

# بررسی آسیب‌شناختی بخش پیشین روده بچه ماهیان تازه به تغذیه افتاده قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با سطوح مختلف HUFA و PUFA (C<sub>18</sub>) جیره غذایی

سعید حاجی‌نژاد<sup>۱</sup>، احمد ایمانی<sup>۱\*</sup>، فرزانه نوری<sup>۲</sup>، کوروش سروی مغاللو<sup>۱</sup>

\* a.imani@urmia.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ایران

۲- پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۶

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۶

## چکیده

عدم توازن در تغذیه اسیدهای چرب، حتی برای مدت کوتاه می‌تواند کارایی لاروها را دستخوش تغییر سازد. در این مطالعه اثر سطوح مختلف اسیدهای چرب HUFA و PUFA (C<sub>18</sub>) جیره غذایی بر بافت روده لاروهای تازه به تغذیه افتاده ماهی قزل-آلائی رنگین کمان بررسی شد. برای این منظور سطوح مختلف HUFA (صفر، ۱/۵، ۱ و ۲ درصد) در سطح ۲۰ درصد PUFA (آزمایش نخست) و سطوح مختلف PUFA (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد) در سطح ۸ درصد HUFA (آزمایش دوم) در جیره‌های غذایی آزمایشی ایجاد و به تغذیه لاروها رسید. مدت زمان انجام آزمایش شش هفته بود. در پایان آزمایش، از هر تیمار بصورت تصادفی شش عدد ماهی انتخاب و قسمت آغازین روده کوچک آن‌ها برای مطالعات بافت شناسی جدا گردید. با توجه از هم-گسیختگی و ریزش اپیتلیوم و حضور واکوئل‌های چربی انتروسیته‌های بخش پیشین روده بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان، می‌توان چنین بیان نمود که هرگاه میزان PUFA جیره غذایی ۲۰ درصد باشد، برای جلوگیری از آثار نامطلوب چنین افزایشی (عموماً به دلیل جایگزینی روغن ماهی با منابع ارزان‌قیمت گیاهی) سطح HUFA جیره غذایی باید افزایش یابد و بهترین میزان آن در این مطالعه ۲ درصد برآورد گردید. همچنین در آزمایش دوم (سطح HUFA ۸ درصد چربی جیره غذایی)، با افزایش سطح PUFA تا ۴۰ درصد چربی جیره غذایی، شاخص‌های بافتی بهبود یافت. علاوه بر این، کمترین تعداد سلول‌های جامی و در نتیجه بیشترین تعداد سلول‌های جاذب در تیمارهای ۳ و ۶ قابل مشاهده بود. نتیجه آنکه در گروه‌های تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲۰ درصد PUFA و ۲ درصد HUFA یا ۴۰ درصد PUFA و ۸ درصد HUFA، تعداد واکوئل‌های چربی کمترین بوده و اپیتلیوم طبیعی در بافت روده قابل مشاهده بود.

