

اثر مکمل یاری با آرژینین و اورنیتین بر شاخص‌های رشد در ماهی *Oncorhynchus mykiss* قزل‌آلای رنگین‌کمان،

نسیم رستمخانی^۱، رضا ملک زاده ویایه^۲

۱) گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه، ۲) پژوهشکده آرتیمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، نسیم رستمخانی؛
 e-mail: n.rostamkhani@gmail.com

چکیده

مقدمه: ماهیان از مهم‌ترین مدل‌های آزمایشگاهی هستند که مطالعه‌ی فیزیولوژی تغذیه، رشد و هورمون‌ها در آن‌ها می‌تواند به درک بسیاری از سازوکارهای حیاتی در سایر مهره‌داران کمک کند. در این بررسی، تاثیر افزودن مکمل‌های اسید آمینه‌ای در غذا بر شاخص‌های رشد و سطوح فاکتور رشد شبه انسولینی ۱ (IGF-I) در خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد مطالعه قرار گرفته است. مواد و روش‌ها: ماهیان با میانگین وزن اولیه 45 ± 4 گرم، به مدت ۸ هفته با یکی از تیمارهای غذایی زیر تغذیه شدند: تیمار یک، غذای کنسانتره تجاری و ۲٪ ال - آرژینین؛ تیمار دو، غذای کنسانتره و ۲٪ ال - اورنیتین؛ تیمار سه، غذای کنسانتره و ترکیب ۲٪ ال - آرژینین + ۱٪ ال - اورنیتین؛ تیمار چهار، غذای کنسانتره و ترکیب ۳٪ ال - آرژینین + ۱٪ ال - اورنیتین و تیمار پنج، غذای کنسانتره بدون افزودن اسید آمینه (تیمار شاهد). یافته‌ها: بر اساس نتایج به دست آمده، ماهیان تیمار سه دارای بیشترین افزایش وزن ($268/94 \pm 5/84$)٪ و ضریب رشد ویژه ($2/33 \pm 0/05$)٪ در روز بودند. در حالی‌که، بیشترین میزان شاخص کبدی (HSI) ($1/49 \pm 0/04$)٪ مربوط به تیمار چهار بود. این مقادیر به طور معنی‌داری بالاتر از مقادیر همین شاخص‌ها در تیمار شاهد بودند ($P < 0/05$). در مجموع، افزودن اسیدهای آمینه به غذا سبب افزایش سطح هورمون IGF-I در خون، در سراسر دوره‌ی آزمایش شد. در انتهای هفته‌ی هشتم بیشترین (۱۱۸۰) میکوگرم در میلی‌لیتر و کمترین (۹۸۰/۳۵) میکوگرم در میلی‌لیتر) مقادیر IGF-I به ترتیب مربوط به تیمارهای سه و شاهد بودند. نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان‌دهنده‌ی تاثیر مثبت استفاده از مکمل‌های اسید آمینه‌ای، به خصوص افزودن توام دو اسید آمینه ال - آرژینین و ال - اورنیتین در غذا بر تحریک فرایند رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بودند.

واژگان کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، رشد، فاکتور رشد شبه انسولینی ۱ (IGF-I)، مکمل یاری، آرژینین، اورنیتین

دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۱۰ - دریافت اصلاحیه: ۹۲/۴/۳۰ - پذیرش مقاله: ۹۲/۵/۲۱

مقدمه

فیزیولوژی از قبیل رشد در تمام مهره‌داران محسوب می‌شود، منطقی است که فرض کنیم مصرف مواد غذایی و عملکرد غدد درون‌ریز دارای ارتباط نزدیکی با یکدیگر هستند. در واقع، ترشح هورمون‌ها از غدد درون‌ریز به طور مستقیم به وسیله‌ی مصرف غذا فعال می‌شود و مواد غذایی ممکن است عملکرد غدد درون‌ریز را از راه اثر بر سنتز، ترشح و تبدیل هورمون‌ها تحت تاثیر قرار دهند.^۱ عملکرد پیچیده‌ی رشد به طور عمده به وسیله‌ی سیستم هورمون رشد (GH) // فاکتورهای رشد شبه انسولینی (IGF)

رشد بدن فرایند بیولوژیکی دقیق و کاملی است که حاصل اثر عوامل ژنتیکی و هورمونی بوده و همچنین به طور مشخصی وابسته به ترکیبات غذایی مورد استفاده موجودات است.^۱ رشد در ماهیان و مهره‌داران عالی تا حد زیادی به وسیله‌ی هورمون‌ها، که ترشح آن‌ها در ارتباط با دسترسی به مواد غذایی است، کنترل می‌شود.^۲ از آنجا که سیستم غدد درون‌ریز به عنوان تنظیم‌کننده‌ی فرایندهای

را تحت تاثیر قرار می‌دهد.^{۱۶} استفاده از آرژنین منجر به تولید اسید آمینه‌ی دیگری به نام اورنیتینⁱⁱⁱ و در نهایت، سنتز پلی‌آمین‌ها می‌شود.^{۱۷} مشخص گردیده که L-ornithine سبب آزاد شدن و ترشح هورمون رشد از طریق تحریک غده‌ی هیپوفیز می‌شود^{۱۸} و در سنتز پروتئین دخیل است.^{۱۷} ماهی‌ها بزرگ‌ترین، متنوع‌ترین و قدیمی‌ترین گروه مهره داران هستند که در تعداد زیادی از ویژگی‌های مهم مانند ساختار رشد و نمو و سازوکارهای فیزیولوژی و بیوشیمی با پستانداران مشترک می‌باشند. این موجودات نمونه‌های قابل اتکایی برای اغلب مطالعات بیولوژیک برای پستانداران می‌باشند.^{۱۳،۱۹} ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان^{iv} که از اعضای خانواده آزاد ماهیان^v است، به عنوان یک مدل آزمایشگاهی برای انجام آزمایش‌های مربوط به فیزیولوژی، ژنتیک، شناخت سرطان‌ها، سمیت مواد و محیط‌ها، ایمنی و بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. پرورش این ماهی آسان و ارزان است، تولید مثل آن هم در شرایط طبیعی و هم مصنوعی به خوبی شناخته شده و می‌توان مقادیر زیادی از گامت‌ها یا محصولات جنسی آن را در تمام طول سال در اختیار داشت.^{۲۰} به طور معمول، مقادیری از انواع اسیدهای آمینه ضروری در غذاهای تجاری ماهیان وجود دارند، با این حال به نظر می‌رسد وجود مقادیر اضافی از اسیدهای آمینه در غذا به عنوان مکمل غذایی، می‌تواند در تحریک رشد و افزایش شاخص‌های رشد در این موجودات موثر باشد. هدف از پژوهش حاضر ارزیابی و تجزیه و تحلیل فیزیولوژی اثر اسیدهای آمینه مکمل در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در پژوهشکده‌ی آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه انجام گرفت. تعداد ۷۵۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با سن یکسان و میانگین وزنی 4 ± 45 گرم پس از گذراندن دوره‌ی قرنطینه و سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در ۵ تیمار به شرح زیر تقسیم شدند: تیمار یک: تغذیه با غذای کنسانتره تجاری به اضافه ۲٪ ال - آرژنین، تیمار دو: تغذیه با غذای تجاری به اضافه ۲٪ ال - اورنیتین، تیمار سه: تغذیه با غذای تجاری به

