جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تاثیر نوکلئوتید جیره بر پاسخ های فیزیولوژی ماهی ازاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) در هنگام انتقال به آب شور

نعمت اله محمودی[۱]- عبدالمحمد عابدیان [۲]-مهدی سلطانی[۳]

چکیده

تاثیر نوکلئوتید جیره در سطوح مختلف بر پاسخ های استرس و تنظیم یونی بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) با وزن متوسط 12/26±0/001 گرم بررسی شد. آزمایش تغذیه به مدت 56 روز درون مخازن 300 لیتری با تراکم ذخیره سازی 35 عدد ماهی انجام شد. نوکلئوتید جیره در 3 سطح صفر، 0/25 و 0/5 درصد به جیره غذایی ماهی آزاد دریای خزر اضافه گردید. غذا دهی 5 بار در روز بین 3-5 درصد توده زنده در دوره پرورش انجام شد. بعد از 56 روز ماهیان به آب با شوری 18ppt انتقال یافتند. در آزمایش انتقال به آب شور یون های کلر و سدیم در زمان 72 ساعت در ماهیان تغذیه شده با نوکلئوتید جیره بویژه 0/25 درصد بطور معناداری کمتر از گروه کنترل بود (P<0/05). اختلاف معناداری در میزان پتاسیم و کلسیم بین تیمارها مشاهده نشد (P>0/05). میزان TSH، T4، پروتئین، آلبومین و درصد بقاء در تیمار 0/25 درصد در اکثر مواقع بطور معناداری بیشتر از گروه کنترل بود (P<0/05). اختلاف معناداری در مقدار T3 مشاهده نشد (P>0/05). نتایج این آزمایش نشان داد که نوکلئوتید جیره اثرات مثبت معنا داری در پاسخ های فیزیولوژیک ماهی آزاد دریای خزر دارد.

کلمات کلیدی: تغذیه, نوکلئوتید جیره, تنظیم اسمزی, استرس, ماهی آزاد دریای خزر

---

[1] – دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی ، دانشگاه تربیت مدرس، نور
[2] – استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور
[3] – استاد گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر با نام علمی (*Salmo trutta caspius*) یکی از 9 زیرگونه قزل آلای قهوه ای (*Salmo trutta*) در جهان است. ماهی آزاد از جمله ماهیان بومی و مهاجر(آنادرموس) دریای خزر می باشد که از ارزش غذایی و اقتصادی ویژه ای برخوردار است. اخیراً در ایران پرورش ماهی آزاد دریای خزر در قفس ها و کانال های بتونی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Dorafshan و همکاران، 2007). اخیراً استفاده از نوکلئوتید در جیره های غذایی به دلیل تقویت سیستم ایمنی، بهبود وظایف کبد، افزایش سطح جذب در روده و بهبود پاسخ به استرس، افزایش توانایی تنظیم اسمزی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Li و Gatlin، 2006). نوکلئوتیدها از جمله ترکیبات داخل سلولی با وزن ملکولی پایین، از یک بنیان پورین یا پیریمیدین و یک قند ریبوز یا 2- دی اکسی ریبوز و یک یا تعدادی گروه فسفات تشکیل می شوند. بطور کلی نوکلئوتیدها تقریباً در تمام فرایندهای سلولی دخالت داشته و نقش مهمی در وظایف ساختاری، تنظیمی بدن دارند. نوکلئوتید ها بصورت پیوسته در سلول سنتز، تجزیه و بازیافت می شوند و معمولاً ازطریق 2 مسیر مهم de novo و مسیرsalvage تشکیل می شوند (Cosgrove، 1998). مسیرsalvage هم ساده تر است و هم انرژی کمتری نسبت به de novo مورد نیاز است و توسط بازهای آزاد قابل دسترس تنظیم می شود. در تحقیقات انجام شده روی موجودات مختلف مشخص شده که مسیرهای salvage و de novo بطور قابل ملاحظه ای در بین بافتهای مختلف فرق می کند و بطور معنی داری تحت تاثیر نیاز های متابولیک یا وظایف فیزیولوژیک قرار می گیرد (Holen و همکاران، 2005). کبد بعنوان مهمترین ارگان ذخیره نوکلئوتید می باشد. در برخی از بافتها که ظرفیت محدودی در de novo synthesis برای تولید نوکلئوتید دارند منبع خارجی از نوکلئوتیدها می تواند در مسیرsalvage برای تولید نوکلئوتید مورد استفاده قرار گیرد و سبب تقویت این مسیر شود. سلولهای مهم دستگاه ایمنی مثل لنفوسیتها، گلبولهای قرمز، سلولهای خونساز، سلولهای موکوسی روده و سلولهای مغز با توجه به متابولیسم سلولی و حجم بالای واکنشهای سریع، همچنین

