



## Effect of Chitosan and Nano-Chitosan Loaded Clinoptilolite on Histomorphology and Pepsin Activity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Stomach

Ali Khani Oushani<sup>1✉</sup>, Mehdi Soltani<sup>2✉</sup>, Najmeh Sheikhzadeh<sup>3✉</sup>, Mehdi Shamsaie Mehrghan<sup>4✉</sup>, Housman Rajabi Islami<sup>4✉</sup>, Gholamreza Hamidian<sup>5✉</sup>

<sup>1</sup> Graduated from the Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>4</sup> Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 9 April 2023, Accepted: 17 June 2023

doi: [10.22059/jvr.2022.345292.3279](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.345292.3279)

 [20.1001.1.20082525.1402.78.3.4.0](https://doi.org/20.1001.1.20082525.1402.78.3.4.0)

### Abstract

**BACKGROUND:** Numerous studies have investigated the positive effect of chitosan and nano-chitosan loaded clinoptilolite on growth performance, digestive enzyme activity, and intestinal histomorphology in different fish species. However, there are no data evaluating the potential effect of the composites on the fish stomach.

**OBJECTIVES:** In the current study, the effects of chitosan and nano-chitosan loaded clinoptilolite on histological features and pepsin activity in the rainbow trout stomach were considered.

**METHODS:** Chitosan and nano-chitosan loaded clinoptilolite were synthesized, and then two hundred and forty fish (~27.75 g) fish were distributed in eight groups each in three replicates. Ten days after adaptation, the fish were fed with eight diets, including control diet (CTR), clinoptilolite (T1), chitosan composites (T2, T3, T4), and nano-chitosan composites (T5, T6, T7) for 70 days. Afterward, all fish in each tank were anesthetized in clove extract (50 µl/l), and tissue samples were obtained for pepsin activity (n= 5) and histological assay (n = 5).

**RESULTS:** The groups administrated with nanochitosan composites showed the highest pepsin activity ( $P<0.05$ ). Additionally, histological examinations exhibited a higher epithelial height, increased mucosal density, and oxynticopeptic cells hypertrophy in fish fed composites compared to the CTR group ( $P<0.05$ ). Meanwhile, nanochitosan composite administration could cause higher reaction of secreted granules to periodic acid–Schiff (PAS) staining.

**CONCLUSIONS:** The findings demonstrated the potential application of chitosan and nano-chitosan loaded clinoptilolite composites for improvements in the histomorphology and pepsin activity of the rainbow trout stomach, resulting in higher growth performance.

**Keywords:** Chitosan, Clinoptilolite, Histology, Nanochitosan, Rainbow trout

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).

Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Najmeh Sheikhzadeh, Tel/Fax: +9841-36378743



### How to cite this article:

Khani Oushani A, Soltani M, Sheikhzadeh N, Shamsaie Mehrghan M, Rajabi Islami H, Hamidian G. Effect of Chitosan and Nano-Chitosan Loaded Clinoptilolite on Histomorphology and Pepsin Activity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Stomach. J Vet Res, 2023; 78(3): 183-195. doi: 10.22059/jvr.2022.345292.3279

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Density of gastric fundus parts in different treatment groups of the rainbow trout administrated with composites.

**Table 2.** Volume density of gastric fundus parts in different treatment groups of the rainbow trout administrated with composites.

**Graph 1.** Gastric pepsin enzyme activity ( $U L^{-1}$  per mg tissue) in the treatment groups of the rainbow trout administrated with composites.

**Graph 2.** Mean volume of oxynticopeptic cells per  $mm^3$  gastrin mucosal layer in the treatment groups of the rainbow trout administrated with composites.

**Graph 3.** Mean number of oxynticopeptic cells per  $mm^3$  gastrin mucosal layer ( $\times 10^4$ ) in the treatment groups of the rainbow trout administrated with composites.

**Figure 1.** Histologic micrograph of the parin stratum of the mucous layer in the rainbow trout administrated with the control diet (PAS-H staining,  $\times 1000$  magnification).

**Figure 2.** Histologic micrograph of the parin stratum of mucous layer in the rainbow trout administrated with clinoptilolite.

**Figure 3.** Histologic micrograph of the parin stratum of the mucous layer in the rainbow trout administrated with the 0.5-g composite.

**Figure 4.** Histologic micrograph of the parin stratum of the mucous layer in the rainbow trout administrated with the 5-g composite.

**Figure 5.** Histologic micrograph of the parin stratum of the mucous layer in the rainbow trout administrated with the 0.5-g nano-composite.

**Figure 6.** Histologic micrograph of the parin stratum of the mucous layer in the rainbow trout administrated with the 5-g nano-composite.

## تأثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بارگذاری شده در کلینوپتیلولیت بر ساختار بافت‌شناسی و فعالیت آنزیم پپسین معده در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

علی خانی اوشانی<sup>۱</sup>، مهدی سلطانی<sup>۲</sup>، نجمه شیخزاده<sup>۳</sup>، مهدی شمسیایی مهرجان<sup>۴</sup>، هومن رجبی اسلامی<sup>۴</sup>، غلامرضا حمیدیان<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

<sup>۴</sup> گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۵</sup> گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۲۰ فروردین ماه ۱۴۰۲، تاریخ پذیرش: ۲۷ خرداد ماه ۱۴۰۲

doi: 10.22059/jvr.2022.345292.3279

20.1001.1.20082525.1402.78.3.4.0

### چکیده

**زمینه مطالعه:** مطالعات زیادی در رابطه با اثرات مثبت کامپوزیت‌های کیتوزان و نانوکیتوزان بارگذاری شده بر روی کلینوپتیلولیت بر عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و هیستومورفولوژی روده در گونه‌های مختلف ماهی موجود می‌باشد. اما اطلاعاتی در زمینه ارزیابی پتانسیل این کامپوزیت‌ها بر معده ماهی وجود ندارد.

**هدف:** در مطالعه حاضر، اثرات کامپوزیت‌های کیتوزان و نانوکیتوزان بارگذاری شده بر روی کلینوپتیلولیت بر ساختار بافت‌شناسی و فعالیت پپسین در معده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مدنظر قرار گرفت.

**روش کار:** کامپوزیت‌های کیتوزان و نانوکیتوزان بارگذاری شده بر روی کلینوپتیلولیت ساخته شدند. سپس ۲۴۰ قطعه ماهی (حدوداً ۲۷/۷۵ گرم) در هشت گروه مختلف با سه تکرار توزیع شدند و پس از دوره ۱۰ روزه آدابتاسیون، با هشت نوع جیره غذایی شامل جیره کنترل (CTR)، کلینوپتیلولیت (T1)، نانوکامپوزیت‌های کیتوزان (T2, T3, T4) و کامپوزیت‌های نانوکیتوزان (T5, T6, T7) به مدت ۷۰ روز تغذیه شدند. سپس همه ماهی‌های هر تانک با عصاره گل میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر) بی‌هوش شده و نمونه‌های بافتی برای بررسی فعالیت پپسین ( $n = 5$ ) و همچنین آزمایشات بافت‌شناسی ( $n = 5$ ) اخذ گردید.

**نتایج:** بالاترین میزان فعالیت پپسین در گروه‌های تغذیه شده با کامپوزیت‌های نانوکیتوزان نشان داده شد ( $P < 0.05$ ). مطالعات بافت‌شناسی نیز بیانگر افزایش ارتفاع بافت پوششی، ضخامت طبقه مخاطی و هایپرتروفی سلول‌های اکسینتیکوپتیک در ماهی‌های تغذیه شده با کامپوزیت‌ها در مقایسه با گروه CTR بود ( $P < 0.05$ ). ضمناً مصرف کامپوزیت‌های نانوکیتوزان باعث ایجاد واکنش شدیدتر گرانول‌های ترشحی به رنگ‌آمیزی پرئودیک اسید شیف (PAS) گردید.

