بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد زیست شناسی- فیزیولوژی جانوری

بررسی تأثیر افزودن مکمل های اسید آمینه‌ای در غذا بر رشد و تغییرات سطوح اسیدهای آمینه و هورمون IGF- I در پلاسمای ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

نگارنده:

نسیم رستمخانی

اساتید راهنما:

دکتر صمد زارع

دکتر رضا ملک زاده ویایه

اسفند ماه ۱۳۹۰

تقدیم به

پدر و مادر عزیزتر از جانم، به پاس قلب بزرگ و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان هستند؛

خواهران مهربانم، به پاس عاطفه سرشار و محبت های بی دریغ شان که هرگز فروکش نمی کند؛

و همسر خواهرم به پاس مهربانی ها و حمایتهای بی نظیرش.

سپاسگزاری

سپاس خداوندی را سزاست که به آنچه رسیده ام به نعمت و لطف او بوده، کار برای او، میل به سوی او و طاعت به فرمان اوست. حمد و سپاس خداوند را در برابر هر گونه امری که پیش آید، خوشی و ناخوشی، سختی و آسانی، زحمت و راحتی، بی نیازی و نیازمندی و در هر وقت و ماوی و مقام و منزلت که بوده باشد (از نیایش های حضرت فاطمه سلام اللّه علیها).

اینک که در پرتو لطف وعنایت پروردگار مرحله‌ای دیگر از زندگی‌ام را پشت سر می گذارم، بر خود لازم می دانم از تمام عزیزانی که مرا در انجام این مهم یاری نموده‌اند، قدردانی نمایم.

سپاس بی پایان خود همراه با دنیایی از عشق و خضوع را تقدیم خانواده عزیزم می کنم که همواره یار و پشتیبان من بوده اند.

از استاد راهنمای ارجمندم ، جناب آقای دکتر صمد زارع که با حمایت های خود امکان انجام هر چه بهتر این پژوهش را فراهم نمودند، قدردانی می نمایم.

از استاد راهنمای گرانقدرم، جناب آقای دکتر رضا ملک زاده که در انجام مراحل مختلف این پایان نامه بی هیچ دریغی یاری ام کردند، نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

از مدیر محترم گروه زیست شناسی سرکار خانم دکتر فرح فرخی و استاد گرامی جناب آقای پروفسور رضا حیدری که زحمت مطالعه و داوری پایان نامه اینجانب را تقبل نمودند، سپاسگزاری می نمایم.

همچنین، به پاس کمک ها و محبت های کارشناسان محترم آزمایشگاههای دانشکده علوم و پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه، مراتب تقدیر و تشکر خود را نثارشان می نمایم.

در نهایت، از تمام دوستان عزیزم و بزرگوارانی که مرا در این راه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

چکیده

رشد در ماهیان فرایند فیزیولوژیکی است که اساساً به تکامل مراحل مختلف زندگی موجودات مرتبط و حاصلِ اثر عوامل ژنتیکی و هورمونی و بخصوص، سیستم هورمون رشد (GH) / فاکتورهای رشد شبه انسولینی (IGF ها) می باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر افزودن مکمل های اسید آمینه ای در غذا بر شاخص های رشد و تغییرات سطوح اسیدهای آمینه و هورمون IGF-I در خون ماهی قزل آلای رنگین کمان، *Oncorhynchus mykiss* بود. تعداد ۷۵۰ قطعه ماهی با میانگین وزن اولیه ۴±۴۲ گرم پس از گذراندن دوره سازگاری با شرایط آزمایشی، به طور تصادفی در قالب ۵ تیمار غذایی (هر تیمار دارای سه تکرار) در استخرهای پرورشی پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه توزیع شدند. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از تیمار یک: تغذیه با غذای کنسانتره تجاری (شرکت فرادانه، ایران) به اضافه ۲٪ L - Arginine؛ تیمار دو: تغذیه با غذای کنسانتره به اضافه ۲٪ L - Ornithine ؛ تیمار سه: تغذیه با غذای کنسانتره به اضافه ترکیب ۲٪ L - Arginine + ۱٪ L - Ornithine ؛ تیمار چهار: تغذیه با غذای کنسانتره به اضافه ترکیب ۳٪ L - Arginine + ۱٪ L - Ornithine و تیمارپنج: تغذیه باغذای کنسانتره بدون افزودن اسیدآمینه (تیمارشاهد). طول دوره آزمایش هشت هفته بود. جهت ارزیابی شاخص‌های رشد، در ابتدای آزمایش و در پایان هفته‌های اول، دوم، چهارم، ششم و هشتم ماهی‌های تمامی تیمارها مورد زیست سنجی (Biometry) قرار گرفتند و نمونه های خون آنها جهت اندازه گیری مقادیر هورمون IGF-I و اسیدهای آمینه تهیه شدند. با استفاده از نتایج زیست سنجی، شاخص های رشد نظیر طول کل، میزان افزایش وزن، ضریب چاقی، نرخ رشد ویژه (SGR)، نرخ رشد مطلق، درصد ماهیچه و شاخص های کبدی (HSI) و احشایی(VSI) تعیین شدند. اندازه گیری مقادیر IGF-I در پلاسما به کمک روش الایزا (ELISA) و تعیین مقادیر اسیدهای آمینه با استفاده از HPLC صورت گرفتند. نتایج به دست آمده در انتهای دوره پرورش نشان دادند که ماهیان تیمار سه دارای بیشترین طول (۰/۰۵±۲۲/۸ سانتی متر)، افزایش وزن (۵/۸۴±۲۶۸/۹۴ ٪)، SGR (۰/۰۵±۲/۳۳ ٪ در روز)، نرخ رشد مطلق (۰/۰۱±۲/۰۷ گرم در روز) و درصد ماهیچه (۰/۸۷ ± ۷۱/۱۴ ٪) بودند. در حالی که، بیشترین میزان ضریب چاقی (۰/۰۵±۱/۴۵) مربوط به تیمار یک، بیشترین مقدار HSI (۰/۰۴±۱/۴۹ ٪) مربوط به تیمار چهار و بیشترین مقدار VSI (۲/۱۸±۱۵/۶ ٪) مربوط به تیمار دو بودند. کمترین طول (۰/۰۶±۲۲/۲۸سانتی‌متر)، افزایش وزن (۲/۴۲±۲۱۰/۹۴ ٪)، SGR (۰/۰۲±۲/۰۳ ٪ در روز)، نرخ رشد مطلق (۰/۰۲±۱/۷۰ گرم در روز)، درصد ماهیچه (۱/۰۵±۶۵/۲۲ ٪)، ضریب چاقی (۰/۰۱±۱/۲۷) و HSI (۰/۰۴±۱/۱۴ ٪) در تیمارشاهد و کمترین مقدار VSI (۱/۳۸±۱۳/۶۷ ٪) در تیمار یک مشاهده شدند.

