مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶۵، شماره ۴، ۲۸۰-۲۷۳

تأثیر سطوح مختلف نوکلئوتید جیره بر فعالیت تنظیم اسمزی زواید باب‌المعدی 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

نوکلئوتید ها از جمله ترکیبات داخل‌سلولی محسوب می‌شوند و نقش کلیدی در تنظیم تمام پروسه های بیولوژیک دارند. تأثیر نوکلئوتید افزودنی جیره در ۳سطح صفر (گروه کنترل)، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد (گروه تیمار)، بر فعالیت زواید باب المعدی (ساک‌های پیلوریک) در تنظیم اسمزی بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) بود. بدین منظور ماهیان با وزن متوسط ۱۲گرم (۳۵ قطعه درسه تکرار برای هر تیمار) برای به مدت ۸ هفته پرورش داده‌شدند. در پایان دورهٔ پرورش تعداد ۱۲ قطعه بچه ماهی از هر تیمار با میانگین وزن ۲۶گرم به‌شوری ۱۸گرم در لیتر معرفی‌گردید. پس از ۷۲ ساعت جهت بررسی حضور و میزان فعالیت ایمنیایی آنزیم Na^+-K^+-ATPase، به روش بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی، از هر تیمار تعداد ۴ قطعه ماهی صید و در محلول بوئن به مدت ۲۴ ساعت فیکس گردیدند و در ادامه مراحل قالبگیری و برش انجام شد. مکان‌یابی ایمنیایی (Immunolocalization) آنزیم Na^+-K^+-ATPase نشان داد که این‌آنزیم در انترسیت‌های زواید باب‌المعدی حضور داشته و میزان این آنزیم در نمونه‌های جیرهٔ غذایی نوکلئوتید ۰/۵ درصد افزایش معنی‌داری ($p<0/05$) نسبت به تیمار صفر و تیمار ۰/۲۵ درصد داشته است. در مجموع می‌توان نتیجه‌گیری کرد که حضور قابل توجه این‌آنزیم در زواید باب المعدی آزاد ماهی خزر دلالت بر نقش تنظیم اسمزی این زواید داشته و تفاوت حضور آن در تیمارهای مختلف نوکلئوتید نشان می‌دهد که این ماده افزودنی می‌تواند با افزایش توان تنظیم یونی بچه ماهیان، نقش مهمی در سازش آنها به‌شوری ۱۸گرم در لیتر داشته باشد.

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

مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر با نام علمی *Salmo trutta caspius* از جمله ماهیان بومی و مهاجر (آنادرموس) دریای خزر می‌باشد که از ارزش غذایی و اقتصادی ویژه‌ای برخوردار است. این ماهی به‌طور عمده در جنوب دریای خزر در سواحل ایران وجود داشته و برای تخم‌ریزی به آب شیرین رودخانه مهاجرت می‌نماید. با توجه به آلودگی منابع آبی و خصوصاً رودخانه، از بین رفتن زیستگاه‌ها و مناطق تخمریزی در رودخانه‌ها و وجود مشکلات متعددی که بر همگان روشن است بقای نسل برخی گونه‌های 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 می‌گیرد) مولدین از دریا به این رودخانه‌ها مهاجرت کرده و عمل تخم‌ریزی انجام می‌دهند. نوزادهای به‌وجود آمده بعد از طی مراحل مختلف رشد و نمو (نوزاد با کیسه زرده =آلووین -بچه ماهی نورس=فرای -پار و اسمولت) به دریای خزر مهاجرت می‌کنند. یکی از مهمترین تغییرات در طی این مراحل رشد، کسب توان مقابله کردن با شوری ۱۳ گرم در هزار آب دریای خزر می‌باشد. به منظور بازسازی ذخایر ماهی آزاد دریای خزر تکثیر و پرورش مصنوعی آن در کارگه تکثیر شیلات واقع در کلاردشت انجام شده و بچه ماهیان پس از گذراندن دوران پر خطر اولیه در رودخانه‌های منتهی به دریا رهاسازی می‌شوند.

انتقال از آب شیرین به آب شور یا لب شور در چرخه زندگی آزاد ماهیان (سالمونیده‌ها) 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 یک‌سری 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، ویتامین‌ها و نوکلئوتیدها متمرکز شده است (۸،۹).

