda). Cell. Tiss. Res. 319: 331-339.
32. Lionetto, M. G., Giordona, M. E., Nicolardi, G., Schettino, T. (2001) Hypertonicity stimulates Cl⁻ transport in the intestine of fresh water acclimated eel, *Anguilla anguilla*. Cell. Physiol. Biochem. 11: 41-54.
33. Loretz, A. C. (1995) Electrophysiology of ion transport in teleost intestinal cells. In: Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation. Wood, C. M., Shuttle, T. J. W. (eds.). Academic Press. London, England. p. 25-56.
34. Loretz, C. A., Pollina, C. (2000) Natriuretic peptides in fish physiology. Com. Biochem. Physiol. Part A. 125: 169-187.
35. Lorin-Nebel, C., Bodinier, C. h., Boulo, V., Charmantier, G. (2007) NKCC and CFTR in the Sea-bass *Dicentrarchus labrax*: ontogeny and expression according to salinity. Soc. Integ. Comp. Biol. 48:173-188.
36. Mahmoudi, N. (1387) The effect of several levels of dietary nucleotide on growth performance, survival and liver enzyme of *Salmo trutta caspius*. I. F. R. O. 17: 4-87.
37. Moya-Falcon, C., Hvattum, E., Dyroy, E., Skorve, J., Stefansson, S. O., Thomassen, M. S., Jakobsen, J. V., Berge, R. K., Ruyter, B. (2004) Effects of 3-thia acids on feed intake, growth, tissue fatty acid composition, B-oxidation and Na⁺,K⁺-ATPase activity in Atlantic salmon. Com. Biochem. Physiol. Part B 139: 657-668.
38. Nebel, C., Negre-Sadargues, G., Blasco, C., Chamantier, G. (2005) Morphofunctional ontogeny of the urinary system of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. Anat. Embryol. 209: 193-206.



39. Nebel, C., Romestand, B., Negre-Sadargues, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Bacal, J. F., Bonhommb, S., Charmantier, G. (2005) Differential freshwater adaptation in Juvenile Sea-bass, *Dicentrarchus labrax*: involvement of gills and urinary system. J. Exp. Biol. 208: 3859-3871.
40. Ostos-Garrido, M. V., Nunez-Torres, M. I., Abaurrea-Equisoain, M. A. (1993) Lipid absorption by enterocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: diet induced changes in the endomembranous system. Aquaculture. 110: 161-171.
41. Shikano, T., Fujio, Y. (1998a) Immunolocalization of in the branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and fresh water acclimation. Exp. Biol. 201: 3031-3040.
42. Shikano, T., Fujio, Y. (1998b) Relationship of salinity tolerance to immunolocalization in the gill epithelium during sea water and fresh water adaptation of the Guppy, *Poecilia reticulata*. Zool. Sci. 15: 35-41.
43. Sundell, K., Jutfelt, F., Agustsson, T., Olsenc, R., Sandblom, E., Hansen, T., Bjornsson, B. T. (2003) Intestinal transport mechanisms and plasma cortisol during normal and out- of-season parr-smolt transformation of atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture. 222: 265-285.
44. Varsamos, S., Diaz, J. P., Chamantier, G., Blasco, C., Connes, R., Flik, G. (2002) Location and morphology of chloride cells during the postembryonic development of the European Sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Anat. Embryol. 205: 203-213.
45. Varsamos, S., Nebel, C., Charmatier, G. (2005) Review: ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish. Comp. Biochem. Physiol. 141: 401-429.
46. Veillette, P. A., Sundell, K., Specker, J. L. (1995) Cortisol mediates the increase in intestinal fluid absorption in Atlantic salmon during parr-smolt transformation. Gen. Comp. Endocrinol. 97: 250-258.
47. Veillette, P. A., Young, G. (2005) Tissue culture of sockeye salmon intestine: functional response of Na^+ , K^+ -ATPase to cortisol. Com. Biochem. Physiol. 288: 1598-R1605.
48. Verri, T., Maffia, M., Danieli, A. (2000) Characterization of the H^+ peptide cotransporter of eel intestinal brush border membranes. J. Exp. Biol. 203, 2991-3001.
49. Wilson, R. W., Gilmour, K. M., Henry, R. P., Wood, Ch. M. (1996) Intestinal base excretion in the seawater- adapted *Rainbow trout*: a role in acid-base balance J. Exp. Biol. 199: 2331-2343.
50. Witters, H., Berckmans, P., Vangenechten, C. (1996) Immunolocalization of in the gill epithelium of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Cell. Tiss. Res. 283: 461- 468.
51. Ziegler, A. (1997) Immunocytochemical localization of Na^+ , K^+ ATPase in the calcium transporting sternal epithelium of the terrestrial isopod *Porcellio scaber L* (Crustacean). J. Histochem. Cytochem. 45: 437-446.



EFFECT OF DIFFERENT LEVELS OF DIETARY NUCLEOTIDES ON OSMOREGULATION OF PYLORIC CAECA IN CASPIAN SEA SALMON (*SALMO TRUTTA CASPIUS*)

Oulad, S.¹, Khodabandeh, S.^{*1}, Abedian Kenari, A.²

¹Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Mazandaran- Iran.

²Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Mazandaran- Iran.

(Received 7 February 2009 , Accepted 18 January 2010)

Abstract:

Nucleotides are considered as cellular component which do regulatory effect and key function in all biological process. The aim of the present study was to investigate the effect of dietary nucleotide intake on osmoregulatory function of pyloric caeca in juvenile salmon of Caspian sea. This experiment was done in two levels of dietary nucleotide (0.25 % and 0.5%) and a control group (0%) for 8 weeks. After then, 12 fishes from each treated group were transferred into saline water (18 ppt). 72 hours later, fishes were fixed for histological and immunohistochemical studies. Histological studies were done by Hematoxiline-Fushin staining and light microscope. Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase was done by fluorescent microscope. Results showed that in all samples immunofluorescence of Na⁺,K⁺-ATPase can be seen in the baso-lateral parts of pyloric caeca entocytes. Treated groups showed higher fluorescence compared to the control. In this respect 0.5% group showed the highest values for immunofluorescence of Na⁺,K⁺-ATPase. Alternation in Na⁺, K⁺-ATPase values of epithelial pyloric caeca in response to dietary nucleotides intake can be attributed to its role in adaptation of fish to 18 ppt saline.

Key words: dietary nucleotide, *Salmo trutta caspius*, pyloric caeca, osmoregulation.

*Corresponding author's email: surp78@yahoo.com, Tel: 0122-6253499, Fax: 0122-6253499