**نتیجه‌گیری نهایی:** این نتایج نشان دهنده پتانسیل کامپوزیت‌های کیتوزان و نانوکیتوزان بارگذاری شده بر روی کلینوپتیلولیت در بهبود ساختار بافت‌شناسی و فعالیت پپسین در معده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است که نتیجه نهایی آن بهبود رشد می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** بافت‌شناسی، قزل‌آلای رنگین‌کمان، کلینوپتیلولیت، کیتوزان، نانوکیتوزان

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی؛ دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: نجمه شیخزاده، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

### مقدمه

کیتوزان یکی از انواع پلی‌ساکاریدهای پرکاربرد در صنایع مختلف مانند نساجی، کشاورزی، بهداشتی و صنایع غذایی می‌باشد (۱). اثرات کیتوزان در بهبود رشد، تقویت سیستم ایمنی، افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها و صنایع شیلاتی در گونه‌های آبزی مشخص شده است (۲، ۳). مطالعات

نشان داده است که کوچک کردن اندازه ذرات این ترکیب سبب بهبود حلالیت و کارایی آن در مقایسه با اندازه‌های بزرگ‌تر کیتوزان می‌شود به طوری که بهبود اثرات مفید نانوکیتوزان در مقایسه با کیتوزان در ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis nilotica*) گزارش شده است (۴).

کلینوپتیلولیت نوعی ژئولیت طبیعی است که در صنایع کشاورزی، صنایع طبیعی و پزشکی کاربرد دارد (۵). افزودن این ترکیب به خوراک ماهی نیز قادر به بهبود رشد، کاهش تلفات و کاهش مسمومیت می‌باشد (۶). ضمناً این ترکیب به عنوان پایه جهت ساخت انواع کامپوزیت به شمار می‌رود. مطالعات گذشته نشان داد که استفاده از کامپوزیت‌های کیتوزان و نانوکیتوزان بارگذاری شده بر روی کلینوپتیلولیت قادر به افزایش اثرات مفید مربوط به هر کدام از ترکیبات به تنهایی می‌باشد (۷-۹).

در سال‌های اخیر، استفاده از مواد افزودنی مختلف به منظور بهبود روند هضم و کارایی خوراک، افزایش رشد و افزایش مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زای مختلف در گونه‌های مختلف ماهی معمول گردیده است (۱۰-۱۴). در همین راستا، اثرات این افزودنی‌ها بر فعالیت‌های گوارشی، جذب مواد و بهبود ساختار روده و در نهایت افزایش رشد نیز مورد بررسی قرار گرفته است (۱۰-۱۴). هر چند بررسی در زمینه اثرات این مواد بر میزان فعالیت آنزیم پپسین تا حدودی مدنظر قرار گرفته است اما مطالعات بسیار محدودی در زمینه اثرات برخی ترکیبات مانند روغن‌های فرار و عصاره برگ کنار هندی (*Ziziphus mauritiana*) بر ساختار بافتی معده در گونه‌های ماهی گزارش گردید (۱۵، ۱۶). با توجه به فقدان اطلاعات در زمینه اثرات کامپوزیت‌های کیتوزان و نانوکیتوزان بارگذاری شده بر روی کلینوپتیلولیت بر معده ماهی، مطالعه حاضر پایه‌ریزی گردید تا اثر این نوع کامپوزیت‌ها بر ساختار بافت‌شناسی معده و فعالیت آنزیم پپسین را ارزیابی کند.

## مواد و روش کار

**آماده‌سازی کیتوزان و نانوکیتوزان بارگذاری شده در کلینوپتیلولیت:** کلینوپتیلولیت طبیعی خریداری شده از شرکت افرد توسکا (اصفهان، ایران) با هاون به ذرات کوچک‌تر (کمتر از ۱۰۰ میکرومتر) تبدیل شده و سپس از صافی رد شدند. برای آماده‌سازی نانوکیتوزان بارگذاری شده در کلینوپتیلولیت، کیتوزان با وزن مولکولی متوسط تهیه شده از شرکت سیگما (آمریکا) (۰/۲۶ گرم) با محلول اسید استیک ۰/۵ درصد (۲۰ میلی‌لیتر) و آب مقطر (۱۳۰ میلی‌لیتر) مخلوط شد و سپس محلول تری‌پلی فسفات سدیم (۴/۹۵ میلی‌لیتر) با غلظت ۵۴/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به این ترکیب اضافه شد. نانوکیتوزان‌های ساخته شده به میزان ۰/۵، ۰/۵ و ۵ گرم با کلینوپتیلولیت (۱۴/۲۸ گرم) هم زده شد و به مدت ۳۰ دقیقه سونیکه شد.

برای ساختن کیتوزان بارگذاری شده در کلینوپتیلولیت، کیتوزان به میزان ۰/۵، ۰/۵ و ۵ گرم و کلینوپتیلولیت (۱۴/۲۸ گرم) به صورت جداگانه با آب مقطر (۵۰ میلی‌لیتر) حل شدند و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق هم زده شدند. محلول‌های کیتوزان و کلینوپتیلولیت با هم مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت هم زده شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد (۹).

**طراحی آزمایشگاهی:** مطالعه حاضر در یک مرکز پرورش ماهی خصوصی واقع در فیروزکوه انجام شد. مراحل مطالعه بر روی ماهی براساس دستورالعمل کمیته اخلاق زیست پزشکی دانشگاه تبریز (کد FVM.REC.1396.938) انجام شد. در مطالعه حاضر، ۲۴۰ قطعه ماهی قزل‌آلای سالم با میانگین وزن  $0.34 \pm 27.75$  گرم در ۲۴ بتونی به ابعاد  $1/7 \times 0.60 \times 0.30$  متر و با تراکم ۱۰ قطعه ماهی در هر تانک توزیع شدند. شاخص‌های فیزیوشیمیایی آب چاه مورد استفاده در مطالعه حاضر به قرار زیر بود: درجه حرارت ( $1/1 \pm 12/2$  درجه سانتی‌گراد)، pH ( $0.3 \pm 7/5$ )، اکسیژن محلول ( $0.4 \pm 8/7$  میلی‌گرم در لیتر). در مدت ۱۰ روزه سازگاری، ماهی‌ها با جیره پایه (جدول ۱) به میزان ۲/۱ درصد و سه بار در روز تغذیه شدند.

در مطالعه حاضر، همانند مطالعه قبلی (۹)، هشت گروه مختلف به قرار زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

گروه CTR (تغذیه شده با جیره پایه فاقد کیتوزان، نانوکیتوزان و کامپوزیت)

گروه T1 (تغذیه شده با جیره حاوی ۱۴/۲۸ گرم در کیلوگرم کلینوپتیلولیت)

گروه T2 (تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ گرم کیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم کلینوپتیلولیت)

گروه T3 (تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ گرم کیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم کلینوپتیلولیت)

- گروه T4 (تغذیه شده با جیره حاوی ۵ گرم کیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم کلینوپتیلولیت)
- گروه T5 (تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۵ گرم نانوکیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم کلینوپتیلولیت)
- گروه T6 (تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ گرم نانوکیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم کلینوپتیلولیت)
- گروه T7 (تغذیه شده با جیره حاوی ۵ گرم نانوکیتوزان بارگذاری شده در ۱۴/۲۸ گرم کلینوپتیلولیت)

ترکیبات موجود در جیره پایه (۹) با مقادیر ذکر شده از کلینوپتیلولیت و یا کامپوزیت‌های ساخته شده در بالا مخلوط و بعد از پلت زنی از صافی‌های ۴-۳/۵ میلی‌متری رد شد و در پلاستیک‌های جداگانه تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از اتمام دوره سازگاری، ماهی‌های نگهداری شده در گروه‌های مختلف به مدت ۷۰ روز پیاپی خوراک مربوط به گروه کنترل و یا تیمار ذکر شده در بالا را به میزان ۲-۲/۱ درصد وزن بدن به صورت روزانه دریافت نمودند.