نتایج مقایسه آماری تیمارها در انتهای هفته هشتم نشان داد که تفاوت معنی داری در مقادیر شاخص های رشد بین تیمارهای تغذیه شده با مکمل های اسیدآمینه ای با تیمار شاهد وجود داشت ($P < ۰/۰۵$). بیشترین میزان IGF-I مربوط به تیمار سه و به میزان ۵/۴۴±۱۱۸۰پیکوگرم در میلی لیتر بود، در حالی که تیمار شاهد واجد کمترین مقدار این هورمون (۳/۵۴±۹۸۰/۳۵ پیکوگرم در میلی لیتر) بود. نتایج مقایسه آماری تیمارها نشان داد که میزان IGF-I بین تیمار یک و تیمار سه اختلاف معنی‌داری نداشت، اما تیمارهای یک و سه با تیمارهای دو و چهار و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P <۰/۰۵$). بیشترین مقادیر اسیدهای آمینه آرژینین (۲۳۴/۲۹ میکرومول بر میلی لیتر) و اورنیتین (۱۳/۶۳ میکرومول بر میلی لیتر) مربوط به تیمار سه و کمترین مقادیر آنها (به ترتیب، ۳۱/۰۸ و ۶/۷ میکرومول بر میلی لیتر) مربوط به گروه شاهد و تیمار یک بودند. تفاوت معنی داری درمیزان اسید آمینه آرژنین پلاسما بین تیمارهای سه و چهار و تیمار شاهد وجود داشت. همچنین، در میزان اسید آمینه اورنیتین پلاسما در بین تیمارها تفاوت معنی دارای مشاهده نشد ($P >۰/۰۵$). نتایج این بررسی نشان دهنده تاثیر مثبت استفاده از مکمل های غذایی اسید آمینه ای، بخصوص افزودن توأم دو اسید آمینه L – Arginine و L – Ornithine در غذای تجاری بر افزایش شاخص ها و تحریک فرایند رشد در ماهی قزل آلای رنگین کمان است.

کلمات کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، *Oncorhynchus mykiss*، شاخص های رشد، فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF-I)، اسید آمینه L – Ornithine ، اسید آمینه L – Arginine

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول : کلیات و مرور منابع

فصل اول: کلیات و مرور منابع ۱

۱– کلیات و مرور منابع ۲

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- اهداف ۳

۱-۳- فیزیولوژی رشد در مهره‌داران ۴

۱-۳-۱- رشد ۴

۱-۳-۲- هورمون شناسی رشد ۴

۱-۳-۳- ارتباط بین سیستمهای هورمونی و مصرف مواد غذایی ۵

۱-۴- ماهیان به عنوان مدل های جانورشناختی ۶

۱-۵- فرایند هورمونی رشد در ماهیان ۷

۱-۵-۱- هورمون رشد (GH) و عوامل رشد شبه انسولینی (IGFs) ۷

۱-۵-۲- پروتئینهای اتصالی به عوامل رشد شبه انسولینی (IGFBPs) ۱۰

۱-۵-۳- ارتباط بین مقادیر IGF-I در خون و رشد در ماهیان ۱۱

۱-۶- اندازه گیری میزان هورمون ها در خون به روش ELISA ۱۱

۱-۶-۱- انواع ELISA ۱۲

۱-۶-۲- مراحل انجام ELISA ۱۲

۱-۷- اسیدهای آمینه و مطالعات تغذیه ای در ماهیان ۱۳
۱-۷-۱- آرژینین ۱۴
۱-۷-۱-۱- سنتز آرژینین ۱۵
۱-۷-۲- اورنیتین ۱۸
۱-۸- روشهای اندازه گیری اسیدهای آمینه ۲۰
۱-۸-۱- کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) ۲۰
۱-۹- سابقه و ضرورت انجام تحقیق ۲۲