آبشش‌ها، پوست، مثانه و مجرای گوارشی نقشی مهم و هماهنگ با کلیه‌ها، در جهت کنترل مایعات و تنظیم یون‌های بدن دارند (۱۲). از میان این اندام‌ها، مجرای گوارشی دارای یک نقش حیاتی در تنظیم آب و وضعیت الکترولیت‌ها در ماهی می‌باشد (۳۲). در آزاد ماهیان، دستگاه گوارش محل هضم و جذب غذا، تنظیم یون و تعادل آب و همچنین سدی

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۱۲۲-۶۲۵۳۴۹۹ نمابر: ۰۱۲۲-۶۲۵۳۴۹۹ Email: surp78@yahoo.com

www.SID.ir

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 باب المعدی 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 Na^+،K^+-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). علاوه‌بر 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 Na^+ ،K^+-ATPase اغلب به‌عنوان 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 Na^+,K^+-ATPase در آبشش و روده در مقایسه با آزاد ماهی آداپته 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 اپی تلیال 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 آبزی پروی 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 (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 به‌عنوان 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 آبزیان دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. برای این‌کار 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 (کموفورم 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 سرد آبی شهید باهنر کلاردشت پس از طی عملیات رقم بندی تهیه شدند. قبل از ذخیره‌سازی، تانک‌ها به‌وسیله مواد ضد عفونی نظیر هیپو کلریت سدیم کاملاً ضدعفونی، سپس با آب شستشو داده شدند. ماهیان نیز ابتدا با محلول نمک ۴ درصد ضدعفونی 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 به‌عنوان 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. غذادهی بچه ماهیان روزانه به میزان ۴-۷ درصد وزن بدن و در ۵ وعده در ساعات ۸، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۸ انجام شد. مدفوع و دیگر مواد باقیمانده هر روز از مخازن سیفون می‌گردید.

www.SID.ir

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 ۸/۵-۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر و pH آب ۸/۲-۷/۸ در نوسان بود. پس از اتمام دورهٔ 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 بچه‌ماهیان تعداد ۴ قطعه ماهی از هر تیمار صید و بلافاصله در محلول بوئن فیکس گردید.

بافت‌شناسی: به‌منظور عکس برداری و مشاهده بخش‌های مختلف زوائد باب‌المعدی، 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 پارافین‌زدایی و آبگیری، با استفاده از هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری Nikon مطالعه و عکس‌برداری مورد بررسی قرار گرفتند (۲۴،۲۶).

ایمونوهیستوشیمی: برای مطالعه ایمنوهیستوشیمی 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 Na^+,K^+-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 فلوئورسانس انجام گرفت.

برای مطالعه ایمنوهیستوشیمی، لام‌ها بعد از پارافین‌زدایی 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 سی‌سی PBS ۱۰ میلی‌مول + 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، به‌طوری که سطح دارای برش به طرف بالا باشد، چیده شد. برروی هر لام ۲-۳ قطره از آنتی بادی IgG±5 رقیق شده (۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی با ۹۰۰ میکرولیتر BS در یک میلی‌لیتر محلول) به میزان ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای ۱۰ لام در PBS اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از شستشوی آنتی بادی اضافی با PBS، ۳-۲ 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 فلوئورسانس نشدن متمایز شوند. کلیه لام‌ها بعد از قرار دادن لامل روی آنها در جعبه‌های مخصوص چیده و برای حفظ خواص فلوئورسانسی در جای کاملاً تاریک نگهداری شد. لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری فلوئورسانس (Lambda Lamp -1 Leitz Diaplan Coupled to a Ploemopak) با فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر مشاهده و عکس برداری شد (۲۵،۳۱).