تنظیم می‌شود.^۱ ساختار کلی این سیستم در بین مهره‌داران متکامل‌تر به خوبی حفظ شده و شامل هورمون رشد، گیرنده‌ی هورمون رشد، IGF-I، IGF-II، گیرنده‌های IGF و پروتئین‌های متصل به IGF می‌باشد.^{۲-۶} به طور کلی، تولید هورمون رشد در هیپوفیز و ترشح آن، طیف وسیعی از فرایندهای مربوط به تقسیمات سلولی را تحریک می‌نماید که این تحریک با واسطه‌ی فاکتورهای رشد شبه انسولینی (IGF) صورت می‌گیرد.^{۷،۸} این فاکتورها پس از ورود به سیستم گردش خون روی انواع مختلف سلول‌های هدف تاثیر می‌گذارند. IGF-I نقش اصلی را در مجموعه‌ی پیچیده‌ای از فرایندها که رشد، تمایز و تولیدمثل را تنظیم می‌نماید، برعهده دارد.^۹ این فاکتور در جانوران مهره‌دار به طور عمده در کبد سنتز و وارد گردش خون می‌شود و از آن راه، به داخل بافت‌های هدف حمل می‌گردد.^{۱۰،۱۱} مانند آنچه در پستانداران دیده می‌شود IGF-I یک هورمون مهم در فرایند-های مربوط به افزایش رشد و محرکی قوی برای سنتز بافت اسکلتی در ماهیان است و سنتز پروتئین را در ماهیچه تحریک می‌نماید.^{۱۲،۱۳} از دیگر نقش‌های IGF-I در ماهیان می‌توان به تحریک سنتز DNA و جذب گلوکز و اسیدهای آمینه اشاره نمود.^{۵،۸} غذا نقش مهمی در تغییر سطح این هورمون در بدن ایفا می‌کند. تغییر در ترکیبات تغذیه‌ای ماهی، به طور طبیعی یا مصنوعی، سبب تغییر در مقدار و اثرات این هورمون در بدن شده^۲ و امکان کاربرد IGF-I به عنوان شاخصی برای مصرف مواد غذایی و رشد در ماهیان به اثبات رسیده است.^۱

از مواد غذایی مهمی که تاثیر مشخصی بر مقادیر هورمون‌های دخیل در رشد و در نتیجه، رشد ماهیان دارند اسیدهای آمینه هستند. گیلوردⁱ و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند کمبود تریپتوفان در رژیم غذایی منجر به کاهش رشد و کاهش سطح IGF-I پلاسما در ماهی سوف دریایی دورگه (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) می‌شود.^{۱۴} یکی از انواع اسیدهای آمینه مورد نیاز آزاد ماهیان، آرژنینⁱⁱ می‌باشد. طی یک قرن گذشته، مطالعات متعددی روی شناخت ساختار و عملکرد این اسید آمینه انجام شده‌اند و اثرات متنوع آن در موجودات مختلف به اثبات رسیده‌اند.^{۱۵} آرژنین دارای عملکردهای مهمی در رشد می‌باشد و به عنوان نمونه، سنتز پروتئین، پلی‌آمین‌ها و نیتریک اکسید و سطح هورمون رشد

iii - Ornithine
iv - Oncorhynchus mykiss
v - Salmonidae

i - Gaylord
ii - Arginine

اضافه ترکیب ۲٪ ال - آرژینین+۱٪ ال - اورنیتین، تیمار چهار: تغذیه با غذای تجاری به اضافه ترکیب ۳٪ ال - آرژینین+۱٪ ال - اورنیتین، و تیمار پنج: تغذیه با غذای تجاری بدون افزودن اسیدآمینه (تیمار شاهد). هر تیمار دارای سه تکرار و تراکم ماهیان، ۵۰ قطعه ماهی در هر حوضچه با حجم ۷۰۰ لیتر آب بود. غذای تجاری مورد استفاده محصول شرکت فرآدانه (شهرکرد، ایران) و دارای ۳۶٪ پروتئین، ۱۴٪ چربی و حدود ۱۰٪ خاکستر بود. اسیدهای آمینه ال - آرژینین و ال - اورنیتین مورد استفاده در این پژوهش به صورت پودر کریستالی با خلوص ۹۸٪ و ساخت شرکت SIGMA (آمریکا) بودند. برای پایداری اسیدهای آمینه‌ی افزوده شده به غذا و عدم شستشوی آن‌ها در آب، همراه با آن‌ها مقدار ۳ گرم ماده ژلاتینی آلژینات سدیم به ازای هر کیلوگرم غذا، به غذای ماهی اضافه می‌شد. به منظور حذف اثر احتمالی ماده ژلاتینی، همین مقدار ژلاتین به غذای شاهد نیز افزوده شد. طول دوره‌ی آزمایش ۸ هفته بود. در طی این دوره، میانگین‌های دمای آب $14/82 \pm 0/54$ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول، $8/31 \pm 0/36$ میلی‌گرم در لیتر و $7/27 \pm 0/15$ pH بود. برای ارزیابی شاخص‌های رشد، در ابتدای آزمایش و در هفته‌های اول، دوم، چهارم، ششم و هشتم، ماهیان تمام تیمارها مورد زیست سنجی قرار گرفتند. برای این منظور، از هر تکرار تیمارهای آزمایشی، ۱۰ قطعه ماهی به طور کاملاً تصادفی انتخاب شدند و پس از بیهوش کردن آن‌ها با محلول پودر گل میخک^۱ با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر، طول کل هر ماهی به وسیله خطکش با دقت یک میلی‌متر و وزن آن به وسیله ترازوی دیجیتال با دقت یک‌هزارم گرم اندازه‌گیری شدند. سپس، شاخص‌های رشد شامل درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و شاخص کبدی با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شدند:

$$^{1)} \text{ (وزن اولیه) / (وزن اولیه - وزن نهایی) = درصد افزایش وزن}$$

$$\text{ (لگاریتم - (لگاریتم طبیعی وزن نهایی به گرم)) } \times 100 = \text{نرخ رشد ویژه}$$

$$^{2)} \text{ [طول دوره آزمایش (درصد در روز) / طبیعی وزن اولیه به گرم]}$$

$$^{3)} \text{ وزن ماهی (گرم) / وزن کبد (گرم) } \times 100 = \text{شاخص کبدی}$$

درصد افزایش وزن به عنوان ساده‌ترین نشانه تغییرات رشد، میزان افزایش وزن را در یک دوره زمانی نشان می‌دهد