**بررسی میزان فعالیت پیسین:** در روز ۷۰ام، ۵ قطعه ماهی در هر تانک به صورت کاملاً تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی در عصاره گل میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر)، بافت معده هر ماهی به صورت کامل جدا شد و پس از شستشو با بافر (Phosphate buffer saline) PBS، بافت‌های مورد نظر در نیتروژن مایع فریز شد. بعد از له نمودن، بافت‌های همگن شده با بافرتریس هیدروکلرید ۲۵ میلی‌مولار مخلوط شدند. ترکیب ایجاد شده به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه) شد و محلول‌رویی جمع‌آوری شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت بررسی میزان فعالیت آنزیم پیسین ذخیره سازی شد.

برای بررسی فعالیت پیسین، ابتدا میزان محتوای پروتئینی موجود در بافت معده ماهی‌ها به روش لوری (۱۷) محاسبه گردید. در این مطالعه، هموگلوبین به عنوان سوبسترا مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب مورد نظر حاوی هموگلوبین گاوی ۱ درصد (۰/۵ میلی‌لیتر) حل شده در اسیدکلریدریک ۰/۰۷۵ مولار با هموزن معدی (۰/۴ میلی‌لیتر) مخلوط شد و انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. واکنش با افزودن تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (۱ میلی‌لیتر) متوقف شد و سپس سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. در انتها میزان تیروزین (میکروگرم) آزادسازی شده با فعالیت آنزیم پیسین در هموزن معدی به روش لوری (۱۷) محاسبه شد (۷).

**مطالعه بافت‌شناسی:** پس از اتمام دوره پرورش، از هر تانک به طور تصادفی ۵ ماهی انتخاب و پس از بیهوشی در عصاره گل میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر)، ابتدا کل لوله گوارش خارج و سپس معده به طور کامل و با دقت جدا و در محلول تثبیت کننده فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شد. قبل از قرار دادن نمونه‌های بافتی در محلول تثبیت کننده با استفاده از سرنگ مقداری از محلول تثبیت کننده درون حفره داخلی معده تزریق شد تا تثبیت طبقه مخاطی به خوبی صورت پذیرد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه بافت‌شناسی، از کل معده برش‌های متوالی ۱ سانتی‌متری تهیه و برای پاساژ بافتی و قالب‌گیری به روش استاندارد و روتین با استفاده از دستگاه هیستوکینت مدل ۲۰۰۰ (لایکا، آلمان) آماده شد. سپس از قالب‌های پارافینی توسط میکروتوم دورانی برش‌های نازک به ضخامت ۵ میکرومتر (جهت مطالعه هیستولوژی) و برش‌های ضخیم به ضخامت ۳۰ میکرومتر (جهت مطالعات هیستومورفومتری و استریولوژیک) به صورت متوالی تهیه شد تا پس از خشک شدن مورد رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین (H&E)، پرئودیک اسید شیف (PAS) و آلسین بلو (AB) قرار گیرند.

برای مقایسه دقیق و کمی تغییرات ساختار بافتی معده از مطالعات هیستومورفومتری و استریولوژی بهره گرفته شد. کلیه مطالعات استریولوژیک با استفاده از میکروسکوپ متصل به میکروکیتور، دوربین مدار بسته و سیستم رایانه‌ای مجهز به نسخه شماره ۹ نرم افزار Stereo- investigator انجام شد. به منظور تعیین اولین مقطع و حداقل فواصل بین مقاطع، از مطالعه پایلوت استفاده شد. در تمام مراحل نمونه‌گیری جهت مطالعات استریولوژیک، رعایت اصل انتخاب تصادفی یکنواخت منظم در نظر گرفته شد. بدین صورت که اولین برش به ضخامت ۳۰ میکرومتر انتخاب (با استفاده از اعداد تصادفی) و پس از آن چهار برش به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و انتخاب شد. سپس ۴۰۰ میکرون از بافت برداشته شده و مجدداً یک برش به ضخامت ۲۰ میکرومتر و چهار برش به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و انتخاب گردید و این عمل تا انتهای نمونه در بلوک پارافینی ادامه پیدا کرد به نحوی که از هر بلوک ۱۵ تا ۱۸ برش ضخیم جهت مطالعات استریولوژیک انتخاب شد. با توجه به این که کلیه مراحل تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی در همه گروه‌ها کاملاً یکسان و مشابه بوده و به روش استاندارد انجام گرفت، لذا میزان چروکیدگی بافتی ناشی از این مراحل در همه گروه‌ها یکسان بوده و اثر آن در محاسبات کمی

جهت مقایسه متغیرها بین گروه‌های مختلف در نظر گرفته نشد.

برای تعیین ارتفاع بافت پوششی با استفاده از سیستم Stereo- investigator فاصله سطح سلول پوششی تا قاعده آن که بر روی غشاء پایه قرار دارد با لنز شیئی ۱۰۰ در ۱۰ سلول از هر مقطع و حداقل ۱۰۰ سلول در یک ماهی اندازه‌گیری شد و میانگین آن گزارش گردید. برای اندازه‌گیری ضخامت طبقات مختلف دیواره معده شامل طبقه مخاطی، زیر مخاطی، عضلانی و سروزی در چهار ناحیه از دو قطر عمود بر هم از داخلی‌ترین مرز تا خارجی‌ترین مرز مربوط به آن طبقه اندازه‌گیری شده و میانگین آن به عنوان ضخامت هر طبقه در هر مقطع در نظر گرفته شد.

برای تعیین نسبت حجمی بافت پوششی و هر طبقات مخاطی، زیر مخاطی، عضلانی و سروزی با استفاده از تکنیک شمارش نقطه‌ای چگالی حجمی (حجم نسبی) هر ساختار نسبت به کل دیواره با استفاده از بزرگنمایی مناسب و گرید نقطه‌ای با فرمول زیر محاسبه شد:

$$V_{V(\text{structure/wall})} = P_{(\text{structure})} / P_{(\text{Wall})}$$

که در آن " $P_{(\text{structure})}$ " تعداد نقاط برخورد کرده با هر ساختار و " $P_{(\text{Wall})}$ " تعداد نقاط گرید که با کل بافت دیواره معده برخورد کرده است می‌باشد.

برای تخمین تراکم عددی یا متوسط تعداد سلول‌های اکسینتیکوپیتیک در هر میلی‌متر مکعب از طبقه زیر مخاط معده از روش دایسکتور نوری بر روی برش‌های ضخیم استفاده شد:

$$N_{V(\text{cell/ref})} := \frac{\sum \rho^-}{\sum A \times h}$$

که " $\sum Q^-$ " تعداد هسته‌های شمارش شده سلول‌های اکسینتیکوپیتیک، " $\sum A$ " مساحت مجموع قاب‌های شمارش شده در همه میدان‌های دید مورد بررسی توسط نرم افزار Stereo- investigator و " $h$ " ارتفاع دایسکتور نوری است.

جدول ۱. ضخامت نواحی مختلف دیواره بدنه معده در گروه‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با کامپوزیت‌ها.