فصل دوم : مواد و روش‌ها

فصل دوم: مواد و روش ها ۲۳
۲- مواد و روش ها ۲۴
۲-۱- تهیه، ذخیره سازی و توزیع ماهیان در استخرهای پرورشی ۲۴
۲-۲- طرح آزمایش ۲۵
۲-۳- تهیه غذا و غذادهی ۲۷
۲-۴- زیست سنجی ۲۸
۲-۵- تهیه نمونه های خون و پلاسما ۲۹
۲-۶- اندازه گیری مقادیر هورمون IGF-I در پلاسمای خون ماهیان ۳۰
۲-۶-۱- اصول سنجش ۳۰
۲-۷- اندازه گیری مقادیر اسیدهای آمینه ۳۰
۲-۷-۱- مواد و روش کار ۳۰
۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری ۳۳

فصل سوم : نتایج

فصل سوم: نتایج ۳۴
۳- نتایج ۳۵
۳-۱- شاخصهای رشد و تغذیه ۳۵
۳-۲- مقادیر هورمون IGF-I ۴۲
۳-۳- مقادیر اسیدهای آمینه در پلاسما ۴۳

فصل چهارم : بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات ۴۵
۴- بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات ۴۶
۴-۱- بحث و نتیجه گیری ۴۶
۴-۲-پیشنهادات ۵۳

فصل پنجم : منابع

فصل پنجم: منابع ۵۴
۵- منابع ۵۵

پیوست

پیوست ۶۵

فهرست اشکال و جداول

عنوان **شماره صفحه**

شکل ۱-۱- مسیرهای متابولیسمی سنتز آرژینین در پستاندارن ۱۶

شکل ۱-۲- محصولات حاصل از تجزیه آرژنین ۱۸

شکل ۱-۳- چرخه اوره ۱۹

شکل ۱-۴- طرح کلی ساختار دستگاه کروماتوگرافی مایع ۲۱

شکل ۲-۱- استخرهای بتنی مورد استفاده در تحقیق ۲۴

شکل ۲-۲- اکسیژن متر، pH متر و دماسنج برای اندازه گیری شاخصهای فیزیکی و شیمیایی آب ۲۶

شکل ۲-۳- ترکیب غذای تجاری با اسیدهای آمینه و ژلاتین ۲۷

شکل ۲-۴– خونگیری ازماهیان جهت تهیه پلاسما ۲۹

شکل ۲-۵- سانتریفیوژ نمونه های خون گرفته شده از ماهیان ۲۹

شکل ۲-۶- اندازه گیری مقادیراسیدهای آمینه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC) ۳۱

شکل ۳-۱- تغییرات مقادیر افزایش طول کل بدن در تیمارهای مختلف در طی دوره پرورش ۳۸

شکل ۳-۲- تغییرات مقادیر افزایش وزن (WG) به درصد در تیمارهای مختلف در طی دوره پرورش ۳۸

شکل ۳-۳- تغییرات مقادیر SGR در تیمارهای مختلف در طی دوره پرورش ۳۹

شکل ۳-۴- تغییرات مقادیرضریب چاقی (CF) درتیمارهای مختلف در طی دوره پرورش ۳۹

شکل ۳-۵- تغییرات مقادیر نرخ رشد مطلق (AGR) در تیمارهای مختلف در طی دوره پرورش ۴۰

شکل ۳-۶- تغییرات مقادیر نسبت ماهیچه (MR) در تیمارهای مختلف در طی دوره پرورش ۴۰

شکل ۳-۷- تغییرات مقادیر شاخص کبدی (HSI) در تیمارهای مختلف در طی دوره پرورش ۴۱

شکل ۳-۸- تغییرات مقادیر شاخص احشایی (VSI) در تیمارهای مختلف در طی دوره پرورش ۴۱

شکل ۳-۹- مقادیر هورمون IGF-I در تیمارهای مختلف در طی دوره پرورشی ۴۲

شکل ۳-۱۰- تغییرات مقادیر اسید آمینه آرژینین در تیمارهای مختلف در طی دوره پرورش ۴۳
شکل ۳-۱۱- تغییرات مقادیر اسید آمینه اورنیتین در تیمارهای مختلف در طی دوره پرورش ۴۴
شکل ۳-۱۲- کروماتوگرام مربوط به منحنی استاندارد اسیدهای آمینه در پلاسمای ماهیان مورد بررسی .. ۶۶
شکل ۳-۱۳- کروماتوگرام مربوط به تیمار ۱ هفته ۱ ..... ۶۶
شکل ۳-۱۴- کروماتوگرام مربوط به تیمار ۲ هفته ۲ ..... ۶۷
شکل ۳-۱۵- کروماتوگرام مربوط به تیمار ۳ هفته ۴ ..... ۶۷
شکل ۳-۱۶- کروماتوگرام مربوط به تیمار ۴ هفته ۶ ..... ۶۸
شکل ۳-۱۷- کروماتوگرام مربوط به تیمار شاهد هفته ۸ ..... ۶۸
جدول ۲-۱- مقادیر تقریبی (به درصد) ترکیبات موجود در غذاهای تجاری مورد استفاده ۲۵
جدول ۲-۲- مقادیراکسیژن محلول، pH و دمای استخرهای پرورشی در زمانهای مختلف دوره پرورش ... ۲۶
جدول ۲-۳- برنامه شستشوی مورد استفاده در دستگاه HPLC ۳۲
جدول ۳-۱- میانگین ± انحراف ازمعیار مقادیر شاخص های رشد در تیمارهای مختلف ۳۷

فصل اول

کلیات و مرور منابع

(Review of Literature)