**کلمات کلیدی:** روده پیشین، HUFA، PUFA (C<sub>18</sub>)، بچه ماهیان تازه به تغذیه افتاده، *Oncorhynchus mykiss*

\* نویسنده مسئول

## مقدمه

دستیابی به فناوری‌های تولید انبوه بچه ماهیان نارس و انگشت قد از دلایل موفقیت پرورش گونه‌های مختلف ماهی و سخت پوستان در دهه‌های ۷۰ و ۸۰ بوده است که در سایه دستیابی به فنون مدیریت گله مولدین، کنترل تولید مثل در اسارت، تولید غذای مناسب و کنترل بیماری‌ها است (Sorgeloos & Leger, 1992). عدم توازن اسیدهای چرب در جیره غذایی لاروها، حتی بصورت دوره‌ای و نه طولانی مدت می‌تواند کارایی آبزیان را دستخوش تغییر سازد. برای مثال تغذیه لاروها با مقادیر بالای اسید دوکوزاهگزانوئیک برای مدت طولانی (دو روز در مقایسه با چهار روز) موجب کاهش کیفیت و بقاء آن‌ها می‌شود، که موید اهمیت مدیریت تغذیه اسیدهای چرب ضروری در موفقیت پرورش لاروها است (Dhert et al., 1992). همچنین طول زنجیره و درجه اشباع نشدگی اسیدهای چرب جیره غذایی می‌تواند بر فرآیند گوارش و سرانجام جذب چربی توسط آبزی اثر بگذارد (Olsen et al., 2000). برای مثال سطوح بالای اسیدهای چرب غیر اشباع و مقادیر پایین ویتامین E موجب افزایش احتمال تشکیل لیپوفوشین می‌گردد (Agius & Robert, 2003). توانایی رشد و تکامل لارو علاوه بر کمیت و کیفیت غذای مورد استفاده، به وضعیت عملکرد دستگاه گوارش آن نیز وابسته است، چه بسا که بلوغ دستگاه گوارش از نظر عملکردی که سرانجام در ظرفیت گوارشی دستگاه گوارش حیوان اثر می‌گذارد، کاملاً تحت تاثیر عوامل تغذیه‌ای قرار دارد (Wold et al., 2007). مطالعه آنتروسیته‌های روده لارو ماهیان (به عنوان سلول‌های موثر در جذب مواد مغذی) تحت تاثیر مرحله تکاملی و وضعیت تغذیه‌ای فرد می‌باشد. تغذیه نامناسب موجب تجمع قطرات چربی در آنتروسیته‌ها شده که نشان دهنده عدم توانایی سلول‌ها در انتقال تری‌آسیل-گلیسیریدها است که با افزودن فسفولیپیدها به جیره غذایی برطرف می‌شود. حال اگر در ساختار فسفولیپیدها اسیدهای چرب ضروری n-۳ وجود داشته باشد، این ترکیبات به طور موثر مورد استفاده قرار گرفته و موجب بلوغ سریع دستگاه گوارش می‌شوند (Tocher et al., 2008).

از آنجا که تولید روغن ماهی طی سال‌های گذشته از روند یکنواختی برخوردار بوده است، تحقق توسعه آتی صنعت آبزی پروری با تکیه بر ذخایر ماهیان دریایی برای تولید روغن

ماهی امر غیر ممکن به نظر می‌رسد (Turchini et al., 2009). از سوی دیگر رغبت زیادی برای تامین بخشی از نیازهای غذایی آبزیان از منابع ارزان و قابل دسترس گیاهی وجود دارد. اما جایگزینی روغن ماهی با روغن‌های گیاهی و روغن حیوانی در جیره غذایی آبزیان می‌تواند سبب تغییرات بافت دستگاه گوارش به عنوان نخستین و مهمترین بخش فعال در تغذیه و تدارک مواد مغذی جهت انجام فعالیت‌های طبیعی بدن گشته و سرانجام موجب تغییر کارایی تغذیه آبزی شود (Caballero et al., 2003). همانطور که Wold و همکاران (۲۰۰۷) بیان کرده‌اند عوامل تغذیه نقش بسزایی در بلوغ دستگاه گوارش از نظر عملکردی و در نتیجه ظرفیت گوارشی آبزی ایفا می‌نمایند. از آنجا که گونه‌های مهره‌داران قادر به ساخت زیستی هیچ کدام از اسیدهای چرب چند غیراشباع (PUFA) از اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه نمی‌باشند، بنابراین نیاز مطلق غذایی به انواع معینی از PUFA گروه n-۳ و n-۶ دارند. کمبود غذایی این "اسیدهای چرب ضروری" موجب آسیب‌های متعددی در آبزی گشته و موجب توقف رشد و تولیدمثل و سرانجام منجر به مرگ حیوان می‌گردد. انواع PUFA فعال زیستی برای بسیاری از فرآیندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی شامل اسیدهای چرب چند غیراشباع بلند زنجیره (LC-PUFA) همچون n-۶ ۲۰:۴ (اسید آراشیدونیک، ARA)، n-۳ ۲۰:۵ (EPA) و n-۳ ۲۲:۶ (DHA) می‌باشند. با این حال، PUFA زنجیره کوتاه (C<sub>18</sub>) مانند اسید لینولئیک و اسید آلفا لینولئیک، به خودی خود هیچ نقش متابولیکی ویژه‌ای ندارند. البته آنها می‌توانند به عنوان پیش‌سازهای LC-PUFA گروه n-۳ و n-۶ عمل نمایند (NRC, 2011). همچنین سطوح بالای اسیدهای چرب ضروری در جیره‌های غذایی موجب آثار زیانباری در آبزیان می‌گردد (Tacon, 1992).