شاخص‌های بافتی	ارتفاع بافت پوششی (میکرومتر)	ضخامت طبقه مخاطی (میکرومتر)	ضخامت طبقه زیر مخاطی (میکرومتر)	ضخامت طبقه عضلانی (میکرومتر)	ضخامت طبقه سروزی
CTR	24/20 ± 1/32 <sup>a</sup>	305/00 ± 5/00 <sup>a</sup>	92/40 ± 1/44	196/60 ± 2/66	38/20 ± 2/99
T1	28/60 ± 0/98 <sup>ab</sup>	321/00 ± 2/45 <sup>ab</sup>	95/20 ± 1/77	202/60 ± 2/50	40/40 ± 0/68
T2	27/60 ± 1/12 <sup>ab</sup>	337/00 ± 3/74 <sup>bc</sup>	92/40 ± 1/03	201/20 ± 2/56	40/80 ± 1/24
T3	29/20 ± 0/49 <sup>ab</sup>	361/00 ± 8/12 <sup>cd</sup>	92/80 ± 1/66	198/60 ± 3/39	40/80 ± 1/36
T4	29/40 ± 1/33 <sup>b</sup>	368/00 ± 6/82 <sup>d</sup>	92/20 ± 1/53	196/80 ± 2/22	44/20 ± 1/07
T5	30/60 ± 1/17 <sup>b</sup>	412/00 ± 9/82 <sup>e</sup>	94/20 ± 1/43	204/00 ± 3/07	40/20 ± 1/24
T6	31/40 ± 1/17 <sup>b</sup>	416/00 ± 6/20 <sup>e</sup>	94/60 ± 1/29	198/80 ± 2/28	40/80 ± 1/53
T7	32/40 ± 1/12 <sup>b</sup>	433/00 ± 8/00 <sup>e</sup>	96/00 ± 1/38	206/00 ± 1/67	40/60 ± 1/12

جدول ۲. نسبت حجمی نواحی مختلف دیواره بدنه معده در گروه‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با کامپوزیت‌ها.

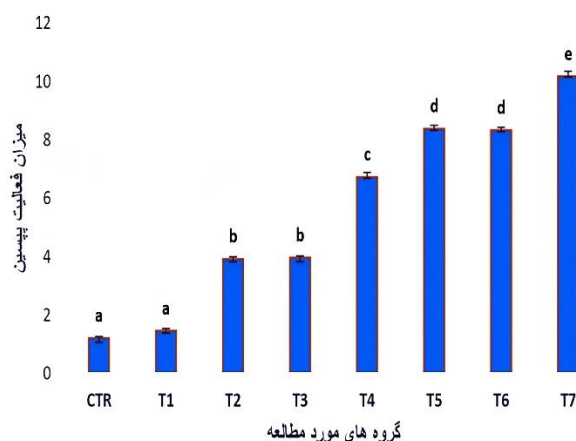
شاخص‌های بافتی	نسبت حجمی طبقه مخاطی به دیواره (درصد)	نسبت حجمی طبقه زیر مخاطی به دیواره (درصد)	نسبت حجمی طبقه عضلانی به دیواره (درصد)	نسبت حجمی طبقه سروزی به دیواره (درصد)
CTR	43/4 ± 0/32 <sup>a</sup>	14/4 ± 0/37 <sup>d</sup>	35/1 ± 0/58 <sup>d</sup>	6/0 ± 0/49 <sup>ab</sup>
T1	44/2 ± 0/32 <sup>ab</sup>	14/3 ± 0/30 <sup>cd</sup>	34/9 ± 0/34 <sup>d</sup>	6/96 ± 0/11 <sup>ab</sup>
T2	45/47 ± 0/11 <sup>b</sup>	13/62 ± 0/16 <sup>bcd</sup>	34/01 ± 0/28 <sup>cd</sup>	6/90 ± 0/23 <sup>ab</sup>
T3	47/28 ± 0/49 <sup>c</sup>	13/31 ± 0/26 <sup>bcd</sup>	32/61 ± 0/18 <sup>bc</sup>	6/70 ± 0/21 <sup>ab</sup>
T4	47/81 ± 0/18 <sup>c</sup>	13/08 ± 0/11 <sup>bcd</sup>	31/94 ± 0/22 <sup>ab</sup>	7/17 ± 0/11 <sup>b</sup>
T5	50/8 ± 0/48 <sup>d</sup>	12/2 ± 0/24 <sup>a</sup>	31/5 ± 0/42 <sup>a</sup>	6/5 ± 0/10 <sup>ab</sup>
T6	50/84 ± 0/52 <sup>d</sup>	12/1 ± 0/28 <sup>ab</sup>	30/1 ± 0/47 <sup>ab</sup>	6/24 ± 0/21 <sup>ab</sup>
T7	51/5 ± 0/43 <sup>d</sup>	12/7 ± 0/25 <sup>a</sup>	30/4 ± 0/31 <sup>a</sup>	6/04 ± 0/14 <sup>a</sup>

متوسط حجم سلول‌های اکسینتیکوپیتیک با روش نوکلئوتور تخمین زده شد. بدین صورت که در بزرگنمایی ۱۰۰۰ (لنز شیئی ۱۰۰ x)، نقطه مرجع در مرکز هندسی سلول اکسینتیکوپیتیک مشخص شد و سپس از طریق برنامه مخصوص آن در نرم افزار سیستم Stereo- investigator دو محور عمود بر هم در نقطه مرجع ایجاد شد، به نحوی که غشاء سلول را در ۴ نقطه قطع کرد. این ۴ نقطه علامت‌گذاری شدند و نرم افزار حجم ساختار (بر حسب میکرومتر مکعب) را بر اساس فرمول  $V_o = 4.3 \pi l_o^3$  محاسبه نمود. که در این فرمول "l<sub>o</sub>" نشان دهنده میانگین قسمت طولی بین نقطه مرجع و نقطه قطع شده غشاء می‌باشد. تعداد سلول‌های ارزیابی شده برابر با تعداد سلول‌های انتخاب شده به وسیله قاب شمارش برای تعیین تراکم عددی بود. در نهایت میانگین اعداد به دست آمده  $(V_o (\mu m^3) = \Sigma V_o / n)$  به عنوان متوسط حجم سلول اکسینتیکوپیتیک در هر مقطع گزارش گردید.

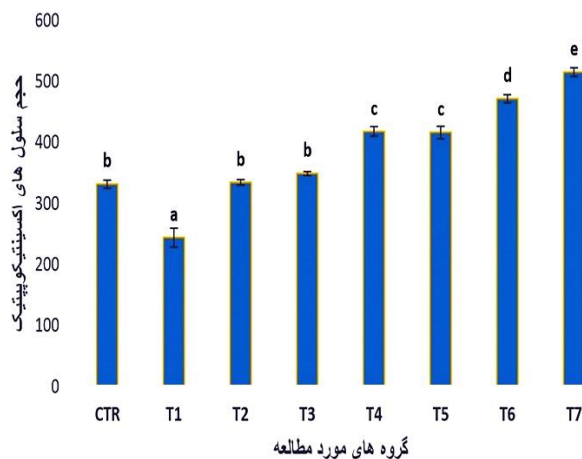
**آنالیز آماری:** در تمام موارد داده‌ها به صورت خطای استاندارد  $\pm$  میانگین (mean $\pm$ SEM) گزارش شده و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ضریب تغییرات (CV) و میانگین ضریب خطا (CE) داده‌های استریولوژی جهت بررسی اعتبار داده‌ها به روش Gundersen و همکاران در سال ۱۹۹۹ محاسبه گردید. جهت بررسی توزیع نرمال داده‌ها، از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف و جهت مقایسه داده‌های مربوط به فعالیت پیسین، هیستومورفومتری و استریولوژیک و مقایسه آن‌ها بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون (آزمون تعقیبی) توکی استفاده شد.