۱- کلیات و مرور منابع

۱-۱- مقدمه

رشد بدنی فرایند بیولوژیکی دقیق و کاملی است که اساساً به تکامل مراحل مختلف زندگی موجودات مرتبط می‌باشد. رشد حاصل اثر عوامل ژنتیکی و هورمونی و به طور مشخصی وابسته به غذا و ترکیبات غذایی مورد استفاده موجودات است. در ماهیان، رشد فرایندهای فیزیولوژیکی مشخصی نظیر رشد اندام‌های داخلی و خارجی را در بر می‌گیرد (Beckman, 2011). شاخص‌های مختلفی در تعیین میزان رشد موجودات مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ از اندازه گیری میزان تغییر وزن و طول تا سنجش مقادیر هورمون‌ها و بیان ژن‌های کنترل کننده عوامل رشد. تغییر اندازه ماهی در طول زمان با اندازه گیری اختلاف در طول و وزن ماهی ارزیابی می‌شود. هورمون رشد از جمله هورمون‌های غده هیپوفیز است که در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی دخیل در رشد بدن شامل رفتار و حرکات، عملکرد سیستم ایمنی بدن، متابولیسم لیپیدها و پروتئین‌ها، تنظیم اسمزی و رفتارهای تغذیه‌ای در ماهی نقش دارد (Fox *et al.,* 2010). بنابراین، این هورمون می‌تواند شاخص مهمی در اندازه گیری رشد در موجودات باشد. از طرفی، رشد یکی از نمودهای تأثیر فاکتورهای رشد شبه انسولینی[1] در بدن می‌باشد و در نتیجه، با مقادیر این فاکتورها در خون نیز در ارتباط می‌باشد.

طی دهه‌های اخیر، استفاده از مکمل‌های غذایی در جیره غذایی جانوران پرورشی از جمله ماهیان رواج بیشتری یافته است. این امر نقش موثری در افزایش کارایی تولید در این موجودات داشته است. این مکمل‌های غذایی می‌توانند در رشد و افزایش مقاومت ماهیان در برابر شرایط نامساعد محیطی و بیماری‌ها موثر باشند. از جمله عناصر غذائی ضروری مورد نیاز برای همه موجودات زنده اسیدهای آمینه هستند که به عنوان سازندگان اولیه پروتئین‌ها می‌باشند. به طور معمول، ایجاد تعادل در مقادیر اسیدهای آمینه برای رشد بهینه و تبدیل غذایی مناسب در ماهی لازم است و عدم وجود چنین تعادلی ممکن است منجر به کاهش مصرف پروتئین‌ها برای رشد شود (Berge *et al.,* 2002).

طی یک قرن گذشته، مطالعات متعددی روی شناخت ساختار و عملکرد اسید آمینه Arginine انجام شده‌اند و اثرات متنوع آن از جمله تحریک رشد در موجودات مختلف به اثبات رسیده‌اند (Wu & Morris, 1998). استفاده از Arginine منجر به تولید اسید آمینه دیگری به نام Ornithine و در نهایت سنتز پلی آمین‌ها می‌شود. Ornithine در سنتز پروتئین دخیل است و ترشح هورمون رشد را از طریق تحریک غده هیپوفیز افزایش می‌دهد (Sugino *et al.*, 2008). به طور معمول، مقادیری از انواع اسیدهای آمینه ضروری در غذاهای تجاری ماهیان وجود دارند، با این حال، به نظر می‌رسد که وجود مقادیر اضافی از اسیدهای آمینه در غذا به عنوان مکمل غذایی، می‌تواند در تحریک رشد و افزایش شاخص‌های رشد در موجودات موثر باشد. پژوهش حاضر با این فرض انجام شده که استفاده از مقادیر اضافی از اسیدهای آمینه موثر در رشد می‌تواند

1. Insulin-like growth factors (IGFs)

سبب تحریک تولید و ترشح هورمون‌ها و اسیدهای آمینه دخیل در فرایند رشد و در نتیجه، افزایش رشد در ماهی به عنوان یک مدل آزمایشگاهی از مهره‌داران شود.

۱-۲- اهداف

آنچنانکه بیان شد، تغییر در ترکیب رژیم غذایی دارای اثرات متعدد فیزیولوژیکی در ماهی است. اگرچه آزمایش‌های مربوط به اثر ترکیبات غذایی به طور معمول در آبزی پروری اجرا می‌شوند، اما چنین اثراتی بر سیستم هورمونی ماهیان به ندرت مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله این اثرات می‌توان به تغییرات در سطوح هورمون ها در گردش خون، میزان ترشح و مصرف هورمون‌های متصل به پروتئین‌های پلاسمایی، فعالیت گیرنده‌ها و علامت و نشانگرهای پس از گیرنده اشاره نمود. هر قدر هماهنگی و پیوستگی آنالیز هورمونی به تحقیقات کلاسیک مربوط به تغذیه بیشتر باشد، می‌تواند به درک پایه‌ای ما از فیزیولوژی اندوکراینی ماهیان و متعاقب آن، شناخت فرایند رشد در مهره داران کمک نماید.