نتایج

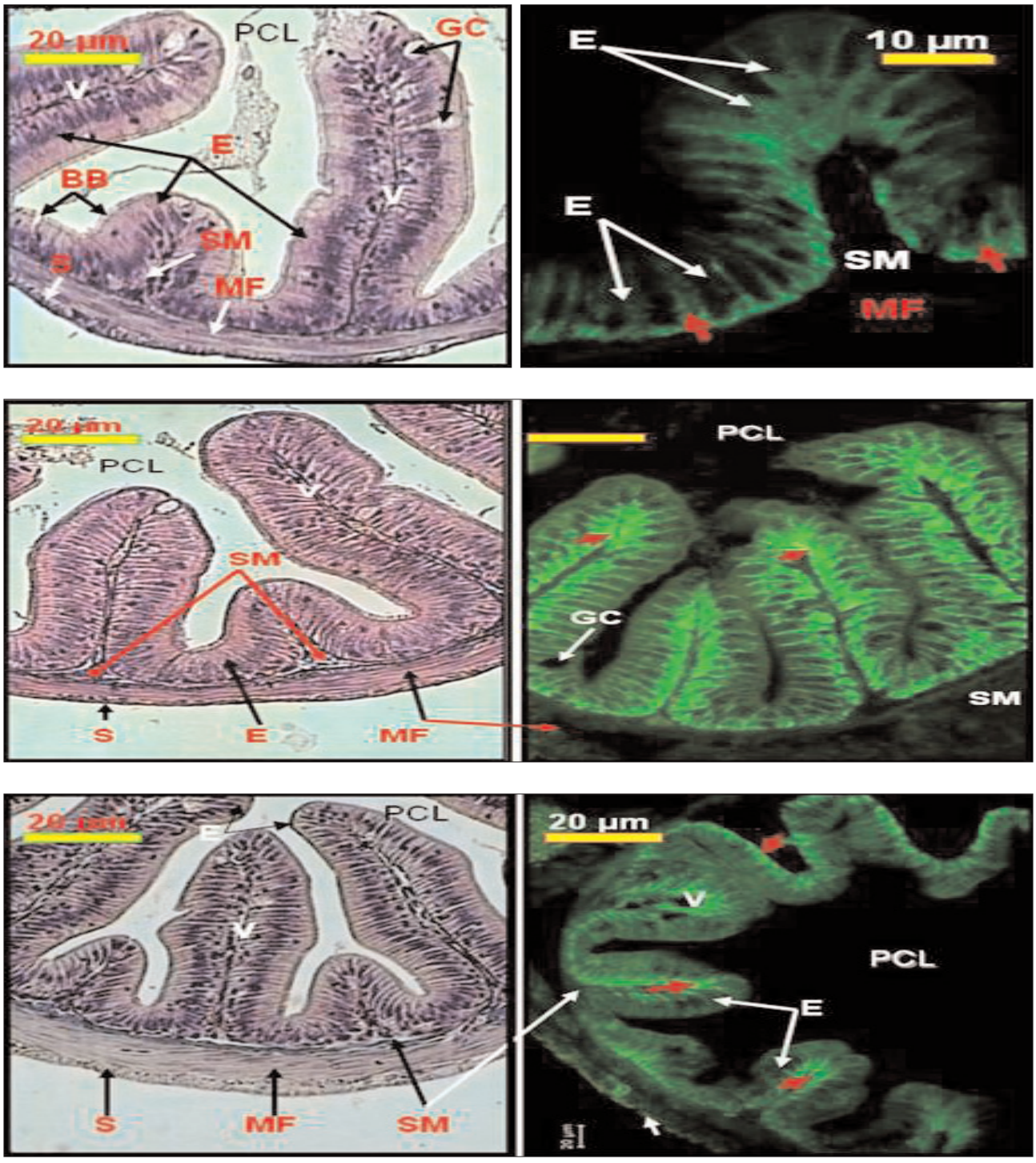
در بررسی بافت‌شناسی زوائد باب‌المعدی، بخش‌های مختلف از جمله لایه پوششی (سلول‌های انتروسیت)، لایه زیرموکوس، لایه سروزا، پرزها، فیبر عضلانی، سلول‌های موکوسی مشاهده گردیدند (تصاویر ۱،۳،۵). همچنین مقایسه تصاویر بافت‌شناسی زوائد باب‌المعدی نشان داد که در تیمارهای حاوی نوکلئوتید، لایه پوششی رشد فاحش و معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دارد (تصاویر ۱،۳،۵).

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

بحث

مطالعه بافت‌شناسی زوائد باب‌المعدی نشان داد که بافت این زوائد همانند روده از چهار لایه شامل لایه سلول‌های پوششی، زیرموکوس، فیبر