## نتایج

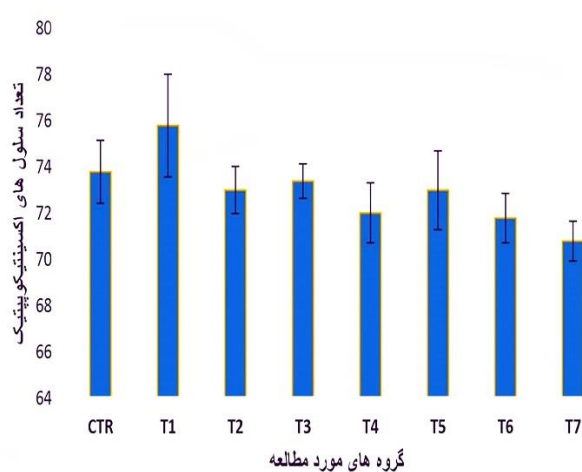
در مطالعه حاضر، میزان فعالیت آنزیم پیسین در گروه‌های دریافت کننده کامپوزیت کیتوزان و نانوکیتوزان در مقایسه با گروه‌های کنترل (CTR) و گروه دریافت کننده کلینوپتیلولیت (T1) افزایش معنی‌داری یافت ( $P=0/000$ ). مقایسه دوزهای مختلف کامپوزیت‌ها نشان داد که بالاترین میزان فعالیت در نانوکامپوزیت‌ها به خصوص در دوز بالا (T7) مشاهده شد (نمودار ۱). ضخامت نواحی مختلف دیواره بدنه (fundus) معده بعد از مصرف کلینوپتیلولیت و کامپوزیت‌های کیتوزان و نانوکیتوزان بارگذاری شده در کلینوپتیلولیت در جدول ۱ نشان داده شده است. مطالعه حاضر نشان داد که ارتفاع بافت پوششی معده در دوز بالای کامپوزیت کیتوزان (T4) ( $P=0/044$ ) و دوزهای مختلف نانوکامپوزیت (T5-T7) افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (به ترتیب  $P=0/006$ ،  $P=0/002$  و  $P=0/000$ ). ضخامت طبقه مخاطی معده با مصرف کامپوزیت‌ها به خصوص نوع نانوکامپوزیت افزایش یافت (T2) در مقایسه با کنترل  $P=0/035$  و T3 تا T7 در مقایسه با گروه کنترل  $P=0/000$ ).



نمودار ۱. میزان فعالیت آنزیم پیسین معده (واحد در لیتر در میلی گرم بافت) در گروه‌های مختلف ماهی قزل آلا رنگین کمان تغذیه شده با کامپوزیت‌ها.



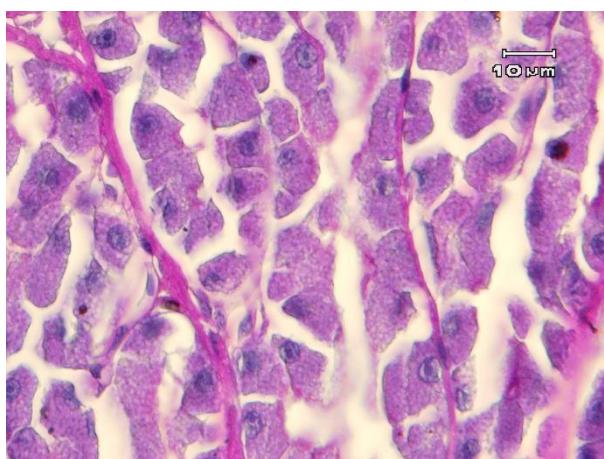
نمودار ۲. متوسط حجم سلول‌های اکسینتیکوپپتیک در هر میلی‌متر مکعب طبقه مخاطی معده در گروه‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با کامپوزیت‌ها.



نمودار ۳. متوسط تعداد سلول‌های اکسینتیکوپپتیک در هر میلی‌متر مکعب طبقه مخاطی (x ۱۰<sup>۴</sup>) معده در گروه‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با کامپوزیت‌ها.

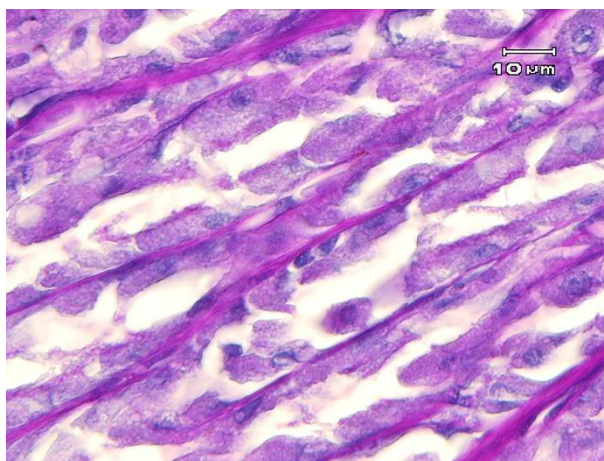
نسبت حجمی نواحی مختلف دیواره بدنه معده بعد از مصرف کلینوپتیلولیت و کامپوزیت‌های کیتوزان و نانوکیتوزان بارگذاری شده در کلینوپتیلولیت در جدول ۲ نشان داده شده است. نسبت حجمی طبقه مخاطی به دیواره معده الگوی مشابه ضخامت طبقه مخاطی را در گروه‌های مختلف نشان داد (T2 در مقایسه با کنترل  $P=0/036$  و T3 تا T7 در مقایسه با گروه کنترل  $P=0/000$ ). در مقابل، نسبت حجمی طبقه زیر مخاطی (T3 در مقایسه با کنترل  $P=0/044$ ، T4 در مقایسه با کنترل  $P=0/008$  و T5 تا T7 در مقایسه با گروه کنترل  $P=0/000$ ) و طبقه عضلانی (T3 در مقایسه با کنترل  $P=0/001$  و T4 تا T7 در مقایسه با گروه کنترل  $P=0/000$ ) به دیواره معده در گروه‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت.

به علاوه، تغییرات در تراکم، مورفولوژی، اندازه و شدت رنگ‌پذیری سلول‌های ترشحی غدد معدی در ناحیه پارین طبقه مخاطی دیواره معده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در گروه‌های مختلف مشاهده شد (تصویر ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶). اندازه و تراکم سلول‌های اکسینتیکوپپتیک (oxynticopeptic cells) غدد معدی در گروه دریافت‌کننده زئولیت (T1) نسبت به گروه کنترل (CTR) کاهش پیدا کرد ( $P=0/000$ ) اما شدت رنگ‌پذیری گرانول‌های سیتوپلاسمی آن به رنگ‌آمیزی PAS دچار تغییر معنی‌داری نشد.



**CTR**

تصویر ۱. میکروگراف هیستولوژیک ناحیه پارین طبقه مخاطی دیواره معده در ماهی قزل آلی رنگین کمان تغذیه شده با جیره پایه (رنگ آمیزی PAS-H، بزرگنمایی ۱۰۰۰×).



**T1**

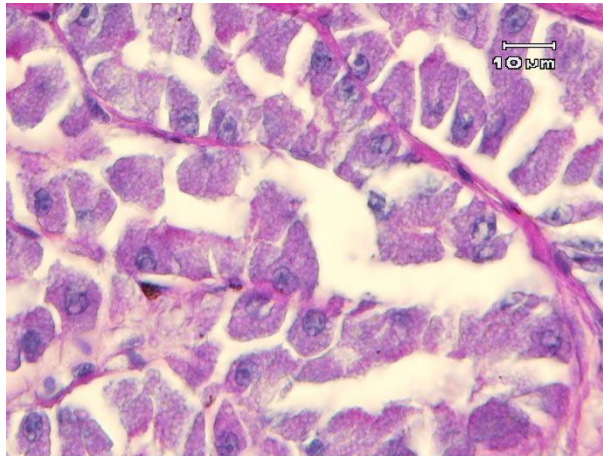
تصویر ۲. میکروگراف هیستولوژیک ناحیه پارین طبقه مخاطی دیواره معده در ماهی قزل آلی رنگین کمان تغذیه شده با کلینوپتیلولیت.