هدف از انجام تحقیق حاضر ارزیابی و تجزیه و تحلیل فیزیولوژیکی تأثیر و نحوه اثر اسیدهای آمینه بر سیستم اندوکراینی و شاخص‌های بدنی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به عنوان یکی از الگوهای آزمایشگاهی مناسب برای مطالعه فرایندهای فیزیولوژیک در مهره داران بود. علاوه بر این، بررسی امکان افزایش بازده رشد در ماهیان پرورشی با استفاده از ترکیبات تغذیه‌ای مناسب یکی دیگر از اهداف پژوهش حاضر بود. با توجه به افزایش رور افرون جمعیت جهان و کمبود منابع غذایی، شناخت ویژگی‌ها و نیازهای فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای ماهیان پرورشی می‌تواند عامل مهمی در افزایش تولید تجاری آنها به عنوان یکی از مهمترین منابع غذایی بشر باشد. با استفاده از اطلاعات حاصل از چنین مطالعاتی باید امکان تولید مدل‌های پیشگویی کننده برای دستکاری اندوکراینی در کیفیت، کمیت و یا زمان ارائه مواد غذایی وجود داشته باشد.

۱-۳- فیزیولوژی رشد در مهره‌داران

۱-۳-۱- رشد

رشد بدن فرایند زیستی یکپارچه‌ای است که به طور جالب توجه‌ای مرتبط با رشد و نمو مراحل لاروی و جوانی و تکامل جنسی است. مقادیر رشد می‌توانند به عنوان شاخص‌های وضعیت رشد و تولید مثل یک موجود که مرتبط با توانایی یک جانور در بدست آوردن و جذب و نگه‌داری هوموستازی و تنظیم سوخت وساز است، مورد استفاده قرار گیرند (Beckman, 2011).

۱-۳-۲- هورمون شناسی رشد

سابقهٔ علم مطالعهٔ هورمون‌ها به صورت تجربی، به قرن‌ها قبل و به صورت مستند و امروزی، به قرن نوزده میلادی می‌رسد. هورمون‌های مترشحه از غدد درون ریز برای سال‌ها، معرف تمام هورمون‌هایی بودند که عملکرد فیزیولوژیک داشتند. امروزه هورمون به هر نوع ماده‌ای اطلاق می‌گردد که در موجود زنده، علامت یا پیامی[1] را برای ایجاد تغییر در سطح سلولی با خود داشته باشد. هورمون‌های درون ریز[2] دسته‌ای از هورمون‌ها هستند که در بافت یا غده‌ای ساخته می‌شوند و از طریق جریان خون به سلول‌های هدفی که گیرنده‌هایی برای این هورمون دارند، می‌رسند (زوار رضا و همکاران.، ۱۳۸۸).

موضوع شناخت هورمون‌های مغزی (نوروآندوکراینولوژی) موضوعی نسبتاً جدید است. در این ارتباط دهه‌های ۱۹۸۰ و۱۹۹۰ میلادی شاهد جهشی چشمگیر در توسعه این علم بود، زیرا علاوه بر شناسایی و کشف فهرست طویلی از نوروپپتیدها، اهمیت ونقش آنها در تنظیم و کنترل طیف وسیعی از پدیده‌های فیزیولوژیک و رفتاری، مورد تأکید و تأیید قرار گرفته است (بهنام رسولی، ۱۳۸۲). بررسی عوامل محرک تولید، سازوکارهای سنتز، ترشح، کنترل و تنظیم آزادسازی هورمون‌ها از سلول‌های عصبی– ترشحی، و همچنین، شناسایی سلول‌های هدف هورمون‌ها، گیرنده‌های هورمونی، آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های گیـرنده‌های هورمونی و غیـره از موضـوعاتی هستند که در حوزه علم نوروآندوکراینولوژی مورد توجه قرار می‌گیرند (Squires, 2003).

سیستم هورمون‌های درون ریز تنظیم کنندهٔ کلیدی فرایندهای فیزیولوژیک از قبیل رشد است. بنابراین، مطالعه این سیستم می‌تواند برای بررسی فرایند رشد در مهره‌داران مورد توجه قرار گیرد (Beckman, 2011). هورمون‌ها علاوه بر رشد، تمایز و عمل تعداد زیادی از سلول‌های هدف را تنظیم می‌نمایند (زواررضا و

1. Signal
2. Endocrine hormones

همکاران، ۱۳۸۸). هورمون‌هایی مانند هورمون رشد، انسولین، فاکتور رشد شبه انسولینی و هورمون‌های تیروئید که برای تحریک و یا کنترل رشد ضروری هستند، به عنوان شاخص‌های رشد معرفی شده اند (Beckman, 2011).

۱-۳-۳- ارتباط بین سیستم های هورمونی و مصرف مواد غذایی

از آنجا که سیستم غدد درون ریز به عنوان تنظیم کنندهٔ اصلی رشد در تمام مهره داران محسوب می‌شود، منطقی است که فرض کنیم که مصرف مواد غذایی و عملکرد غدد درون ریز دارای ارتباط نزدیکی با یکدیگر هستند. ترشح هورمون‌ها از اندام‌های درون ریز به طور مستقیم به وسیله مصرف غذا فعال می‌شود. عقیده بر این است که مصرف کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه در تنظیم تولید هورمون‌های هیپوفیز نقش دارد. مواد غذایی ممکن است عملکرد غدد درون ریز را از طریق اثر بر سنتز، ترشح و تبدیل هورمون‌ها تحت تأثیر قرار دهند (Mackenzie *et al.,* 1998). با این حال، با وجود طبیعت چند وجهی سیستم‌های کنترل هورمونی، دستیابی به درک دقیق در مورد این سیستم مشکل است. رشد در ماهیان و مهره داران عالی تا حد زیادی به وسیله هورمون‌ها، که ترشح آنها در ارتباط با دسترسی به مواد غذایی است، کنترل می‌شود (Fox *et al.,* 2010).