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نیاز بالای انها به نوکلئوتید، ظرفیت بسیار محدودی برای سنتز نوکلئوتید دارند. در این سلولها تهیه نوکلئوتید از منبع خارجی برای انجام وظایف نرمال آنها بسیار مهم است (Boza، 1998؛ Li و همکاران، 2004). حتی در سلولهایی که قادر هستند خودشان به اندازه کافی ملکولهای لازم برای ساخت DNA و RNA به منظور تقسیم سلولی تولید کنند فرایند تولید نیاز به سطح بالایی از انرژی دارد اما با فراهم کردن نوکلئوتیدها برای این فرایند ضمن افزایش سرعت تولید به ویژه در هنگام رشد سریع، نیاز به انرژی کم می شود (Holen و همکاران، 2005). علاوه بر آن نیاز به نوکلئوتید در دوره رشد سریع، استرسهای فیزیولوژیک و کاهش پروتئین جیره یا کاهش در جذب پروتئین افزایش می یابد (Low و همکاران، 2003). با توجه تحقیقات انجام شده در موجودات مختلف نوکلئوتید جیره دارای نقش های متابولیک متعددی از جمله افزایش رشد، توسعه میکروفلور روده، افزایش سطح جذب دستگاه گوارش، موثر بودن در متابولیسم چربی و پروتئین و اصلاح عملکرد کبد می باشد(Li و Gatlin، 2006). با توجه به مشکلات ذکر شده در زمینه پرورش ماهی آزاد دریای خزر و بیان اثرات مثبت نوکلئوتید جیره، مطالعه حاضر به منظور افزایش مقاومت ماهی آزاد دریای خزر به استرس های مختلف انجام شد.

مواد و روش ها

این آزمایش در بهار سال 87 در کارگاه تحقیقات آبزیان دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. ماهیان آزاد دریای خزر با میانگین وزنی 12/26±0/001 گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان سردابی شهید باهنر کلاردشت پس ازطی عملیات رقم بندی تهیه شد. ماهیان بعد از 24 ساعت گرسنگی به دلیل حمل و نقل به مدت یک هفته با جیره کنترل به منظور سازگاری تغذیه شدند. بعد از مرحله سازگاری در ابتدای آزمایش زیست سنجی ماهیان انجام شد. ماهیان در داخل تانکهای 0/3 متر مکعبی (آبگیری 250 لیتر) به تعداد 35 عدد در هر تانک قرار گرفتند. سپس با توجه به تیمارهای تعیین شده مکملOptimun حاوی نوکلئوتید در 2 سطح 0/25 و 0/5 درصد به جیره کنترل اضافه شد. تیمار سوم گروه شاهد بود که هیچگونه

مکملی به آن اضافه نشد. آزمایش در 3 تکرار در نظر گرفته شد. مکمل اپتیمون (chemoforma,Augst Switzerland) حاوی cytidine 5 -monophosphate (CMP), disodium uridine-5 -monophosphate (UMP), adenosine-5 -monophosphate (AMP), disodium inosine-5 -monophosphate (IMP) disodium guanidine-5 –monophosphate (GMP) است. جیره ماهیان بر اساس پودر ماهی به عنوان منبع اصلی پروتئین، شامل 50 درصد پروتئین و 17/1 درصد لیپید، با استفاده از نرم افزار لیندو (Lindo copyright 1995,Releases 6.1) فرمولبندی شد.. غذادهی بچه ماهیان به میزان 3-5 درصد وزن بدن و در 5 وعده در ساعات 8، 11، 13، 15، 18 انجام گردید.