افزودن کامپوزیت کیتوزان با دوزهای متوسط و بالا (T3 و T4) باعث افزایش میانگین حجم سلول‌های اکسینتیکوپپتیک شد ( $P=0/000$ ). این تغییرات در گروه‌های دریافت کننده دوز بالای کامپوزیت کیتوزان (T4) نسبت به دوزهای کم و متوسط (T2 و T3) بیشتر بود ( $P=0/000$ ). اثر اضافه نمودن دوزهای مختلف کامپوزیت نانوکیتوزان بر وضعیت هیستولوژیک سلول‌های اکسینتیکوپپتیک بیشتر از دوزهای مشابه کامپوزیت کیتوزان بود ( $P=0/000$ ), به نحوی که در گروه دریافت کننده دوز بالای کامپوزیت نانوکیتوزان (T5), میانگین حجم سلول‌های ترش‌حی افزایش یافت و سلول‌های بزرگ با گرانول‌های ترش‌حی مشخص که اکثراً به شدت با رنگ PAS واکنش مثبت نشان دادند, قابل مشاهده بود (نمودار ۲). در مقابل, مصرف کامپوزیت‌های کیتوزان و نانوکیتوزان تغییر معنی‌داری در تعداد سلول‌های اکسینتیکوپپتیک معده ماهی‌ها در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرد (نمودار ۳).

## بحث

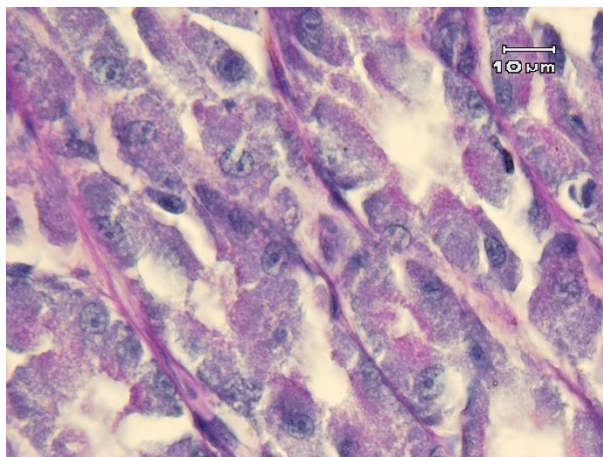
مطالعات پیشین کارایی کیتوزان, نانوکیتوزان و کلینوپتیلولیت به تنهایی و در فرم کامپوزیت بر رشد, تقویت سیستم بیوشیمیایی و ایمنی و بهبود ساختار روده را نشان دادند (۷-۹). در مطالعه حاضر, مصرف کامپوزیت‌های کیتوزان و نانوکیتوزان سبب افزایش فعالیت پپسین و بهبود ساختار بافت‌شناسی معده از نظر ارتفاع بافت پوششی, ضخامت طبقه مخاطی و میانگین حجم سلول‌های اکسینتیکوپپتیک در مقایسه با گروه کنترل گردید.





T3

تصویر ۳. میکروگراف هیستولوژیک ناحیه پارین طبقه مخاطی دیواره معده در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با ۰/۵ گرم کامپوزیت.

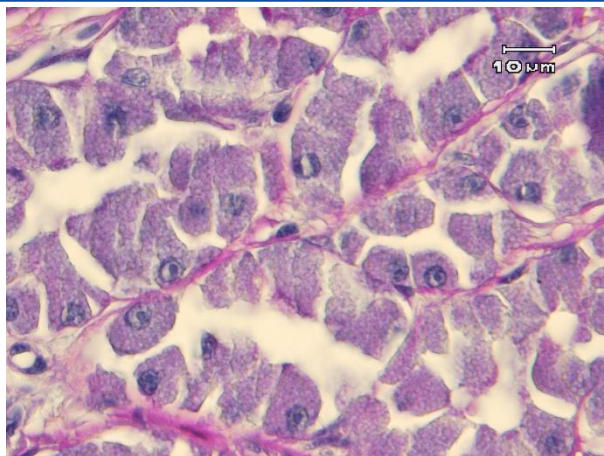


T4

تصویر ۴. میکروگراف هیستولوژیک ناحیه پارین طبقه مخاطی دیواره معده در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با ۵ گرم کامپوزیت.

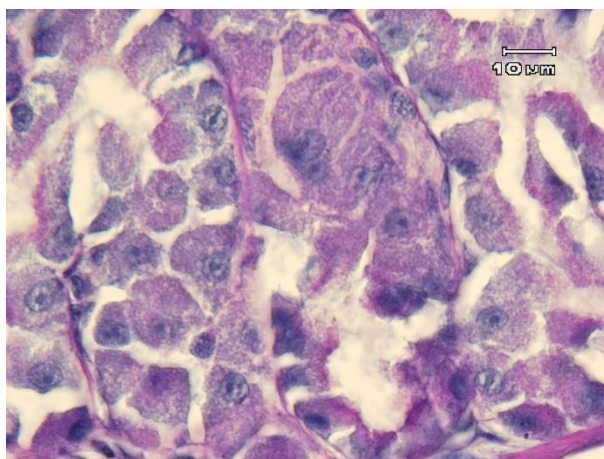
افزودن کامپوزیت‌های کیتوزان و نانوکیتوزان به خوراک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش فعالیت آنزیم پپسین گردید؛ هر چند در مقایسه، کامپوزیت نانوکیتوزان اثر قوی‌تری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. در مطالعات پیشین نیز متعاقب مصرف افزودنی‌های مختلف اثر مشابهی گزارش گردید. به عنوان مثال، عصاره اتانولی بره بوم موجود در خوراک فیل ماهی (*Huso huso*) سبب افزایش فعالیت پپسین گردید (۱۸). در همین راستا، افزودنی شامل گزنه (*Urtica dioica*) و انبه (*Mangifera indica*) در خوراک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قادر به افزایش فعالیت پپسین بود (۱۹). فعالیت آنزیم‌های گوارشی از اعمال مهم متابولیک در بدن جانداران می‌باشد که در نهایت سبب افزایش میزان رشد می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش رشد متعاقب مصرف این کامپوزیت‌ها که در مطالعه قبلی (۹) گزارش گردید تا حدودی مرتبط با افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی مانند پپسین باشد.

ویژگی‌های ساختاری و عملکرد پروتئولیتیک سلول‌های اکسینتیکوپیتیک در ناحیه بدنه معده بسیاری از ماهیان استخوانی واجد معده حقیقی مانند قزل‌آلای رنگین‌کمان به خوبی شناخته شده است (۱۶، ۲۰). به خوبی مشخص شده است که این سلول‌ها می‌توانند پروتئین‌های رژیم غذایی را به زنجیره‌های پپتیدی کوچک‌تر تبدیل کرده و پلیمریزه کنند (۲۱-۲۳). تولیدات و ترشحات این سلول، هضم اولیه و خارج سلولی پروتئین‌های موجود در جیره غذایی و سپس انتقال آن از طریق غشاء به درون سلول را فراهم می‌کند. این عملکرد فرآیندی کارآمدتر نسبت به برداشت پروتئین‌ها با عمل پینوسیتوز و هضم درون سلولی آن‌ها می‌باشد (۲۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که به کارگیری کامپوزیت‌های کیتوزان و نانوکیتوزان تغییری در تعداد سلول‌های اکسینتیکوپیتیک ایجاد نمی‌کند اما استفاده از آن‌ها و به طور ویژه استفاده از



**T6**

تصویر ۵. میکروگراف هیستولوژیک ناحیه پارین طبقه مخاطی دیواره معده در ماهی قزل آلی رنگین کمان تغذیه شده با ۰/۵ گرم نانوکامپوزیت.