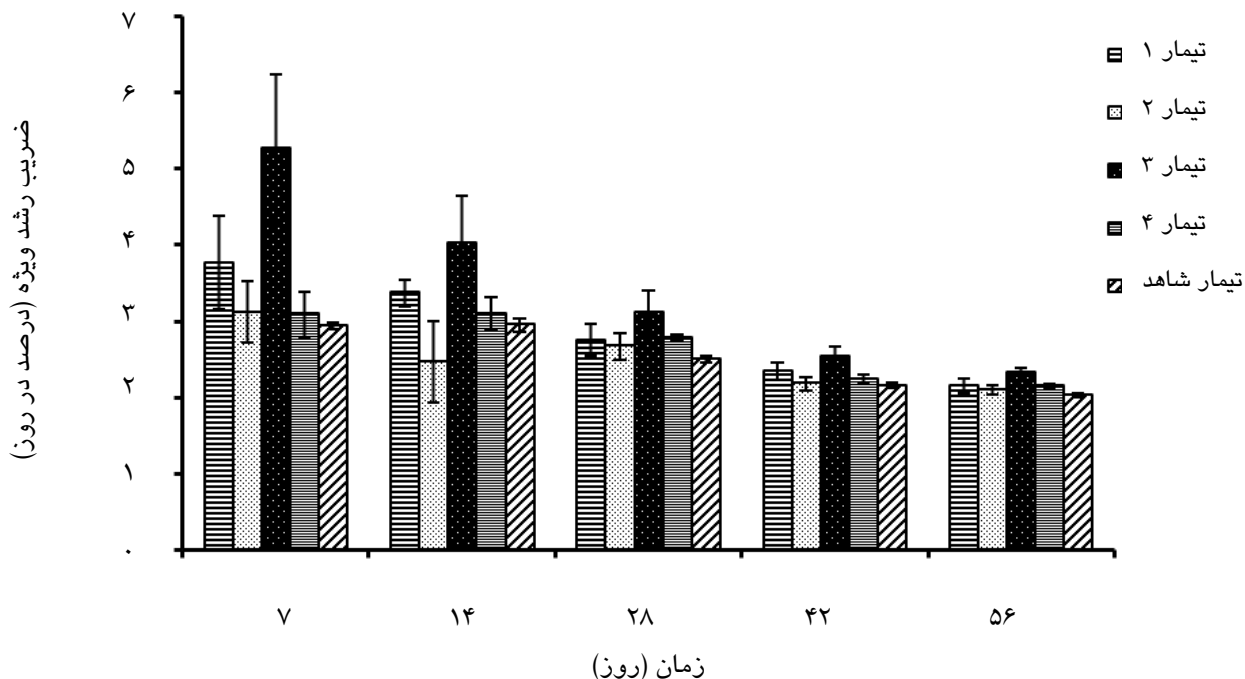
و از تفاضل میانگین‌های وزن اولیه و وزن نهایی به دست می‌آید. نرخ رشد ویژه شاخص معتبری است که با محاسبه‌ی تغییرات لگاریتمی رشد در هر روز و تعمیم آن به کل دوره، تفاوت کلی رشد بین تیمارها را در یک دوره‌ی زمانی نشان می‌دهد. شاخص کبدی یا نسبت وزن کبد به وزن بدن شاخص مهم فیزیولوژی است که با محاسبه‌ی میزان رشد کبد در یک تیمار در اثر یک محرک خارجی، به طور غیرمستقیم برآوردی از افزایش فعالیت‌های کبدی (در مورد این بررسی، نقش کبد در ساخت و ترشح هورمون IGF-I و رشد) ارایه می‌دهد.

به منظور بررسی تغییرات سطح اسیدهای آمینه و هورمون IGF-I در خون ماهیان مورد بررسی، نمونه‌های خون ماهیان در ساعت صفر و هفته‌های اول، دوم، چهارم، ششم و هشتم با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری آغشته به محلول هپارین از محل ورید ساقه دمی آن‌ها گرفته شدند. برای این کار، تعداد ۶ قطعه ماهی از هر تیمار (دو قطعه ماهی از هر تکرار) به صورت تصادفی صید و مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های خون به دست آمده سپس، با دور $1600 \times g$ در ۷ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پلاسماهای هر نمونه به طور جداگانه در میکروتیوب‌های استریل جمع‌آوری، و تا زمان آنالیز نمونه‌ها در فریزر -80 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اندازه‌گیری مقادیر هورمون IGF-I به وسیله‌ی روش الیزا و با استفاده از کیت مخصوص اندازه‌گیری فاکتور رشد شبه انسولینی ۱ در ماهی، (شرکت CUSABIO BIOTECH - چین) به وسیله‌ی دستگاه Microplate reader، مدل Synergy HT (شرکت کمپانی Biotek - آمریکا) و در طول موج 450 ± 2 نانومتر صورت پذیرفت. محدوده‌ی تشخیص کیت $76/9 - 2000$ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. حساسیت سنجش‌ها یا محدوده‌ی کمینه‌ی تشخیص (کمترین غلظت IGF-I ماهی که می‌توان آن را از غلظت صفر تشخیص داد)، $76/9$ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. از نظر دقت آزمایش، مقادیر تغییرات درون و بین سنجش‌ها (Inter and intra-assay Precision) کمتر از ۱۵٪ بودند.

به منظور تجزیه و تحلیل آماری شاخص‌های رشد، پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف، مقایسه‌ی آن‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک سویه و آزمون توکی (Tukey's Test) در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ صورت گرفت. تحلیل آماری

شاهد و سه بودند. در سرتاسر دوره آزمایش، تیمار سه دارای نرخ رشد بالاتری نسبت به سایر تیمارها بود و در پایان دوره، نرخ رشد این تیمار اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد.

تغییرات نرخ رشد ویژه ماهیان نشان داد که این نرخ از ابتدا تا انتهای دوره‌ی آزمایش در تمام تیمارها روند نزولی را طی نموده است (نمودار ۲). کمینه ($2/03 \pm 0/02$) و بیشینه ($2/23 \pm 0/05$) نرخ رشد ویژه، به ترتیب مربوط به تیمارهای