انتقال به آب شور (استرس شوری)

در پایان دوره (8 هفته) بصورت جداگانه برای استرس شوری از هر تیمار پرورشی 16 عدد ماهی آزاد دریای خزر بصورت تصادفی از تانک های پرورشی صید, 4 عدد از آنها در زمان صفر و قبل از معرفی به آب شور خونگیری شدند. به منظور استرس شوری بقیه ماهیان (12 عدد) بطور مستقیم به شوری 18 ppt معرفی شدند و در زمان‌های 24, 72 و 120 ساعت بعد از انتقال به آب شور عمل خونگیری انجام شد. پارامترهای خونی شامل پروتئین، آلبومین، T3، T4، پرولاکتین، TSH، گلوکز، کورتیزول، یون های سدیم، پتاسیم، کلر و کلسیم با استفاده از روش Doumas و همکاران(1971) اندازه گیری شد. نتایج با استفاده از روش تجزیه واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن بررسی گردید.

نتایج

در آزمایش انتقال به آب شور یون های کلر و سدیم در زمان 72 ساعت در ماهیان تغذیه شده با نوکلئوتید جیره بویژه 0/25 درصد بطور معناداری کمتر از گروه کنترل بود ($P<0/05$). اختلاف معناداری در میزان پتاسیم و کلسیم بین تیمارها مشاهده نشد ($P>0/05$). میزان TSH، T4، پروتئین، آلبومین و درصد بقاء در تیمار 0/25 درصد در اکثر مواقع بطور معناداری بیشتر از گروه کنترل بود ($P<0/05$). اختلاف معناداری در مقدار T3 مشاهده نشد ($P>0/05$). میزان کورتیزول،

پرولاکتین و گلوکز در زمان120 ساعت در تیمار 0/25 درصد بطور معناداری کمتر از گروه کنترل بود (P<0/05).

بحث

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق افزودن نوکلئوتید جیره در سطوح 0/25 درصد و 0/5 درصد به ترکیب غذایی ماهی آزاد دریای خزر منجر به افزایش معنا داری در بهبود فرایند تنظیم یونی نسبت به گروه کنترل شده است.

از آنجایی که نوکلئوتید جیره می تواند بر متابولیسم اسید های چرب (elongation and desaturation)، فسفولیپید ها و پروتئین ها تاثیر داشته باشد, احتمالاً بر خاصیت فیزیکی و شیمیایی غشای سلول ها نظیر انتقال و نفوذپذیری غشا و گیرنده ها و آنزیم ها ی غشا اثر می گذارد (Moya-Falcon et al., 2004). ترکیب فسفو لیپیدی غشا بر خاصیت جنبشی آنزیم Na+ K+ ATPase که در تنظیم اسمزی نقش مهمی ایفا می کند تاثیر گذار است. اسیدهای چرب غیر اشباع در فسفو لیپیدها سبب افزایش فعالیت Na+ K+ ATPase می شوند. همچنین ثابت شده که اسید های چرب غیر اشباع با زنجیره بلند HUFA (n-3) سیالیت غشا و واکنش بین آنزیم های غشا حفظ می کنند (Moya-Falcon et al., 2004). Jutfelt و همکاران (2007) گزارش کردند که اسید های چرب غیر اشباع HUFA (n-3) سبب افزایش توانایی سالمون آتلانتیک برای مقاومت در شرایط استرس زا از جمله شوک های اسمزی می شود و هر چه نرخ DHA/EPA بیشتر شود مقاومت موجود به شوک های اسمزی بیشتر می شود.