**T7**

تصویر ۶. میکروگراف هیستولوژیک ناحیه پارین طبقه مخاطی دیواره معده در ماهی قزل آلی رنگین کمان تغذیه شده با ۵ گرم نانوکامپوزیت.

نانوکیتوزان به صورت وابسته به دوز و مقدار مصرف آن در جیره باعث تغییر در اندازه و حجم این سلول‌ها می‌شود که نشان دهنده افزایش فعالیت و عملکرد آن‌ها در حضور نانوکیتوزان است که نتیجه نهایی آن، افزایش ترشح آنزیم پپسین بود. نتایج ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پپسین معده در مطالعه حاضر نیز این مسئله را تأیید نمود.

در مطالعه حاضر، آنالیز مورفومتریک معده انجام شد تا فهم بهتر اثرات کامپوزیت‌های مورد استفاده در سطح بخشی از دستگاه گوارش انجام شود که نتیجه نهایی آن تأثیر بر رشد ماهی می‌باشد. ارتفاع بافت پوششی در گروه‌های تیمار شده با کامپوزیت‌ها به خصوص از نوع نانوکامپوزیت‌ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. بررسی مطالعات قبل نشان داد که بافت پوششی نواحی مختلف معده در ماهیان استخوانی واجد معده حقیقی، از نوع استوانه‌ای ساده است که هسته در ناحیه نزدیک به قاعده قرار دارد و در سیتوپلاسم رأسی آن‌ها موسین قابل مشاهده می‌باشد (۲۰). سلول‌های پوششی معده در اکثر ماهیان استخوانی، موسین خنثی تولید می‌کنند که موکوس ترشح شده توسط آن‌ها نقش محافظتی برای مخاط ایفا می‌نماید (۲۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از نانوکیتوزان به صورت وابسته به دوز باعث افزایش ارتفاع بافت پوششی شد. به نظر می‌رسد افزایش ارتفاع سلول‌های پوششی نشان دهنده افزایش کارایی و فعالیت آن‌ها می‌باشد.

استفاده از کامپوزیت کیتوزان به صورت وابسته به دوز باعث افزایش ضخامت طبقه مخاطی معده شد. در این مورد اثر فرم نانوکیتوزان به طور معنی‌داری بیشتر از کیتوزان بود. طبقه مخاطی ناحیه بدنه معده اساساً از غدد لوله‌ای منشعب ساده‌ای تشکیل شده است که دارای سلول‌های ترشحی اکسینتیکوپپتیک می‌باشد. مابین غدد بافت همبند نازک مربوط به پارین (لامینا پروپریا) و بستر مویرگی بسیار

ظریف قرار دارد (۲۶). از آنجا که تعداد سلول‌های ترش‌خ‌ی غدد تغییر معنی‌داری پیدا نکرد اما اندازه و حجم آن‌ها به واسطه مصرف کیتوزان و بالاخص نانوکیتوزان به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد، لذا به نظر می‌رسد افزایش ضخامت و همچنین نسبت حجمی طبقه مخاطی به همین دلیل باشد.

یکی از نتایج جالب توجه مطالعه حاضر اثر استفاده از کیتوزان و نانوکیتوزان بر وضعیت گرانول‌های ترش‌خ‌ی موجود در سیتوپلاسم سلول‌های اکسینتیکوپیتیک بود. مشخص شد که نانوکیتوزان باعث ایجاد واکنش شدیدتر گرانول‌های ترش‌خ‌ی به رنگ آمیزی پرئودیک اسید شیف (PAS) می‌گردد. هرچند به خوبی مشخص شد که وضعیت ساختاری سلول‌های ترش‌خ‌ی غدد معده دقیقاً به عادات غذایی و ترکیب رژیم غذایی ماهی مرتبط است اما این سلول‌ها حاوی پروتئین‌های غنی از آمینواسیدهای مختلف مانند تیروزین، آرژنین و تریپتوفان می‌باشند که نشان دهنده وجود پیش‌سازهای آنزیمی مانند پپسینوژن یا آنزیم‌های گوارشی مشابه است. در سیتوپلاسم رأسی آن‌ها محصولات ترش‌خ‌ی گرانول‌های حاوی موسین‌های خنثی مشاهده می‌شود که در رنگ آمیزی با PAS ارغوانی رنگ می‌شود (۲۴). هرچند مطالعات تکمیلی بیشتری در این مورد نیاز است اما گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد موسین خنثی تولید شده در معده نقش مهمی در انتقال ماکرومولکول‌ها، افزایش کارایی گوارشی، دفاع در برابر باکتری‌ها اثر بافری بر اسیدیته بالای محتوای معده و جلوگیری از آسیب پروتئولیتیک به بافت پوششی معده بر عهده دارد (۲۷).

در کل، مطالعات بسیار محدودی درباره اثرات افزودنی‌های خوراکی بر ساختار بافتی معده ماهی وجود دارد. Mazzoni و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که ترکیب جیره غذایی می‌تواند باعث تغییر در تعداد و عملکرد سلول‌های اکسینتیکوپیتیک گردد. نتایج این مطالعه مشخص نمود که استفاده از روغن‌های ضروری می‌تواند باعث کاهش تعداد این سلول‌ها در غدد معده ماهی شود (۱۶). همچنین تنها در یک مطالعه (۱۵)، افزایش ضخامت لایه مخاطی و عضلانی معده در ماهی تیلاپپای نیل تغذیه شده با عصاره برگ کنار هندی (*Ziziphus mauritiana*) گزارش گردید. هر چند تغییرات مشخصی در ضخامت طبقه مخاطی در تیمارهای مختلف مطالعه حاضر مشاهده شد اما تغییرات معنی‌داری در ضخامت طبقه عضلانی متعاقب استفاده از کامپوزیت کیتوزان و نانوکیتوزان مشاهده نگردید. شایان ذکر است که در کنار اثرات مثبت کیتوزان، اثرات منفی کیتوزان، به خصوص در مقادیر زیاد، بر کارایی رشد و سیستم آنتی‌اکسیدان مربوط به تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در ماهی‌های مختلف مشخص گردیده است (۲۸، ۲۹). بنابراین، استفاده از مقادیر مناسب کیتوزان و نانوکیتوزان در گونه‌های ماهی مهم به نظر می‌رسد.

**نتیجه‌گیری نهایی:** به طور کلی نتایج مطالعه حاضر بیانگر اثرات مثبت کامپوزیت‌های مورد استفاده، به خصوص کامپوزیت نانوکیتوزان بارگذاری شده در کلینوپتیلولیت، بر فعالیت پپسین، ارتفاع بافت پوششی و ضخامت طبقه مخاطی و همچنین میانگین حجم سلول‌های اکسینتیکوپیتیک معده در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد. مطالعات تکمیلی در زمینه بررسی اثرات این کامپوزیت‌ها بر ساختار معده با روش‌های ایمنووهیستوشیمی و real-time PCR به منظور فهم بهتر مکانیسم عمل این افزودنی‌ها توصیه می‌گردد.