عملکرد پیچیده رشد عمدتاً به وسیله سیستم هورمون رشد[1] / فاکتورهای رشد شبه انسولینی (IGFها) تنظیم می‌شود. ساختار کلی این سیستم به خوبی در بین مهره دارانِ متکامل‌تر حفظ شده است و شامل هورمون رشد، گیرنده‌ی هورمون رشد[2]، IGF-I ، IGF- II، گیرنده‌های IGF[3] (IGFRI وIGFRII) و پروتئین‌های متصل به IGF ها[4] می‌باشد (Gabillard *et al*., 2006; Wilkinson *et al*., 2006; Li *et al*., 2007; Shepherd *et al*., 2007).

1. Growth hormone (GH)
2. GH receptor (GHR)
3. IGF receptors (IGFRI and IGFRII)
4. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBPs)

۱-۴- ماهیان به عنوان مدل های جانورشناختی

استفاده از مدل‌های جانوری در تحقیقات مربوط به مباحث بنیادی علوم زیستی، تقریباً امری عادی است. مثلا، از توتیای دریایی در زمینه جنین شناسی، از مگس سرکه در مطالعات ژنتیک و از نماتودها در تحقیقات جانور شناسی استفاده می‌شود. در زمینه‌های تخصصی‌تر، بسته به موضوع تحقیق، اگرچه بعضی از مدل‌های جانوری بی مهره می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند، ولی بیشتر از نمونه‌های جانوران مهره دار از جمله ماهی‌ها، دوزیستان و پرندگان استفاده می‌شود (بهنام رسولی، ۱۳۸۲).

بزرگترین، متنوع‌ترین و قدیمی‌ترین گروه مهره داران یعنی ماهی‌ها، در تعداد زیادی از ویژگی‌های مهم مثل سیستم‌های بدنی، ساختار رشد و نمو و مکانیزم‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی با پستانداران مشترک می‌باشند. این موجودات نمونه‌های قابل اتکایی برای اغلب مطالعات بیولوژیک و جایگزین مناسبی برای پستانداران می‌باشند. علاقه به استفاده از ماهیان به عنوان مدل‌های آزمایشگاهی به طور روز افزونی در حال افزایش است (Li *et al.*, 2006).

ماهی‌ها دارای بیشترین تنوع گونه‌ای هستند. بیش از ۲۰۰۰۰ گونه از ماهیان شناسایی شده است (افشار مازندران، ۱۳۸۱). که به دلیل سازگاری بالا، می‌توانند در محیط‌های اکولوژیک مختلف زندگی کنند (بهنام رسولی، ۱۳۸۲). از نظر تکاملی، ماهیان قادر به زیست در دامنه وسیعی از زیستگاههای آبی، از آبهای شیرین مناطق گرمسیری تا دریاهای سرد قطبی هستند (افشار مازندران، ۱۳۸۱).

خانواده آزاد ماهیان[1] از جمله بهترین ماهیان پرورشی شناخته شده هستند. این ماهیان با دارا بودن ویژگی‌های منحصر به فرد، از جمله طول نسبتاً کوتاه دوره پرورش، مقاومت به طیف وسیعی از شرایط فیزیکوشیمیایی محیط، اندازه نسبتاً بزرگ لارو در مراحل اولیه و امکان تکثیر مصنوعی در فصول مختلف سال، از آبزیان مهم و تجاری در جهان محسوب می شوند (Hardy, 2000).

ماهی قزل آلای رنگین کمان[2] یکی از ماهیانی است که مطالعات متعددی روی آن انجام گرفته است. این ماهی عضوی از خانواده آزاد ماهیان و بومی سواحل اقیانوس آرام در آمریکای شمالی و روسیه است که به طور گسترده‌ای به مناطق مختلفی در جهان معرفی شـده است. به دلیل پرورش گسترده این ماهی به عنوان غذا و برای صید ورزشی، اطلاعات قابل توجه‌ای در مورد اصول زیست شناسی این گونه گردآوری شده است. در واقع، بیشترین اطلاعات موجود در خصوص بیولوژی و فیزیولوژی ماهیان، در مورد قزل آلای رنگین کمان می‌باشد. این ماهی به عنوان یک مدل آزمایشگاهی برای انجام آزمایش‌های مربوط به فیزیولوژی، ژنتیک (شـناخت ژن‌ها و عملکرد آنها، روابط خویشاوندی، انتقال ژن، دستکاری‌های کروموزومی و بهگزینی)، مطالعات مربوط به شناخت سرطان‌ها، سمیت مواد و محیط‌ها، ایمنی و بیماری‌ها محسوب می‌شود. اگرچه

1. Salmonidae
2. *Oncorhynchus mykiss*

این ماهی اندازه نسبتاً بزرگ و چرخه تولید مثل طولانی (۲ تا ۳ سال) دارد، پرورش آن آسان و ارزان است، قابلیت و مقاومت بیشتری در برابر انجام دستکاری‌ها و جراحی نسبت به ماهیان کوچک‌تر دارد و امکان برداشت و تهیه مقادیر بیشتری از بافت‌ها یا سلول‌های آن برای انجام آنالیزهای بیوشیمیایی، ایمنی شناختی و ژنتیک مولکولی وجود دارد. تولید مثل آن هم در شرایط طبیعی و هم مصنوعی به خوبی شناخته شده است و می‌توان مقادیر زیادی از گامت‌ها یا محصولات جنسی آن را در تمام طول سال در اختیار داشت (Thorgaard *et al*., 2002). این ماهی به دلیل شباهت جذب پپتیدها و اسیدهای آمینه در آنها با مهره‌داران عالی‌تر مثل انسان، نمونه‌های منحصر به فردی برای مطالعات مرتبط در این موارد در انسان می‌باشند (Dabrowski *et al*., 2003).