با توجه به اینکه امروزه متخصصین تغذیه آبزیان در پی جایگزینی منابع دریایی چربی با منابع گیاهی هستند، سعی بر این است تا اثر سطوح مختلف HUFA و PUFA (C<sub>18</sub>) جیره غذایی بر تعداد سلول‌های جامی و همچنین تغییرات آسیب شناختی روده پیشین لاروهای ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مورد بررسی قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

پس از تهیه اقلام اولیه غذایی، آسیاب نمودن و الک کردن آن‌ها (حداکثر اندازه ذرات غذایی ۲۰۰ میکرون بودند) و انجام آنالیزهای شیمیایی، تنظیم جیره‌های آزمایشی (جدول ۱) جهت ایجاد سطوح مختلف PUFA و HUFA در دان‌های غذایی به کمک نرم افزار جیره نویسی WUFFDA صورت گرفت. در نهایت خمیر حاصل از ترکیب اجزاء سازنده غذا به همراه آب مقطر، به کمک چرخ گوشت بصورت رشته‌های نازک (کمتر از یک میلی‌متر) در آمد. رشته‌ها پس از خشک کردن، خرد شدند. در نهایت با الک با چشمه‌های مختلف ذرات غذایی با اندازه‌های مختلف از یکدیگر جدا گردیدند تا در مراحل مختلف رشد لاروها مورد استفاده قرار گیرند. دان‌های غذایی خشک شده، در طول دوره آزمایش در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. جیره‌های آزمایشی به لحاظ میزان چربی، پروتئین و انرژی یکسان بودند و فقط سطح PUFA و HUFA جیره‌ها متفاوت بود. منبع روغن یا چربی جیره‌ها برای گروه شاهد روغن ماهی و برای گروه‌های دیگر از ترکیب روغن‌های نارگیل، کنجد، زیتون، کانولا، آفتابگردان و روغن ذرت بود به نحوی که سطوح مختلف اسیدهای چرب HUFA (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ درصد) در سطح PUFA ۲۰ درصد و سطوح مختلف PUFA (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد) در سطح HUFA ۸ درصد ایجاد گردید. جهت تعیین الگوی اسیدهای چرب جیره غذایی، استخراج چربی با استفاده از دی اتیل اتر در دمای ۴۰°C انجام شد. پس از تزریق متیل استر به دستگاه کروماتوگرافی گازی، درصد هر اسید چرب به کل اسیدهای چرب هر نمونه با مقایسه سطح زیر منحنی‌های هر اسید چرب با سطح زیر منحنی استاندارد داخلی محاسبه شد (عشقی و همکاران، ۱۳۹۶). همچنین تجزیه تقریبی اقلام غذایی (شامل درصد پروتئین، چربی و خاکستر لاشه) طبق روشهای استاندارد تعیین شد (AOAC, 1990) و سایر موارد (شامل فیبر، انرژی خام و کربوهیدرات به روش محاسباتی و جداول استاندارد نهاده‌های غذایی تعیین شدند (NRC, 2011).

لاروهای نژاد ایرانی ماهی قزل آلا رنگین کمان پس از تخم گشایی و در زمان شروع تغذیه فعال (وزن تقریبی ۲۰۰ میلی‌گرم) با تراکم ۱۰۰ قطعه لارو در هر مخزن پرورشی (مخازن ۲۰ لیتری) به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب دو