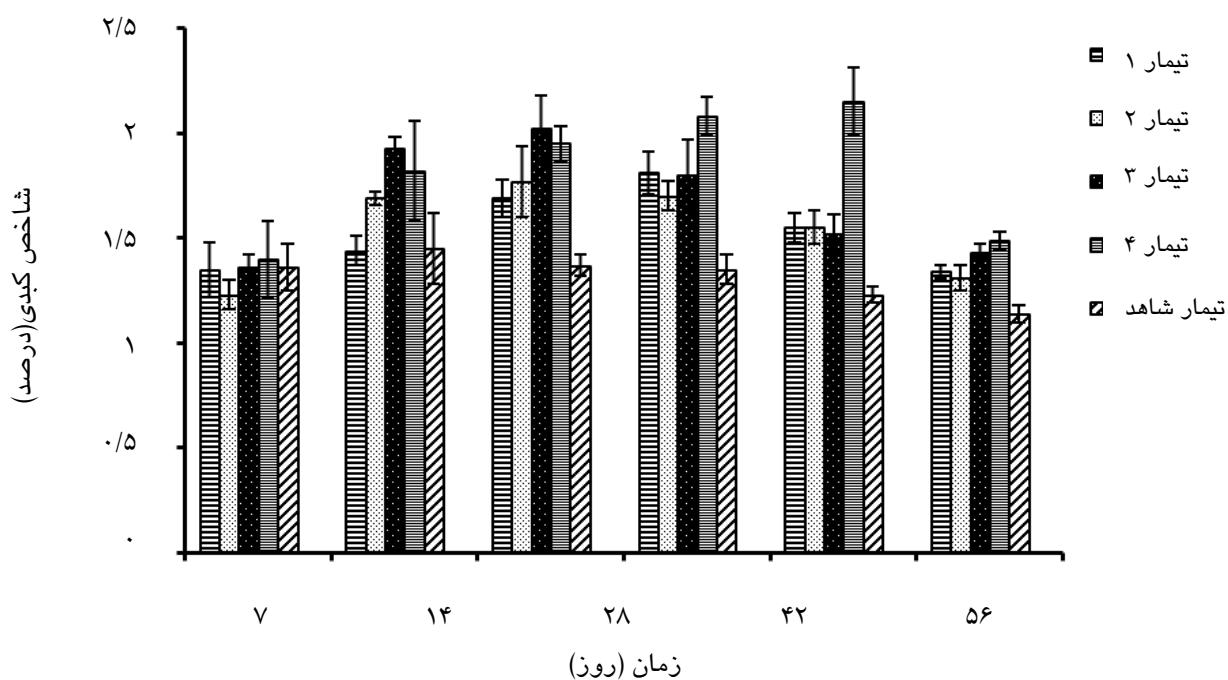


نمودار ۲- تغییرات مقادیر نرخ رشد ویژه در تیمارهای مختلف، در طی دوره آزمایش

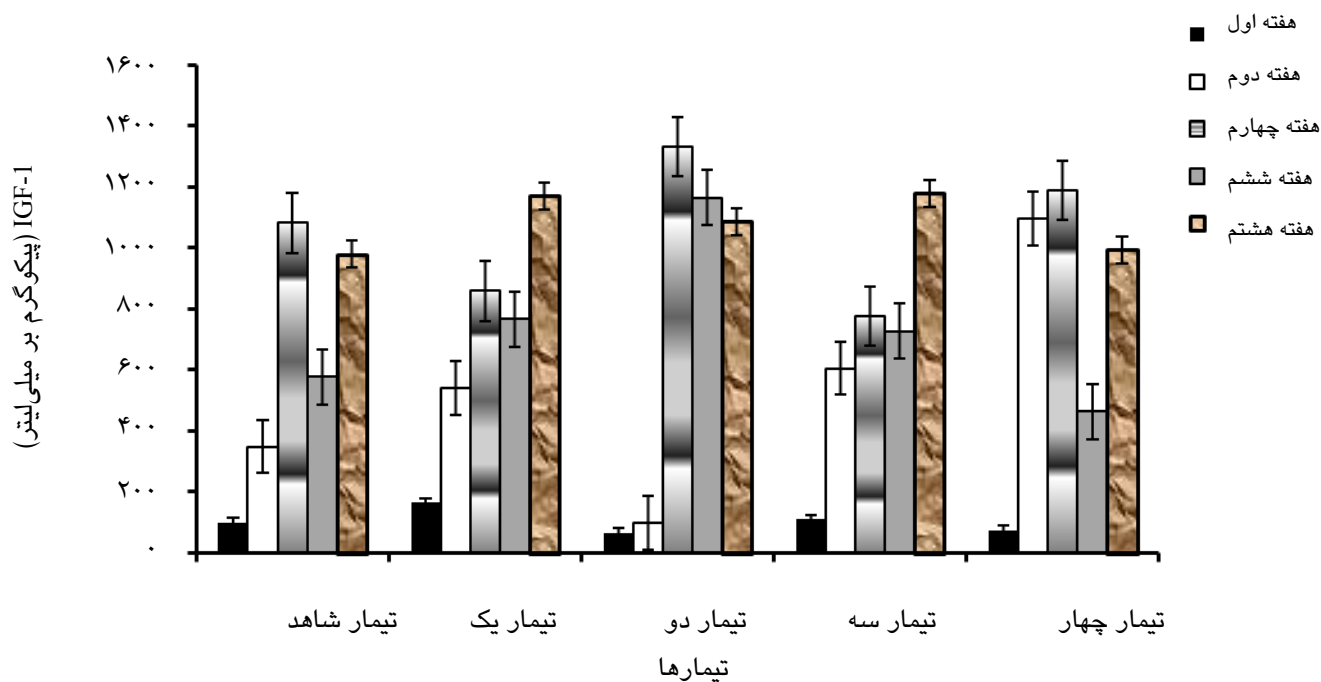
تغییرات مقادیر هورمون IGF-I در تیمارهای مختلف، در طی دوره‌ی آزمایش، در نمودارهای ۴ و ۵ نشان داده شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود مقادیر این هورمون از ابتدا تا انتهای دوره روند صعودی اما نامنظمی را طی نموده است. در هفته‌ی چهارم، افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان IGF-I تیمارها ملاحظه می‌گردد. سپس، در هفته‌ی هشتم میزان این هورمون کاهش و دوباره، در انتهای هفته‌ی هشتم افزایش یافته است. در انتهای آزمایش، بیشترین مقدار IGF-I مربوط به تیمار سه و به میزان ۱۱۸۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود، در حالی‌که تیمار شاهد واجد کمترین میزان این هورمون ($980/35$ پیکوگرم در میلی‌لیتر) بود. آنالیز داده‌ها به روش GML نشان داد که در انتهای هفته اول، چهارم و هشتم بین تیمارها تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد. اما، در انتهای هفته دوم، تیمار ۴ با بیشترین میزان IGF-I ($1097/4$ پیکوگرم در میلی‌لیتر)، تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد.

کمترین و بیشترین مقادیر شاخص کبدی (HSI) مربوط به تیمارهای شاهد و چهار و به ترتیب $1/14 \pm 0/04$ و $1/49 \pm 0/04$ بودند. در کل، در تمام تیمارها مقادیر HSI در ماهیان در ابتدا تا اواسط دوره‌ی آزمایش روندی افزایشی و در انتهای دوره‌ی روند کاهشی داشت. همچنین، مقادیر شاخص کبدی در دو تیمار ۳ و ۴ در سراسر دوره به طور مشخصی بیشتر از تیمارهای دیگر بودند (نمودار ۳). بیشترین مقدار این شاخص در انتهای دوره آزمایش، در تیمار چهار به ثبت رسید. مقادیر شاخص کبدی در همه تیمارها با گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری داشتند.