از طرف دیگر نوکلئوتید جیره برای حفظ و بازسازی غلظتATP در سلولها شرکت می کند(Li and Gatlin, 2006). Perez و همکاران (2004) فرض کردند که نوکلئوتیدهای جیره, فسفوریلاسیون اکسایشی , انتقال الکترون و تغییر و تبدیل بین شکل کاهشی و اکسایشی NAD بهبود می بخشد که منجر به تحریک و ذخیره سازی انرژی در سلولها می شود در نتیجه انرژی بیشتری در اختیار سلول قرار می گیرد. (مصرف ATP در سلول کلراید). Burrells و همکاران

(2001) نشان دادند که سالمون آتلانتیک تغذیه شده با نوکلئوتید جیره بعد از انتقال به آب شور بطور معنی داری میزان کلر کمتری نسبت به گروه کنترل در هفته سوم و پنجم نشان دادند که بر طبق نتایج شان فرض کردند که احتمالاً بهبود توانایی تنظیم اسمزی می تواند ناشی از افزایش فعالیت پمپ سدیم – پتاسیم یا افزایش در تعداد سلولهای کلراید یا ترکیبی از هر دو باشد. نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه حاضر همسو ومنطبق است. با توجه به این توضیحات نوکلئوتید جیره می تواند با تغییر اسید های چرب غشاء و افزایش ذخیره انرژی در سلول بر انتقال الکترو لیت ها از سلول های کلرایددر ماهی آزاد دریای خزر تاثیر گذار باشد

کورتیزول تحت شرایط خاص خاصیت سرکوب کنندگی سیستم ایمنی دارد. که ظاهراً این موضوع بیشتر در مواقع طولانی شدن ترشح کورتیزول و ابقای میزان کورتیزول در حجم زیاد و زمان طولانی رخ می دهد. از این رو مکانیز مهای کاهش کورتیزول پلاسما می تواند از اثرات منفی کورتیزول جلوگیری کند. مکانیز مها ی کاهش ترشح کورتیزول بعد از حذف عامل استرس زا شامل جذب از طریق بافت ها وترشح کورتیزول به بیرون از طریق کلیه ناشی از غیبت پروتئین های حامل cortisol binding globulin CBP است. بسیاری از عوامل محیطی از جمله درجه حرارت، حالت تغذبه و شوری در حذف کورتیزول نقش دارند .با این وجود مکانیزم های حذف کورتیزول در ماهیان استخوانی هنوز به طور کامل شناخته شده نیست (Davis and Small, 2006).

یکی از پذیرفته شده ترین فرضیه ها در مورد اثرات مفید مشاهده شده نوکلئوتیدهای جیره در ماهیان این است که در شرایط استرس زای محیطی مثل کیفیت بد آب، تراکم و دستکاری میزان تقاضای نوکلئوتید در بدن افزایش می یابد (Leonardi et al., 2003). Burrells و همکاران (2001) اول بار این فرضیه را مطرح ساختند که نوکلئوتیدهای جیره می توانند تحمل استرس را افزایش دهند و شواهدی را از طریق مقایسه ظرفیت تنظیم اسمزی و عملکرد رشدی آتلانتیک سالمونِ تغذیه شده با جیره دارای نوکلئوتید و جیره شاهد بعد از استرس حاد ناشی از انتقال به آب دریا فراهم کردند. این فرضیه به طور کامل اثبات نشد تا این که Leonardi و همکاران (2003)

مشاهده نمودند که نوکلئوتیدهای جیره سطوح کورتیزول سرم قزل آلای سالم را بعد از 90-120 روز تغذیه و ماهیان عفونی شده با ویروس نکروز لوزالمعده را کاهش دادند. این کاهش استرس مرتبط با نوکلئوتیدهای جیره منجر به افزایش مقاومت به بیماری برای ماهیان در همان مطالعه شد. Holt و همکاران (2007) نشان دادند که حذف کورتیزول در مهره داران عالی با میزان چربی کبد بیشتر با سرعت بیشتری نسبت به مهره داران با چربی کبد کمتر رخ می دهد.