آزمایش هر آزمایش با ۴ تیمار (هر تیمار ۳ تکرار) ذخیره-سازی شدند. غذادهی روزانه در ۸ نوبت و بمدت ۶ هفته انجام شد. نمونه‌برداری از تیمارها جهت تعیین شاخص‌های رشد و کارایی تغذیه‌ای به تعداد ۳۰ عدد لارو از هر تکرار در فواصل زمانی ۷ روز انجام شد. غذادهی ماهیان تیمارهای مختلف روزانه در چهار وعده غذایی و با توجه دمای آب و وزن ماهیان انجام شد (نازدار و همکاران، ۱۳۹۵). در طول دوره پرورش، فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب شامل دما و میزان اکسیژن محلول بطور مرتب بصورت هفتگی اندازه‌گیری و ثبت شد (درجه حرارت آب  $14 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول  $8.2 \pm 0.2$  میلی گرم در لیتر)، این مقادیر در محدوده مناسب برای پرورش ماهی قزل آلا رنگین کمان بود.

نمونه‌برداری از تیمارها بصورت کاملاً تصادفی در انتهای دوره پرورشی به تعداد ۲ عدد از هر تکرار (۶ ماهی از هر تیمار) انجام گرفت. نمونه‌ها جهت بررسی مطالعات بافت‌شناسی داخل محلول بوئن تثبیت شده و پس از ۷۲ ساعت به الک اتانول ۷۰ درصد انتقال داده شدند. بلوک‌های پارافینی پس از طی مراحل پاساژ بافتی تهیه گردیدند. سپس از بلوک‌ها برشهای سریالی با ضخامت ۴ میکرون تهیه شد (ROTO-CUT 200 Scilab) و به شیوه هماتوکسیلین-اُوزین (H&E) و پرئودیک اسید شیف (PAS) رنگ آمیزی شدند. پس از انجام رنگ‌آمیزی، به منظور حفظ برش و ثابت ماندن آن روی لام، سطح آن‌ها با لامل پوشانیده شد (پوستی و ادیب مرادی، ۱۳۸۵). در رنگ‌آمیزی H&E، سیتوپلاسم و سایر سلول‌ها، صورتی رنگ، هسته به رنگ آبی و غضروف آبی خاکستری رنگ می‌گردند. در این مطالعه برای مشخص شدن سلول‌های جامی و شمارش بهتر آنها از رنگ آمیزی PAS استفاده شد. برای شمارش تعداد سلول‌های جامی و جاذب عکس‌های مورد نظر از مقاطع بافتی به کمک نرم افزار DinoCapture 2.0 تهیه شد.

**آنالیز آماری:** پیش از انجام آنالیز آماری مربوط داده‌های رشد (وزن نهایی و میزان افزایش وزن) نرمال بودن توزیع داده‌ها و همچنین همگنی واریانس‌ها به ترتیب توسط آزمون شاپیروویلیک و لون مورد بررسی قرار گرفت و سرانجام گروه‌های آزمایشی از نظر تاثیرگذاری تیمارهای اعمال شده توسط آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی مورد مقایسه قرار گرفتند. داده‌های شمارشی مربوط به سلول‌های جامی و جاذب

توسط آزمون مربع کای مقایسه شدند. همه آنالیزها در محیط نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ صورت پذیرفت و سطح خطای نوع میانگین  $\pm$  خطای استاندارد ارائه شدند. نتایج بصورت

جدول ۱: ترکیب، تجزیه تقریبی و الگوی اسیدهای چرب جیره‌های غذایی آزمایشی

Table 1: Formulation, proximate composition and fatty acid profile of experimental diets