www.SID.ir



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

عضلانی و سروزا تشکیل شده است. تحقیقات نشان داده که استفاده از آنتی بادی IgG±5جهت مکان یابی آنزیم Na^{+} ،K^{+}-ATPase و در واقع سلول‌های دخیل در تنظیم اسمزی (یونوسیت) در حشرات آبزی (۲۲)، سخت پوستان (۵۱،۵۰،۴۲،۳۹،۳۸،۳۰،۲۵،۲۲)و ماهیان از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان (۴۱)، باس دریایی (۴۴، ۳۹،۳۸)، گوپی (۴۲)، سالمون چام (۳۹)، خامه‌ماهی (۲۱) و گربه‌ماهی (۲۶) از موفق‌ترین روش‌هاست. نتایج تحقیق حاضر روی زوائد باب‌المعدی نشان داد این آنتی بادی در واکنش با آنزیم Na^{+} ،K^{+}-ATPase ایمونوفلوئورسانس قابل ملاحظه‌ای خصوصاً

www.SID.ir

در تیمار ۰/۵درصد تولید می‌کند و قادر به شناسایی محل حضور آنزیم می‌باشد. حضور این آنزیم در بخش قاعده‌ای- جانبی سلول‌های انتروسیت زوائد باب‌المعدی نشان دهنده شرکت فعال این سلول‌ها در تبادلات یونی می‌باشد. در تحقیقات متعدد انجام شده به نقش زوائد باب‌المعدی در جذب یون‌ها اشاره شده ولی مکانیابی ایمنیایی آنزیم Na^+ ،K^+-ATPase در آنها به‌ندرت مورد توجه قرار گرفته است (۳۴). Veillette و همکاران در سال ۱۹۹۵ بیان کردند که فیزیولوژی انتقال یون‌ها در زوائد باب‌المعدی هنگام سازگاری به آب دریا تحت کنترل محیط و غدد درون ریز بوده و این اندام، محل اصلی تنظیم اسمزی می‌باشد (۴۶). در سالمون چینوک انتقال یافته به آب دریا اندازه‌گیری مستقیم مایع بازجذبی و فعالیت Na^+ ،K^+-ATPase نشان داده که مکانیسم‌های تنظیم اسمزی در زوائد باب‌المعدی در اثر این انتقال تحریک می‌شود؛ تحریک ماهی به کمک کورتیکوئیدهای معدنی نیز باعث تغییرات مشابهی می‌شود که این نشان دهنده سهم بالای تنظیم اسمزی زوائد باب‌المعدی در بین سایر بخش‌های دستگاه گوارش می‌باشد (۴۶). علاوه‌بر این آنزیم، کوترانسپورتر $2Cl^-$ Co-transporter، K^+، Na^+ نیز نقش مهمی در تبادلات یونی ایفا می‌کند. در باس دریایی مکان‌یابی $2Cl^-$ Co-transporter، K^+، Na^+ در قسمت راسی سلول‌های بخش‌های مختلف روده‌ها، زمانی‌که در آب شیرین قرار گیرند و همچنین در قسمت بازال این سلول‌ها، زمانی‌که در آب شور قرار گیرند، نشان داده شده است (۳۷). تغییرات تنظیمی و سازشی در فیزیولوژی تنظیم اسمزی زوائد باب‌المعدی سالمون چینوک (*Onchorhynchus tshawytscha*) Chinook salmon نیز به اثبات رسیده که نشان می‌دهد سهم این زواید در تنظیم اسمزی دستگاه گوارش بالاست (۴۶). با توجه به نتایج تحقیق حاضر و نتایج تحقیقات گفته شده به نظر می‌رسد که در بچه ماهیان ماهی آزاد خزر که در شوری ۱۸ گرم در لیتر قرار داده می‌شوند، آنزیم Na^+ ،K^+-ATPase در زوائد باب‌المعدی نقش پمپ یون‌های سدیم از درون سلول به خون را داشته و کار را برای کوترانسپورتور $2Cl^-$، K^+، Na^+، که نقش خارج کردن یون‌های اضافی از بدن را دارد، مهیا می‌کند. حضور کم آنزیم Na^+ ،K^+-ATPase در زوائد باب‌المعدی ماهیان شاهد بیانگر توانایی کم آنها در مواجه شدن با شوری ۱۸ گرم در لیتر بوده است، لذا به نظر می‌رسد این شوری برای این ماهی مشکل ساز باشد.

یکی از پذیرفته شده ترین فرضیه‌ها در مورد اثرات مفید مشاهده شده نوکلئوتیدهای جیره در ماهیان این است که در شرایط استرس‌زای محیطی مثل کیفیت بد آب، تراکم و دستکاری میزان تقاضای نوکلئوتید در بدن افزایش می‌یابد (۲۸). Burrells و همکاران (۷،۸) اول بار این فرضیه را مطرح ساختند که نوکلئوتیدهای جیره می‌توانند 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.