فاکتور رهاسازی کورتیکو تروپین CFR (یک پپتید با 41 اسید آمینه) که توسط نورون ها در مغز تولید می شوند نقش محوری را در پاسخ به استرس و تنظیم محور HPI ایفا می کند. همچنین این پپتید دستگاه عصبی سمپاتیک را هم کنترل می کند (Pepels and Balm, 2004). اثر نوکلئوتید بر بهبود پاسخ به استرس را می توان به نقش تنظیمی نوکلئوتیدها در سنتز و بیان ژن این هورمون دانست (Bernier et al., 2001).

Yamauchi و همکاران (2002) گزارش کردند که نوکلئوتیدها به طور قابل توجهی بر بیشتر وظایف سیستم عصبی مرکزی دخالت دارند بنابراین ممکن است که RNA و اوراسیل از تولید این هورمون استرس جلوگیری کنند و در نهایت منجر به بهبود عملکرد سیستم ایمنی و مصرف کمتر ذخایر انرژی بدن از جمله گلیکوژن کبدی می شوند. نتایج این تحقیق نیز نشان دهنده مصرف کمتر انرژی در شرایط استرس است و اشاره به این موضوع دارد که موجود با مصرف کمتر انرژی و دریک فاصله زمانی کمتر به حالت تعادل رسیده است. لازم به ذکر است که نوکلئوتیدها در مسیر بیوسنتز کربوهیدرات نقش مهمی ایفا می کنند بعنوان مثال یوریدین دی فسفات بعنوان حامل ویژه قند در بیو سنتز پلی ساکاریدها نقش ایفا می کنند. همچنین

نوکلئوتیدها با توجه به شرکت آنها در کوآنزیم ها در سنتز کلسترول نقش مهمی را در تنظیم ترشح هورمون کورتیزول ایفا می کنند.

تغییرات میزان هورمون های تیروئید در ماهیان استخوانی اساساً به کیفیت و کمیت غذا بستگی دارد. هورمو نهای تیروئیدی شاخص خوبی برای رشد ماهیان هستند. فعالیت های آنزیم

Iodothyronine deiodinase نقش مهمی در تنظیم غلظت هورمون های تیروئیدی پلاسما ایفا می کند(Ealse, 1998). McCormick و همکاران (1990) گزارش کردند که رژیم غذایی نقش بسیار مهمی در تولید هورمون های تیروئید در سالمون آتلانتیک بعد از انتقال به آب شور دارد. هورمون های تیروئیدی سبب افزایش گیرنده های کورتیزول در آبشش می شوند و با توجه به اینکه کورتیزول تحریک کننده فعالیت های آنزیم Na+ K+ ATPase است هورمون تیروئید از این طریق می تواند اثر مثبتی بر فعالیت این آنزیم داشته باشد (Evanes,2005). که در مطالعه حاضر نوکلئوتید باعث افزایش هورمون های تیروئید شده است. Transthyretin (TTR), thyroxine-binding globulin (TBG) و آلبومین از جمله پروتئین های حامل هورمون های تیروئیدی در پلاسما، تاثیر گذار در فرایند متابولیکی غده تیروئید است و تنظیم سطح هورمون های تیروئیدی هستند(Morgado et al., 2007). از طرف دیگر Grimble(1996) فرض کرده است که اضافه کردن نوکلئوتید به جیره سبب حفظ و ابقائ RNA در سلول های کبدی می شود و از آنجایی که بیشتر RNA کبد (85٪) از نوع RNA (rRNA) ریبوزومی است احتمالاً بااضافه کردن نوکلئوتید جیره سنتز پروتئین افزایش معنی داری را نشان می دهد. همچنین Perez و همکاران(2004) فرض کردند که نوکلئوتیدهای جیره, منجر به تحریک ساخت و ذخیره سازی انرژی در سلولها می شود بیشتر انرژی تولید شده توسط سلول برای تحریک و راه اندازی سنتز پروتئین استفاده می شود. که در مطالعه او پروتئین وآلبومین پلاسما در موش های تغذیه شده با نوکلئوتید بطور معنی داری نسبت به گروه کنترل بیشتر بود. با توجه به اثر مثبت نوکلئوتید در سنتز پروتئین ها احتمالاً افزایش میزان هورمون های تیروئیدی بواسطه افزایش سنتز پروتئین های حامل است که نقش اساسی در تنظیم سطح هورمون های تیروئیدی دارند. با توجه به این توضیحات نوکلئوتید جیره با اثر بر سیستم عصبی مرکزی، حفظ RNA سلول، پروتئین های حامل و سیستم عصبی سمپاتیک بر بهبود پاسخ به استرس و بهبود تغییرات هورمونی ماهی آزاد دریای خزر تاثیر گذار است