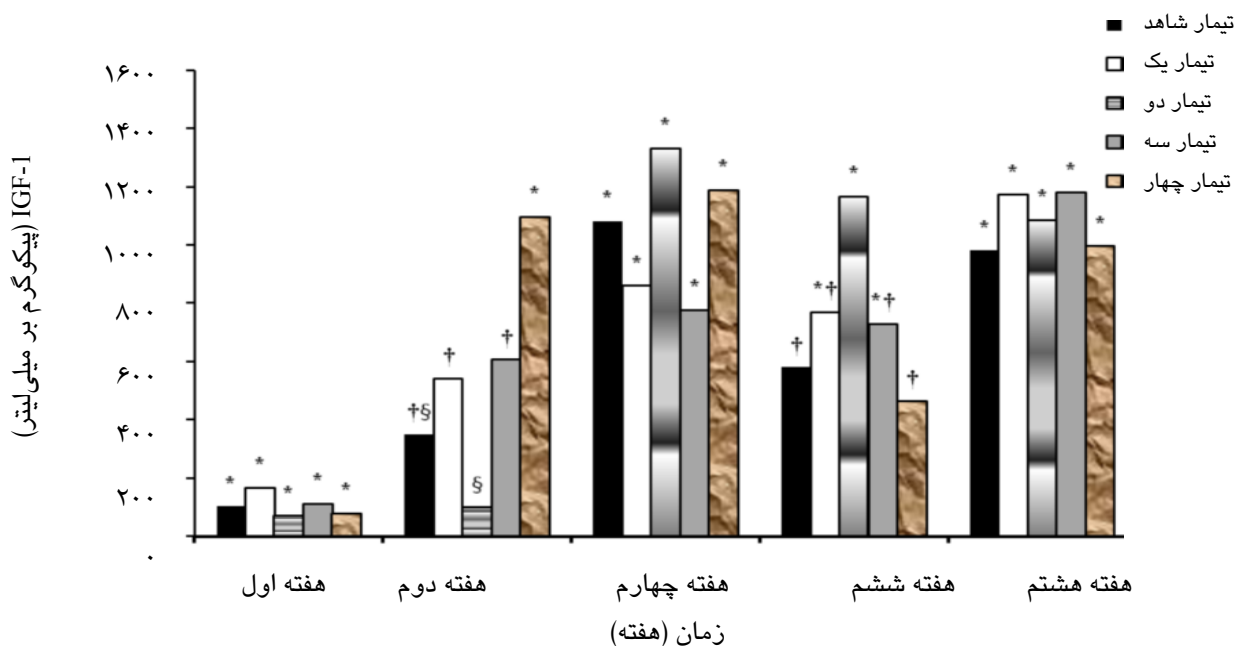
ضرایب تغییرات شاخص‌های رشد در تیمارهای مختلف، در جدول ۱ ارائه شده‌اند. کمینه و بیشینه ضرایب تغییرات در مقادیر افزایش وزن ماهیان، به ترتیب مربوط به تیمارهای شاهد ($1/14$) و یک ($4/66$ ٪) و کمینه و بیشینه تغییرات در مقادیر ضریب رشد ویژه، به ترتیب مربوط به تیمارهای شاهد ($0/99$ ٪) و یک ($4/65$ ٪) بودند. کمترین و بیشترین مقادیر ضریب تغییرات در شاخص کبدی نیز به ترتیب در تیمارهای یک ($2/24$ ٪) و دو ($4/58$ ٪) مشاهده شدند.



نمودار ۳- تغییرات مقادیر شاخص کبدی در تیمارهای مختلف، در طی دوره آزمایش



نمودار ۴- مقایسه‌ی مقادیر هورمون IGF-I در هر یک از تیمارها، در طی دوره آزمایش



نمودار ۵- مقایسه‌ی مقادیر هورمون IGF-I در تیمارهای مختلف، در مقاطع زمانی دوره آزمایش. در هر زمان، تیمارهای دارای حروف متفاوت دارای تفاوت آماری معنی‌دار هستند ($P < 0.05$)

هورمونی و اندوکراینایی پرداخته شده است. از آنجا که شناخت و مطالعه‌ی شاخص‌های رشد در ماهیان همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است، اجزای محور تنظیم‌کننده‌ی رشد و هورمون‌های دخیل در آن، مانند IGF-I، می‌توانند به عنوان نشانگری برای عملکرد رشد در این موجودات مورد استفاده قرار گیرند.^{۲۶} IGF-I به عنوان مهم‌ترین پیش‌برنده‌ی رشد در مهره‌داران مورد نظر است.^۲ بسیاری از مطالعات اولیه روی این هورمون در آزاد ماهیان جوان انجام شده‌اند^۱ و دیده شده که مقادیر IGF-I در خون با نرخ رشد این ماهیان متناسب‌اند. بنابراین، اندازه‌گیری مقادیر IGF-I در جریان خون به عنوان شاخص رشد مورد توجه قرار گرفته است. تغییر در ترکیب رژیم غذایی موجب تغییر در مقادیر IGF-I پلاسما و در نتیجه، منجر به تفاوت در نرخ رشد می‌شود. با این حال، ارزیابی دقیقی از اثرات تنوع در ترکیب رژیم غذایی بر تغییر در سطح IGF-I و رشد وجود ندارد.^۱ در ماهیان استخوانی، هورمون رشد و وضعیت تغذیه‌ای تنها عوامل شناخته شده‌ای هستند که بیان ژن IGF-I را تحت تاثیر قرار می‌دهند.^{۲۷} ویلکینسون^۱ و

هم‌چنین، بین تیمار ۲ و ۳ و ۱ با تیمار ۲ و شاهد تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده شد. در انتهای هفته دوم بین تیمار ۲ و شاهد تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($P < 0.01$). در انتهای هفته‌ی ششم بیشترین میزان IGF-I در تیمار ۲ به میزان ۱۱۶۸/۱ پیکوگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد، بین تیمار ۲ با تیمار ۱ و ۳ تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد، اما بین تیمار ۲ با تیمار ۴ و شاهد تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده گردید ($P < 0.05$).

بحث

به نظر می‌رسد در میان مهره‌داران، ماهیان از نظر الگوها و فرایندهای مربوط به رشد، ویژگی منحصر به فردی را دارا می‌باشند، به طوری‌که به استثناء تعداد اندکی از گونه‌ها، ماهی‌ها تمایل به رشد نامحدود دارند. این به آن معنی است که اندازه‌ی آن‌ها هرگز ثابت نمی‌باشد و رشدشان در طول دوره‌ی زندگی ادامه دارد.^{۲۵} تغییر در ترکیب رژیم غذایی دارای اثرات متعدد فیزیولوژی در ماهیان است و عقیده بر این است که سیستم‌های اندوکرینی اولیه در ماهیان تحت تاثیر مصرف مواد غذایی قرار می‌گیرند.^۲ با این وجود، در مطالعات تغذیه‌ای، کمتر به اثرات تغذیه بر سیستم