۱-۵- فرایند هورمونی رشد در ماهیان

همانند سایر مهره داران، بسیاری از پدیده‌های فیزیولوژیک در ماهی‌ها تحت کنترل هورمونها است. مثلاً برای زنده ماندن ماهیان مهاجر که از آب شیرین به آب شور و بالعکس مهاجرت می‌کنند، وجود هورمون پرولاکتین ضروری است (بهنام رسولی، ۱۳۸۲). از بین بسیاری از اختصاصات فیزیولوژیک در ماهیان، فرایند رشد دارای سازوکارهای خاصی است که بخشی از این سازوکارها با دخالت سیستم‌های هورمونی انجام می‌گیرند. با توجه به نقش و اهمیت این سیستم‌ها، در ادامه به اثرات هورمون‌های مهم دخیل در رشد ماهیان و مطالعات انجام شده بر روی آنها اشاره می‌شود.

۱-۵-۱- هورمون رشد (GH) و عوامل رشد شبه انسولینی (IGFs)

هورمون رشد در مجموعه‌ای از فعل و انفعالات فیزیولوژیک شامل سازگاری به آب شور، سوخت و ساز لیپیدها، پروتئین‌ها وکربوهیدرات‌ها، تولید مثل، عملکرد سیستم ایمنی و خصوصیات مهم رفتاری در ماهی نقش دارد (Davidson, 1982; Li *et al*., 2006). اساساً تولید هورمون رشد در هیپوفیز و ترشح درون ریز آن، طیف وسیعی از فرایندهای مربوط به تقسیمات سلولی را تحریک می‌نماید که این عملکرد آنها با واسطه فاکتورهای رشد شبه انسولینی (IGFs) صورت می‌گیرد (Wilkinson *et al.*, 2006; Nelson & VanDerKraaK, 2010). بنابراین، تولید IGF-I وابسته به تولید GH و رهاسازی آن است که در نهایت، از طریق محور مغزی هیپوتالاموسی و وضعیت تغذیه‌ای (مصرف غذا و جذب مواد مغذی) تحت کنترل قرار می‌گیرد (Beckman, 2011).

فاکتورهای رشد شبه انسولینی به انواع مختلفی تقسیم می‌شود که شامل IGF-I وIGF- II می‌باشد. IGF-I و IGF- II پلی پپتیدهای تک زنجیره ای هستند و در حدود ۷/۵ کیلو دالتون وزن دارند. تقریبا ۷۰

درصد از توالی های اسیدهای آمینه این دو یکسان است. نقش IGFها در مهره داران به طور گسترده ای مورد مطالعه قرار گرفته است (Dyer *et al.,* 2004). بعد از اینکه IGFها در سیستم گردش خون رها شدند، روی انواع مختلف سلول‌های هدف عمل می‌نمایند. IGF-I نقش اصلی را در مجموعه پیچیده‌ای از فرایندها که رشد، تمایز و تولید مثل را تنظیم می‌نمایند، بر عهده دارد (Berishvili *et al.,* 2010). IGF-I یک پروتئین تک زنجیره با جرم مولکولی ۷۵۰۰ دالتون و دارای ۷۰ واحد اسید آمینه‌ای است و از ۴ دمین A-B-C-D تشکیل شده است (Baños *et al.,* 1999; Schmid *et al.,* 2003; Dyer *et al.,* 2004; Small & Peterson., 2005). در جانوران مهره‌دار IGF-I به طور عمده در کبد سنتز و وارد گردش خون می‌شود و به داخل بافت‌های هدف حمل می‌گردد (Baños *et al.,* 1999; Small & Peterson, 2005). این هورمون همچنین در بافت‌های متعدد دیگری نیز تولید می‌گردد و می‌تواند به شیوهٔ اتوکراینی[1] و پاراکراینی[2] عمل نماید (Baños *et al.,* 1999). تولید اتوکراینی/ پاراکراینی IGF-I در بافت‌های غیر کبدی به خوبی در جهت کنترل رشد و متابولیسم شرکت می‌نمایند (Fox *et al.,* 2010). تولید IGF-I در انواع بافت‌های خارج کبدی و برای طیف گسترده‌ای از بافت‌ها که عمدتاً به فرایندهای رشد و تمایز وابسته می‌باشند، مهم است (Sakamoto *et al.,* 1993). IGF-I به طور اختصاصی سبب تحریک تقسیم میتوز و تمایز می‌شود و از پدیده مرگ برنامه ریزی شده سلول[3] جلوگیری می‌نماید (Berishvili *et al.,* 2010). علاوه بر پستانداران، IGF-I در ماهی‌ها نیز دارای اثرات فیزیولوژیکی می‌باشد (McCormick *et al*., 1992).