نتایج بررسی ایشان (۸) نشان داد که سالمون آتلانتیک تغذیه شده با نوکلئوتید جیره بعد از انتقال به آب شور به‌طور معنی‌داری میزان کلر کمتری نسبت به گروه کنترل نشان دادند که بر این اساس فرض کردند که احتمالاً بهبود توانایی تنظیم اسمزی می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت پمپ سدیم- پتاسیم یا افزایش در تعداد سلول‌های 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 استرس‌زا از جمله شوک‌های اسمزی می‌شود و هر چه نرخ DHA/EPA بیشتر شود مقاومت موجود به شوک‌های اسمزی بیشتر می‌شود. از آن جایی که نوکلئوتید جیره می‌تواند بر متابولیسم اسیدهای چرب (Elongation and desaturation)، فسفولیپیدها و پروتئین‌ها تأثیر داشته باشد (۱۱)، احتمالاً بر خاصیت فیزیکی و شیمیایی غشای سلول‌ها نظیر انتقال و نفوذپذیری غشاء و گیرنده‌ها و آنزیم‌های غشاء اثر می‌گذارد. همچنین بیان شده که ترکیب فسفولیپیدی غشاء بر خاصیت جنبشی آنزیم Na^+ ،K^+-ATPase که در تنظیم اسمزی نقش مهمی ایفا می‌کند تاثیر گذار است. اسیدهای چرب غیر اشباع در فسفولیپیدها سبب افزایش فعالیت Na^+ ،K^+-ATPase می‌شوند (۳۷). در تحقیق حاضر همچنین مشخص گردید که نوکلئوتید جیره غذایی تأثیر مثبت و معنی‌داری ($p<0/05$) بر میزان حضور آنزیم Na^+ ،K^+-ATPase در ساک‌های پیلوریک داشته و میزان آن در تیمار ۰/۵ درصد بیشتر از سایر تیمارهاست. با توجه به این نتایج و توضیحات می‌توان گفت که نوکلئوتید جیره می‌تواند با تقویت میزان حضور آنزیم Na^+ ،K^+-ATPase و تغییر اسیدهای چرب غشاء و افزایش ذخیره انرژی در سلول‌های انتروسیت بر انتقال الکترولیت‌ها در ماهی آزاد دریای خزر تأثیرگذار باشد که این فرایند منجر به افزایش توان دفعی $2Cl^-$ Co-transporter، K^+، Na^+ شده و در نهایت مقاومت ماهی را در مقابل شوری آب محیط بیشتر می‌کند.

خلاصه این‌که، یافته‌های این تحقیق مشخص می‌کند که آنزیم Na^+ ،K^+-ATPase در زوائد باب‌المعدی حضور داشته و این آنزیم نقش بسزایی در تبادلات یونی ایفا می‌کند. همچنین مشخص گردید که نوکلئوتید جیره غذایی (خصوصاً در تیمار ۰/۵درصد) تأثیر مثبت معنی‌داری ($p<0/05$) بر میزان حضور آنزیم Na^+ ،K^+-ATPase و افزایش توان تنظیم اسمزی بچه ماهیان آزاد خزر داشته و می‌تواند به‌عنوان یک ماده افزودنی تقویت کننده رشد و توان تنظیم اسمزی مورد استفاده قرار گیرد.

www.SID.ir

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 Japanesee 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., Bryialsen, A. (2003) Gill Na+,K+-ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scaphthalmus maximus*) reared at different tempereture and salinities. Aquaculture. 218: 671-683.
19. Jutfelt, F., Olsen, R. E., Bjornsson, B. T., Sundell, K. (2007) Parr-smolttransformationand 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 killfish fundulus heteroclitus. J. Cell Biol. 70: 157-177.

www.SID.ir

22. Khodabandeh, S. (2006) Na+,K+-ATPase in the gut of the Zygoptera, *Ischnura elegans*, and Anisoptera, *Libellula lydia*, Larvae (Odonata): Activity and immmunocytochemical 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 ans 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, Anguillaanguilla. 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.

www.SID.ir

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 reticulate. 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.

www.SID.ir

J.Vet.Res. 65,4:273-280,2010

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]

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

[2]*Department 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 ceaca entrocytes. 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 nucleodtides intake can be attributed to its role in adaptation of fish to 18 ppt saline.

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

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

www.SID.ir