شبه انسولینی در خون وجود دارد.^{۲۶} در این مطالعه نیز، چنین ارتباطی در برخی از تیمارها و هفته‌های آزمایش مشاهده و افزودن مکمل‌های اسید آمینه‌ای باعث افزایش سطوح IGF-I در پلاسما خون ماهی‌ها گردید، ولی این رابطه مستمر و قابل تعمیم به تمام تیمارها و مقاطع زمانی نبود. مشخص کردن دقیق چنین ارتباطی نیاز به استفاده از تیمارهای بیشتر اسیدهای آمینه و افزایش دوره مطالعه دارد. با توجه به این که هورمون رشد محرک ترشح IGF-I است و افزایش IGF-I مهار کننده‌ی ترشح هورمون رشد از راه فیدبک منفی است، ممکن است تصور شود که افزایش در میزان IGF-I تحت تاثیر اسیدهای آمینه می‌تواند به کاهش ترشح هورمون رشد و در نتیجه، کاهش رشد ماهی بیانجامد. در پاسخ باید گفت که کنترل به روش فیدبک منفی به خودی خود میزان کل تراوش GH را تنظیم می‌نماید، ولی نمی‌تواند روی پالس‌های تراوش که در پی افزایش برخی از اسیدهای آمینه (مانند آرژینین) ایجاد شده‌اند، تاثیر چندانی بگذارد. با افزایش اسید آمینه و ارسال پیام‌های آن به هیپوتالاموس، میزان هورمون آزادکننده‌ی هورمون رشد (GHRH) و سپس، میزان هورمون رشد افزایش می‌یابد تا با تحریک سراسری، توازن مثبت ازت را در بدن ایجاد نماید. بنابراین، افزایش اسید آمینه بر سوماتواستاتین یا هورمون مهار کننده‌ی هورمون رشد (GHIH) و اثر فیدبکی آن غلبه دارد و سبب می‌شود که هورمون رشد بتواند انتقال بیشتر اسیدهای آمینه از غشای سلولی به درون سلول را با حفظ ازت بدن، تقویت نماید و در نتیجه، اسید آمینه‌ی لازم برای هایپرتروفی ماهیچه‌ها و افزایش پروتئین در بافت‌های ماهیچه‌ای را تامین نماید.^{۲۸}

افزایش وزن و نرخ رشد ویژه از شاخص‌های اصلی نشان‌دهنده‌ی تغییرات رشد در موجودات محسوب می‌شوند.^{۲۹} Terjesen و همکاران در سال ۲۰۰۶ دریافتند استفاده از رژیم‌های غذایی حاوی اسیدهای آمینه منجر به افزایش رشد در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان گردید.^{۱۶} در آزمایشی که روی بچه ماهیان آزاد Coho^{۳۰} انجام گرفت، با افزایش سطح آرژینین در رژیم غذایی، نرخ رشد ویژه به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت و میزان افزایش وزن در گروه تغذیه شده با مقادیر اضافی آرژینین نسبت به گروه شاهد، بیشتر بود.^۲ در بررسی حاضر نیز افزایش سطح

همکاران^۲ در سال ۲۰۰۶ تاثیر مشخص نوع ترکیبات غذایی روی محور IGF-I/GH در قزل‌آلای رنگین‌کمان را گزارش نموده‌اند. در ماهی آزاد Coho نیز مشخص شده روابط هماهنگی بین تغذیه، مقادیر IGF-I پلاسما و رشد وجود دارند. در بررسی حاضر نیز در کل، ارتباط و همبستگی مشخصی بین استفاده از اسیدهای آمینه در غذا، افزایش شاخص‌های رشد ماهی و افزایش مقادیر IGF-I در خون وجود داشت. به طوری‌که، ماهیان تیمار شاهد که از مکمل‌های اسید آمینه‌ای استفاده نکردند، در انتهای دوره‌ی آزمایش واجد کمترین مقادیر شاخص‌های رشد و IGF-I بودند. به عبارت دیگر، سطح متفاوت هورمون IGF-I در تیمارهای مختلف منعکس‌کننده‌ی تفاوت در نرخ رشد ماهیان بودند. افزایش رشد می‌تواند به این علت باشد که فاکتورهای رشد شبه انسولینی رشد را در محیط درونی بدن و به عنوان نمونه، تقسیمات سلولی را در سلول‌های ماهیچه‌ای ماهی تحریک می‌نمایند.^۲ در واقع، می‌توان چنین گفت که IGF-I یک پیونددهنده‌ی اندوکرینی مرکزی در زنجیره‌ی هورمون‌های تنظیم کننده‌ی رشد در سلول‌هاست که واسطه‌ی تعداد زیادی از واکنش‌های پیش برنده رشد توسط هورمون رشد می‌باشد و در نهایت، سبب تغییر در سوخت و ساز و رشد می‌گردد.^{۱۲} مواد غذایی موجب تحریک تولید IGF-I در کبد می‌شوند و مصرف بیشتر و کیفیت بالاتر رژیم غذایی منجر به افزایش آن و رشد موجود می‌شود. این موضوع استفاده از اندازه-گیری مقادیر IGF-I به عنوان ابزار مهمی در تحقیقات تغذیه-ای را توجیه می‌نماید. با این حال، ممکن است تغییرات قابل توجه‌ای در وابستگی بین رشد و IGF-I آشکار شوند.^۱

در هماهنگی با اثرات آنابولیکی شناخته شده IGF-I در سوخت و ساز پروتئین، گزارش‌هایی در مورد تاثیرات تحریکی اسیدهای آمینه مانند آرژینین بر ترشح این هورمون وجود دارند. چنین تاثیراتی ممکن است از راه عملکرد هورمون رشد صورت گیرند که می‌تواند سبب افزایش تولید طبیعی IGF-I شود. با در نظر گرفتن این که تولید طبیعی این فاکتور رشد نیاز به تامین مقادیر کافی اسیدهای آمینه ضروری در رژیم غذایی دارد، اثر آرژینین به عنوان ماده محرک ترشح IGF-I توجیه پذیر است.^{۱۰} یافته‌های لانکفورد^{۱۱} و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد ارتباط مستقیمی بین افزایش مقادیر اسیدهای آمینه در غذا و افزایش سطح فاکتور رشد