مانند آنچه در پستانداران دیده می‌شود، IGF-I یک هورمون مهم در فرایندهای مربوط به افزایش رشد در ماهیان است. علاوه بر این IGF-I دارای اثرات بیولوژیکی دیگری مانند تاثیر بر روی تمایز و متابولیسم سلول‌ها می‌باشد (Baños *et al.,* 1999). مطالعه این هورمون در ماهی‌ها ابتدا با کشف تأثیرات مشابه آن در سال ۱۹۷۸ آغاز شد (Beckman, 2011). ارتباط بین GH وIGF و مقادیر آنها در تعدادی از بافت‌های گونه‌های مختلف ماهیان، به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است (Li *et al.,* 2006). هورمون رشد یک تنظیم کنندهٔ مؤثر بیان IGF-I کبد در چندین گونه از ماهی‌ها است (Peterson *et al.,* 2004). استفاده از هورمون رشد نوترکیب گاوی سبب افزایش بیان mRNA ی IGF-I درگنادهای ماهی قزل آلای رنگین کمان و ماهی گورخری[4] شده است (Sakamoto *et al.,* 1993; Schmid *et al.,* 2003; Picha *et al.,* Nelson & VanDerKraaK, 2010). هورمون رشد سطوح پپتید IGF-I و mRNA آن را در کبد و سایر بافت‌ها تنظیم می‌نماید و گمان می‌رود که تنظیم کنندهٔ اصلی تولید IGF-I باشد. (Sakamoto *et al.,* 1993; Peterson *et al.,* 2004). IGF ها ارتباط نزدیکی با پلی پپتیدها دارند و مشخص شده که هم برای رشد جنینی و هم رشد پس از تولد مهم هستند (Wilkinson *et al.,* 2006). مشخص شده که IGF-I یک محرک قوی برای سنتز بافت اسکلتی در ماهی است و سنتز پروتئین را در ماهیچه تحریک می‌نماید.

1. Autocrine
2. Paracrine
3. Apoptosis
4. Zebra fish

همچنین، مطالعات متعدد نشان داده‌اند که IGF-I تحمل به شوری را در آزادماهیان افزایش می‌دهد و در مکانیسم‌های تنظیم اسمزی نقش دارد (Dyer *et al.,* 2004; Li *et al.,* 2006; Li *et al.,* 2007; Berishvili *et al.,* 2010). در ماهی قزل آلای رنگین کمان، در طی دوره سازگاری به آب دریا، GH اثرات خود را به وسیله تولید موضعی IGF-I، به صورت مستقیم بر اندام‌های تنظیم کنندهٔ اسمزی اعمال می‌کند (Sakamoto *et al.,* 1993). مطالعات متعدد همچنین، نقش IGF-I را به عنوان میانجی متابولیسم، از جمله در طی Smoltification در آزادماهیان مورد تأکید قرار داده‌اند (Lankford & Weber, 2006; Li *et al.,* 2007). از دیگر نقش‌های IGF-I در ماهیان می‌توان به تحریک سنتز DNA، سنتز پروتئین، جذب گلوکز و اسیدهای آمینه، تحریک روند اسپرماتوژنز و القاء بلوغ نهایی اووسیت‌ها اشـاره کرد (Wilkinson *et al.,* 2006; Li *et al.,* 2007). در نهایت، درون سیستم GH /GF بیشتر ترکیبات اثر متقابل بر یکدیگر دارند و تشکیل یک شبکه پیچیده تنظیم کننده را می‌دهند (Gabillard *et al.,* 2006).

مقایسهٔ توالی اسیدهای آمینه نشان داده است که توالی این اسیدها در انواع عوامل رشد شبه انسولینی در گونه‌های مختلف ماهیان و در سیر تکاملی مهره داران تا حد زیادی ثابت مانده است (Sakamoto *et al.,* 1993; Nelson & VanDerKraaK, 2010). گیرنده‌های IGF-I، که در حضور یک لیگاند تشکیل پیوندهای دایمر را می‌دهند، گیرنده‌های تیروزین کینازی هستند و به نظر می‌رسد که مسیرهای مختلف سیتوپلاسمی را در بسیاری از انواع سلول‌های هدف فعال می‌نماید. دو نوع گیرنده IGF-I وجود دارد: IGF-RIb و IGF-RIa، که در بافت‌های مختلف ماهیان بالغ از جمله در مغز، قلب، کبد، دستگاه گوارش، ماهیچه و تخمدان‌ها یافت شده‌اند. علاوه براین، دو ژن گیرنده IGF-I وجود دارد که در بسیاری از بافت‌های ماهی قزل آلای رنگین کمان بیان می‌شوند (Li *et al.,* 2007).

اخیراً، DNAهای مکمل IGF-I و ژن‌های آنها در چندین گونه از ماهی‌ها شامل ماهی آزاد[1] ، قزل آلا[2]، کپور[3]، گربه ماهی[4]، سیم دریایی سرطلایی[5] (Baños *et al.,* 1999) و همچنین توالی ژن آن در تیلاپیای موزامبیک[6](Schmid *et al.,* 2003) و ماهیان غضروفی[7] (Baños *et al.,* 1999) تعیین شده است. ساختار اولیه IGF-I ماهی شباهت زیادی را با دیگر مهره داران نشان می‌دهد که این امر بر این موضوع دلالت دارد که ساختار IGF-I در طی تکامل این موجودات به شدت حفظ شده است (Baños *et al.,* 1999). توالی ژن IGF-I در ماهی آزاد Coho نیز تعیین شده است (McCormick *et al.,* 1992).

1. Salmon
2. Trout
3. Carp
4. Catfish
5. *Gilthead sea bream*
6. *Orechromis mossambicus*
7. Elasmobranch