## سپاسگزاری

مطالعه حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام گرفته است.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

- Shariatnia Z. Pharmaceutical applications of chitosan. *Adv Colloid Interface Sci.* 2019;263:131-194. doi: [10.1016/j.cis.2018.11.008](https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.008)
- Alishahi A, Aider M. Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: A review. *Food Bioproc Tech.* 2011;5:817-830. doi: [10.1007/s11947-011-0664-x](https://doi.org/10.1007/s11947-011-0664-x)

3. Abdel-Ghani HM, Salem MES. Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish; a review. *Rev Aquac.* 2021;12:438-452. [doi: 10.1111/raq.12326](https://doi.org/10.1111/raq.12326)
4. Wang Y, Li J. Effects of chitosan nanoparticles on survival, growth and meat quality of tilapia, *Oreochromis nilotica*. *Nanotoxicology.* 2011;5:425-431. [doi: 10.3109/17435390.2010.530354](https://doi.org/10.3109/17435390.2010.530354) [PMID: 21039183](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21039183/)
5. Pavelić SK, Medica JS, Gumbarević D, Filošević A, Pržulj N, Pavelić K. Critical review on zeolite clinoptilolite safety and medical applications *in vivo*. *Front Pharmacol.* 2018;9:1350. [doi: 10.3389/fphar.2018.01350](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01350) [PMID: 30538633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30538633/)
6. Ghasemi Z, Sourinejad I, Kazemian H, Rohani S. Application of zeolites in aquaculture industry: a review. *Rev Aquac.* 2018;10:75-95. [doi: 10.1111/raq.12148](https://doi.org/10.1111/raq.12148)
7. Sheikhzadeh N, Kouchaki M, Mehregan M, Tayefi-Nasrabadi H, Divband B, Khatamian M, Khani Oushani A, Shabanzadeh S. Influence of nanochitosan/zeolite composite on growth performance, digestive enzymes and serum biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac Res.* 2017;48(12):5955–5964. [doi: 10.1111/are.13418](https://doi.org/10.1111/are.13418)
8. Hamidian G, Zirak K, Sheikhzadeh N, Khani Oushani A, Shabanzadeh S, Divband B. Intestinal histology and stereology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) administrated with nanochitosan/zeolite and chitosan/zeolite composites. *Aquac Res.* 2018;49:1803-1815. [doi: 10.1111/are.13634](https://doi.org/10.1111/are.13634)
9. Khani Oushani A, Soltani M, Sheikhzadeh N, Shamsaie Mehrgan M, Rajabi Islami H. Effects of dietary chitosan and nano-chitosan loaded clinoptilolite on growth and immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 2020;98:210-217. [doi: 10.1016/j.fsi.2020.01.016](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.01.016) [PMID: 31935551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31935551/)
10. Dawood MAO, Koshio S, Esteban MA. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Rev Aquac.* 2018;10:950-974. [doi: 10.1111/raq.12209](https://doi.org/10.1111/raq.12209)
11. Dawood MAO, Koshio S, Abdel-Daim MM, Van Doan H. Probiotic application for sustainable aquaculture. *Rev Aquac.* 2019;11:907-924. [doi: 10.1111/raq.12272](https://doi.org/10.1111/raq.12272)
12. Mohan K, Ravichandran S, Muralisankar T, Uthayakumar V, Chandirasekar R, Seedeve P, Rajan K. Potential uses of fungal polysaccharides as immunostimulants in fish and shrimp aquaculture: A review. *Aquaculture.* 2019;500:250-263. [doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.10.023](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.023)
13. Hossain MS, Koshio S, Kastemont P. Recent advances of nucleotide nutrition research in aquaculture: a review. *Rev Aquac.* 2020;12:1028-1053. [doi: 10.1111/raq.12370](https://doi.org/10.1111/raq.12370)
14. Elumalai P, Kurian A, Lakshami S, Faggio C, Esteban MA, Ringo E. Herbal immunomodulators in aquaculture. *Rev Fish Sci Aquac.* 2021;29:1-19. [doi: 10.1080/23308249.2020.1779651](https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1779651)
15. Amin A, Asely AE, El-Naby ASA, Samir F, El-Ashram A, Sudhakaran R, Dawood MAO. Growth performance, intestinal histomorphology and growth-related gene expression in response to dietary *Ziziphus mauritiana* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* 2019;512:734301. [doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734301](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734301)
16. Mazzoni M, Lattanzio G, Bonaldo A, Tagliavia C, Parma L, Busti S, Gatta PP, Bernardi N, Clavenzani P. Effect of essential oils on the oxyntopeptic cells and somatostatin and ghrelin immunoreactive cells in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gastric mucosa. *Animals.* 2021;11(12):3401-3410. [doi: 10.3390/ani11123401](https://doi.org/10.3390/ani11123401) [PMID: 34944178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34944178/)
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275. [doi: 10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6) [PMID: 14907713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/)
18. Eslami M, Zaretabar A, Dawood MAO, Mohammadzadeh S, Shahali Y, Ahmadifar E, Sheikhzadeh N, Shahriari Moghadam M, Hoseinifar SH, Van Doan H. Can dietary ethanolic extract of propolis alter growth performance, digestive enzyme activity, antioxidant, and immune indices in juvenile beluga sturgeon (*Huso huso*)? *Aquaculture.* 2022;552:737939. [doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.737939](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737939)
19. Awad E, Austin B, Lyndon A. Effect of dietary supplements on digestive enzymes and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J Am Sci.* 2012;8:858-864.
20. Ostos-Garrido MV, Nuñez-Torres MI, Abaurrea-Equisoain MA. Histological, histochemical and ultrastructural analysis of the gastric mucosa in *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture.* 1993;115:121-132. [doi: 10.1016/0044-8486\(93\)90363-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90363-4)
21. Luiz FS, Gara B, Shields RJ, Bromage NR. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. *Aquaculture.* 1999;176:101-116. [doi: 10.1016/S0044-8486\(99\)00054-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00054-X)

22. Rønnestad I, Dominguez RP, Tanaka M. Ontogeny of digestive tract functionality in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* studied by in vivo microinjection: pH and assimilation of free amino acids. *Fish Physiol Biochem*. 2000;22:225-235. doi: [10.1023/A:1007801510056](https://doi.org/10.1023/A:1007801510056)
23. Zaiss MM, Papadakis IE, Maingot E, Divanach P, Mylonas CC. Ontogeny of the digestive tract in shi drum (*Umbrina cirrosa* L.) reared using the mesocosm larval rearing system. *Aquaculture*. 2006;260:357-368. doi: [10.1016/j.aquaculture.2006.06.001](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.001)
24. Zambonino-Infante JL, Gisbert E, Sarasquete C, Navarro I, Gutiérrez J, Cahu CL. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J.E.F., Bureau, D.P., Kapoor, B.G. editors. 1<sup>th</sup> ed. *Feeding and Digestive Functions of Fishes*. CRC press. Boca Raton, USA. 2008.p.281-348.
25. Trevino L, Alvarez-Gonzalez CA, Perales-Garcia N, Avevalo-Galan L, Uscanga-Martinez A, MorquezCouturier G, Fernandez I, Gisbert E. A histological study of the organogenesis of the digestive system in baysnook (*Peternia splendid* Gunther, 1862) from hatching to the juvenile stage. *J Appl Ichthyol*. 2011;27:73-82. doi: [10.1111/j.1439-0426.2010.01608.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01608.x)
26. Micale V, Mughia U. Comparative ontogeny of the digestive tract in Sharpsnout sea bream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). *Open Mar Biol J*. 2011;5:31-34. doi: [10.2174/1874450801105010034](https://doi.org/10.2174/1874450801105010034)
27. Ekele I, Uchenna N, Okechukwu N, Isaiah A. The stomach of the adult African Catfish (*Clarias gariepinus*, *Siluriformes: Clariidae*) in farm conditions: A morphological and mucin histochemistry analysis. *Rev Med Vet*. 2014;55(1):4-10.
28. Dautremepuits C, Paris-Palacios S, Betoulle S, Vernet G. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2004;137:325-333. doi: [10.1016/j.cca.2004.03.005](https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.03.005) PMID: 15228950
29. Shiao SY, Yu YP. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture*. 1999;179:439-446. doi: [10.1016/S0044-8486\(99\)00177-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00177-5)