آرژنین در غذا سبب افزایش نرخ رشد ویژه و میزان افزایش وزن در مقایسه با گروه شاهد گردید و به ویژه، ماهیان تغذیه شده با ترکیب ۲٪ آرژنین و ۱٪ اورنیتین که در انتهای دوره آزمایش واجد بیشترین مقادیر IGF-I در خون بودند، بالاترین مقادیر افزایش وزن و ضریب رشد ویژه را نیز دارا بودند. شاخص کبدی یا نسبت وزن کبد به وزن بدن نیز، یکی از مهم‌ترین مشخصه‌های رشد و عملکردهای فیزیولوژی در مهره‌داران است. بیرگ^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش نمودند که استفاده از رژیم‌های غذایی حاوی مکمل آرژنین موجب افزایش شاخص کبدی در ماهی آزاد اقیانوس اطلس^{۱۱} می‌شود.^{۲۰} به طور مشابهی، در این مطالعه نیز دیده شد که افزودن آرژنین و اورنیتین به غذا، بر مقادیر شاخص کبدی تأثیری افزایشی داشته است، به طوری که گروه شاهد دارای کمترین میزان این شاخص در مقایسه با تیمارهای تغذیه شده با مکمل‌های اسید آمینه‌ای بود. چنین تأثیری به ویژه به دلیل جایگاه کبد به عنوان منبع فعالیت‌های سوخت و سازی و محل ترشح هورمون‌های دخیل در رشد قابل توجه است. اگرچه وجود آنزیم‌های دخیل در سیکل اوره در طیف گسترده‌ای از ماهیان استخوانی گزارش شده، توانایی واقعی استفاده از برخی از واسطه‌ها برای سنتز آرژنین تنها برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش گردیده است.^{۲۱} به نظر می‌رسد که اورنیتین به عنوان منبعی برای تامین نیاز به آرژنین در سنتز پروتئین به کار می‌رود. آرژنین از طریق اورنیتین، پیش‌سازی برای پلی‌آمین‌های پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین است و از آنجا که سلول‌های بسیاری برای پیشینه رشد خود به این پلی‌آمین‌ها نیاز دارند، اهمیت این مسیرهای متابولیکی در افزایش نرخ رشد در ماهیان تغذیه شده با مقادیر بالای آرژنین ممکن است مورد توجه قرار گیرد.^{۲۲} پلی‌آمین‌ها از اجزای ضروری تمام سلول‌های زنده می‌باشند و هر اندامی برای رشد و سوخت و ساز خود به پلی‌آمین‌ها نیاز دارد. اگرچه هر سلولی دارای ظرفیت سنتز پلی‌آمین‌ها می‌باشد، بدن به تهیه پلی‌آمین‌ها از راه مواد غذایی متکی می‌باشد. در نتیجه، تفاوت‌های رشد در این آزمایش می‌تواند ناشی از افزایش غلظت اورنیتین در بافت‌ها به عنوان ماده‌ای پیش‌ساز برای سنتز پلی‌آمین‌ها و در نتیجه، عاملی برای افزایش رشد باشند.^{۲۳} با در نظر داشتن نقش ال - اورنیتین در ترشح هورمون رشد از راه

تحریک غده‌ی هیپوفیز،^{۱۸} بالاتر بودن میزان رشد در ماهی‌های تغذیه شده با این اسید آمینه، در مقایسه با گروه شاهد قابل پیش‌بینی بود.

مطالعه روی روابط و سازوکارهای فیزیولوژی می‌تواند برای تعیین نیازهای حیاتی در موجودات مختلف مفید باشد. برای فورمولاسیون مناسب غذا باید شناخت کافی از فیزیولوژی تغذیه یک موجود به دست آورد. چنین غذایی باید تامین کننده‌ی مقادیر کافی و نسبت‌های متعادلی از ترکیبات تغذیه‌ای ضروری و مواد افزودنی باشد. ماهیان به خوبی می‌توانند به عنوان الگوهای آزمایشگاهی برای تکمیل داده‌های مربوط به درک پدیده‌های فیزیولوژی در مهره‌داران مورد استفاده قرار گیرند، زیرا بسیاری از ساختارهای ژنتیکی و هورمونی و سازوکارهای فیزیولوژی در آنها مشابه مهره‌داران عالی هستند. در این میان، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قابلیت و مقاومت بیشتری در برابر انجام دستکاری‌ها و آزمایش‌های مختلف، نسبت به ماهیان کوچک‌تر دارد و امکان برداشت و تهیه‌ی مقادیر بیشتری از بافت‌ها یا سلول‌های آن برای انجام آنالیزهای بیوشیمیایی، ایمنی شناختی و ژنتیک مولکولی وجود دارد.^{۲۴} این ماهی به دلیل شباهت جذب پپتیدها و اسیدهای آمینه در آنها با مهره‌داران عالی‌تر مانند انسان، نمونه‌ی منحصر به فردی برای مطالعات مرتبط در انسان می‌باشند.^{۲۵} هر چه پیوستگی تحقیقات کلاسیک مربوط به تغذیه با آنالیزهای هورمونی بیشتر باشد، می‌تواند به درک پایه‌ای از فیزیولوژی اندوکرینی در ماهی‌ها کمک نماید. داده‌های مربوط به عملکرد طبیعی غدد درون‌ریز باید در طی آزمایش‌های تغذیه‌ای جمع‌آوری شوند تا اهمیت هورمون‌ها در تنظیم رشد شناخته شود.^{۲۶} روند تولید، ترشح و عملکرد هورمون‌های GH و IGF در تمام مهره‌داران به طور تقریبی مشابه هم است. در بسیاری از بررسی‌ها هر دوی این هورمون‌ها همزمان اندازه‌گیری و مورد سنجش قرار می‌گیرند، ولی با توجه به این که رشد در موجودات نتیجه ترشح و اثر IGF-I است - که خود تحت تأثیر GH قرار دارد - می‌توان با اندازه‌گیری IGF-I به طور غیر مستقیم به عملکرد GH هم پی برد. البته، با توجه به اثرات فیدبکی افزایش IGF-I بر ترشح GH، در چنین مطالعاتی بهتر است مقادیر هورمون رشد نیز اندازه‌گیری شود. به علاوه، دستیابی به نتیجه جامع و کامل در این مورد منوط به مطالعه‌ی عوامل دیگری مانند گیرنده‌ها یا پروتئین‌های اتصالی به هورمون رشد و حتی ژن‌های دخیل

i - Berge

ii - Salmo salar L

آمینه یافته‌های ملموسی را در ماهیان مورد بررسی به همراه داشت. بنابراین، با توجه به یافته‌های به دست آمده استفاده از این مکمل‌ها برای بهبود شاخص‌های رشد در ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان قابل توصیه است. هر چند، همان‌طور که گفته شد لازم است تا مطالعات تکمیلی با استفاده از سطح و ترکیبات متفاوتی از این اسیدهای آمینه و نیز طول دوره بیشتر آزمایش با استفاده از ماهیان با سنین مختلف انجام گیرند.

در این سازوکار می‌باشد. با توجه به محدودیت‌های مطالعه تمام عوامل در یک بررسی یا دوره‌ی زمانی، می‌توان با انجام مطالعات موردی و در نظر گرفتن برخی شاخص‌های اصلی و مهم، به درک تاثیر عوامل مختلف بر شاخص‌ها و سازوکار رشد در مهره‌داران کمک نمود. در پژوهش حاضر، استفاده از مکمل‌های اسید آمینه‌ای سبب بهبود شاخص‌های رشد و در مقاطعی، افزایش سطح هورمون IGF-I گردید. به طوری‌که، استفاده‌ی ترکیبی یا جداگانه هریک از این اسیدهای