در مجموع با توجه به نتایج کسب شده از این تحقیق فرضیه بهبود پاسخ های استرس و فرایند تنظیم اسمزی با استفاده از نوکلئوتید جیره غذایی تائید شده و سطح 0/25 درصد برای تغذیه بچه ماهیان آزاد دریای خزردر بهبود پاسخ های استرس پیشنهاد می شود.

منابع

Boza, J., 1998: Nucleotide in infant nutrition. Monatsschr Kinderheilkd, 146: 39–48.

Burrells, C., William, P.D., Southage, P.J. & Wadsworth, S.L. (2001) 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.

Carey, J.B. & McCormick, S.D (1998) Atlantic salmon smolts are more responsive to an acute handling and confinement stress than parr. Aquaculture, 168: 237–253.

Dorafshan, S., Kalbassi, M.R., Pourkazemi, M., Mojazi Amiri, B. & Soltan Karimi, S. (2007) Effects of triploidy on the Caspian salmon Salmo trutta caspius haematology. Fish Physiol Biochem., Article in press.

Doumas Watson, W.A. (1971) Clin.Chem. Acta., 31, 86–87.

Evans, D.H. (2002) The physiology of fish. CRC Press, New York.

Holen, E., Bjørge, O. A. and Jonsson, R., 2005: Dietary nucleotides and human immune cells. II. Modulation of PBMC growth and cytokine secretion. Nutrition, 21: 1003–1009.

. Grimble, G. K., 1996: Why are dietary nucleotides essential nutrients? Br. J. Nutr., 76: 475–478.

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.

Li, P. & Gatlin III, D.M. (2006) Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. Aquaculture, 251, 141– 152.

Li, P., Lewis, D. H. and Gatlin III, D. M., 2004: Dietary oligonucleotide from yeast RNA influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (Morone chrysops× M. saxatilis) to Streptococcus iniae infection. Fish Shellfish Immunol., 16: 561– 569.

Moya-Falco´n, C., Hvattum, E., Dyrby, E., Skorve, J., Stefansson, S.O., Thomassen, M.S., Jakobsen, J.V., Berge, R.K.& Ruyter, B. (2004) Effects of 3-thia fatty acids on feed intake, growth, tissue fatty acid composition, h-oxidation and Na+,K+-ATPase activity in Atlantic salmon. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 139: 657–668

. Pérez, M. J., Sánchez-Medina, F., Torres, M., Gil, A. and Suárez, A., 2004: Dietary Nucleotides Enhance the Liver Redox State and Protein Synthesis in Cirrhotic Rats. J. Nutr., 134: 2504–2508.

Yamauchi, K., Hales, N. H, Robinson, S. M, Niehoff, M. L., Ramesh, V., Pellis, N. R and Kulkarni, A. D., 2002: Dietary nucleotides prevent decrease in cellular immunity in ground-based microgravity analog. J Appl Physiol 93: 161-166.