References

1. Beckman BR. Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 170: 233-52.
2. Fox BK, Breves JP, Davis LK, Pierce AL, Hirano T, Grau EG. Tissue-specific regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during fasting and re-feeding: Importance of muscle expression of IGF-I and IGF-II mRNA in the tilapia. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 166: 573-80.
3. MacKenzie DS, VanPutte CM, Leiner KA. Nutrient regulation of endocrine function in fish. *Aquaculture* 1998; 161: 3-25.
4. Gabillard JC, Bahrami Kamangar B, Montserrat N. Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Endocrinol* 2006; 191: 15-24.
5. Li M, Raine JC, Leatherland JF. Expression profiles of growth-related genes during the very early development of rainbow trout embryos reared at two incubation temperatures. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 153: 302-10.
6. Shepherd BS, Johnson JK, Silverstein JT, Parhar IS, Vijayan MM, McGuire A, et al. Endocrine and orexigenic actions of growth hormone secretagogues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol* 2007; 146: 390-9.
7. Nelson SN, Van Der Kraak G. Characterization and regulation of the insulin-like growth factor (IGF) system in the zebrafish (*Danio rerio*) ovary. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 168: 111-20.
8. Wilkinson RJ, Porter M, Woolcott H, Longland R, Carragher JF. Effects of aquaculture related stressors and nutritional restriction on circulating growth factors (GH, IGF-I and IGF-II) in Atlantic salmon and rainbow trout. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2006; 145: 214-24.
9. Berishvili G, Baroiller JF, Eppler E, Reinecke M. Insulin-like growth factor-3 (IGF-3) in male and female gonads of the tilapia: Development and regulation of gene expression by growth hormone (GH) and 17 α -ethinyl-estradiol (EE2). *Gen Comp Endocrinol* 2010; 167: 128-34.
10. Baños N, Planas JV, Gutiérrez J, Navarro I. Regulation of plasma insulin-like growth factor-I levels in brown trout (*Salmo trutta*). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1999; 124: 33-40.
11. Small BC, Peterson BC. Establishment of a time-resolved fluoroimmunoassay for measuring plasma insulin-like growth factor 1 (IGF-I) in fish: effect of fasting on plasma concentration and tissue mRNA expression of IGF-1 and growth hormone (GH) in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domest Anim Endocrinol* 2005; 28: 202-15.
12. Dyer AR, Upton Z, Stone D, Thomas PM, Soole KL, Higgs N, et al. Development and validation of a radioimmunoassay for fish insulin-like growth factor I (IGF-I) and the effect of aquaculture related stressors on circulating IGF-I levels. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 135: 268-75.
13. Li M, Greenaway J, Raine J, Petrik J, Hahnel A, Leatherland J. Growth hormone and insulin-like growth factor gene expression prior to the development of the pituitary gland in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos reared at two temperatures. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2006; 143: 514-22.
14. Gaylord TG, Rawles SD, Davis KB. Dietary tryptophan requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *Aquaculture Nutrition* 2005; 11: 367-74.
15. Wu G, Morris Jr SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem Journal* 1998; 336: 1-17.
16. Terjesen BF, Lee KJ, Zhang Y, Failla M, Dabrowski K. Optimization of dipeptide-protein mixtures in experimental diet formulations for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) alevins. *Aquaculture* 2006; 254: 517-25.
17. Sugino T, Shirai T, Kajimoto Y, Kajimoto O. L-Ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism. *Nutr Res* 2008; 28: 738-43.
18. Teshima S, Ishikawa M, Shah Alam M, Koshio S, Michael FR. Supplemental effects and metabolic fate of crystalline arginine in juvenile shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 2004; 137: 209-17.
19. Hardy RW. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Webster, C.D. and Lim, C.E, editors. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. New York: CABI Publishing, 2002; p 184-202.
20. Thorgaard GH, Bailey GS, Williams D, Buhler DR, Kaattari SL, Ristow SS, et al. Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2002; 133: 609-46.
21. Xue M, Luo L, Wu X, Ren Z, Gao P, Yu Y, et al. Effects of six alternative lipid sources on growth and tissue fatty acid composition in Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture* 2006; 260: 206-14.
22. Barnes ME, Brown ML, Rosentrater KA. Initial observations on the inclusion of high protein distillers dried grain into rainbow trout diets. *The Open Fish Science Journal* 2012; 5: 21-9.

23. Verslycke T, Vandenberg GF, Versonnen B, Arijs K, Janssen CR. Induction of vitellogenesis in 17 α -ethinylestradiol-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a method comparison. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2002; 132: 483-92.
24. Isermann DA, McKibbin WL, Willis DW. An analysis of methods for quantifying crappie recruitment variability. *North American Journal of Fisheries Management* 2002; 22: 1124-35.
25. Marques CL, Rafael MS, Cancela ML, Laizé V. Establishment of primary cell cultures from fish calcified tissues. *Cytotechnology* 2007; 55: 9-13.
26. Lankford SE, Weber GM. Associations between plasma growth hormone, insulin-like growth factor-I, and cortisol with stress responsiveness and growth performance in a selective breeding program for rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture* 2006; 68: 151-9.
27. Sakamoto T, Hirano T. Expression of insulin-like growth factor I gene in osmoregulatory organs during seawater adaptation of the salmonid fish: Possible mode of osmoregulatory action of growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90: 1912-6.
28. Hossner KL, editor. *Hormonal regulation of farm animal growth*. Wallingford: CABI; 2005. p. 240.
29. Luzzana U, Hardy RW, Halver JE. Dietary arginine requirement of fingerling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 1998; 163: 137-50.
30. Berge GE, Sveier H, Lied E. Effects of feeding Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) imbalanced levels of lysine and arginine. *Aquaculture Nutrition* 2002; 8: 239-48.
31. Dabrowski K, lee KJ, rinchard J. The smallest vertebrate, teleost fish, can utilize synthetic dipeptide-based diets. *J Nutr* 2003; 133: 4225-9.

Original Article

A Study on the Effects of Supplementary L-arginine and L-ornithine on the Growth Indices in Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*

Rostamkhani N¹, Malekzadeh-Viayeh R²

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, & ²Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University, Urmia, I.R. Iran

e-mail: n.rostamkhani@gmail.com

Received: 01/03/2014 Accepted: 12/08/2014

Abstract

Introduction: Fish are useful models for physiological studies in which using nutritional, growth and hormonal indices can lead to the understanding of several biological mechanisms in vertebrates. In this study, the effects of the addition of two amino acids, L-arginine and L-ornithine, to a commercial feed on the growth indices and the blood levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* were examined. **Materials and Methods:** The fish (average initial weight 45±4 g) were fed for 8 weeks with one of the following 4 dietary treatments: Commercial trout diet supplemented with 2% L-arginine-(T1) 2% L-ornithine-(T2) 2% L-arginine + 1% L-ornithine-(T3); 3% L-arginine + 1% L-ornithine-(T4) and the commercial feed without addition of the amino acids (controls). **Results:** According to the results, maximum weight gain (268.94±5.84%) and specific growth rate (SGR) (2.33±0.05% day⁻¹) were observed in the fish of group T3, while maximum hepatosomatic index (HSI) (1.49±0.04%) was recorded in group T4. These amounts were significantly higher than their counterpart indices of the control group (P<0.05). Supplementing the feed with the amino acids, overall, increased IGF-I levels throughout the study period. At the end of the eighth week, in the T3 and control groups maximum and minimum IGF levels were 1180 pg/ml and 980.35 pg/ml respectively. **Conclusions:** Results of this study showed the positive effects of providing fish diet with additional amino acids, especially a combination of arginine and ornithine, on growth promotion in rainbow trout.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, Growth, Insulin-like growth factor-I (IGF-I), Amino acid supplementation, L-arginine, L-ornithine