| ترکیب جیره‌های آزمایشی                                                                                                                                 |            |                          |            |                           |       |       |       |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------|------------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|
| پودر ماهی کیلکا                                                                                                                                        | ۲۰ درصد    | ویتامین C                | ۰/۰۶ درصد  |                           |       |       |       |       |
| گلوتن ذرت                                                                                                                                              | ۵ درصد     | ویتامین E                | ۰/۰۵ درصد  |                           |       |       |       |       |
| گلوتن گندم                                                                                                                                             | ۲۰ درصد    | آنتی اکسیدان صنعتی (BHT) | ۰/۰۲ درصد  |                           |       |       |       |       |
| پودر خون                                                                                                                                               | ۱ درصد     | آستاگزانتین              | ۰/۰۶ درصد  |                           |       |       |       |       |
| سویا                                                                                                                                                   | ۱۵ درصد    | دی کلسیم فسفات           | ۲ درصد     |                           |       |       |       |       |
| نشاسته                                                                                                                                                 | ۲ درصد     | مخمر نانوائی             | ۲ درصد     |                           |       |       |       |       |
| آرد گندم                                                                                                                                               | ۱۰ درصد    | لیزین                    | ۱ درصد     |                           |       |       |       |       |
| پرمیکس معدنی                                                                                                                                           | ۵ درصد     | متیونین                  | ۰/۶۲ درصد  |                           |       |       |       |       |
| تجزیه تقریبی جیره‌های آزمایشی                                                                                                                          |            |                          |            |                           |       |       |       |       |
| پروتئین خام                                                                                                                                            | ۴۲/۲۵ درصد | کربوهیدرات               | ۱۴/۵ درصد  |                           |       |       |       |       |
| چربی خام                                                                                                                                               | ۱۹ درصد    | فیبر                     | ۲/۵ درصد   |                           |       |       |       |       |
| خاکستر                                                                                                                                                 | ۳/۷۵ درصد  | انرژی خام                | ۳۴۰۰ کالری |                           |       |       |       |       |
| الگوی اسیدهای چرب (درصد از کل اسیدهای چرب)                                                                                                             |            |                          |            |                           |       |       |       |       |
| جیره‌های غذایی آزمایش نخست                                                                                                                             |            |                          |            | جیره‌های غذایی آزمایش دوم |       |       |       |       |
| جیره غذایی                                                                                                                                             | ۱          | ۲                        | ۳          | ۴                         | ۵     | ۶     | ۷     | ۸     |
| SFA                                                                                                                                                    | ۲۶/۱۴      | ۲۵/۶۴                    | ۲۵/۲۶      | ۲۴/۲۱                     | ۱۷/۹۸ | ۱۸/۰۸ | ۱۸/۱۱ | ۱۸/۲۱ |
| MUFA                                                                                                                                                   | ۵۱/۲۳      | ۵۱/۲۴                    | ۵۱/۱۷      | ۵۱/۱۹                     | ۶۲/۵۴ | ۵۱/۱۵ | ۳۹/۸۷ | ۲۸/۴۸ |
| C18:2n-6                                                                                                                                               | ۱۶/۳۷      | ۱۶/۳۴                    | ۱۶/۳۱      | ۱۶/۳۳                     | ۷/۴۵  | ۱۶/۳۲ | ۲۵/۱۶ | ۳۴/۰۴ |
| C18:3n-3                                                                                                                                               | ۴/۲۵       | ۴/۲۶                     | ۴/۲۴       | ۴/۲۴                      | ۱/۹۴  | ۴/۲۴  | ۶/۵۵  | ۸/۸۷  |
| PUFA                                                                                                                                                   | ۲۰/۶۱      | ۲۰/۶۰                    | ۲۰/۵۷      | ۲۰/۵۷                     | ۹/۳۹  | ۲۰/۵۶ | ۳۱/۷۱ | ۴۲/۹۱ |
| HUFA                                                                                                                                                   | ۰/۰۱       | ۰/۵۱                     | ۱/۰۱       | ۲/۰۳                      | ۸/۰۹  | ۸/۰۹  | ۸/۱۰  | ۸/۱۰  |
| SFA: اسیدهای چرب اشباع، MUFA: اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه، PUFA: اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه، HUFA: اسیدهای چرب بلند زنجیره با چند پیوند دوگانه |            |                          |            |                           |       |       |       |       |

SFA: اسیدهای چرب اشباع، MUFA: اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه، PUFA: اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه، HUFA: اسیدهای چرب بلند زنجیره با چند پیوند دوگانه

## نتایج

### شاخص‌های رشد

نتایج شاخص‌های رشد ماهیان (جدول ۲) در پایان دوره پرورش نشان داد که در آزمایش اول که از جیره‌های غذایی با سطح PUFA ثابت ۲۰ درصد و دارای سطوح افزایشی HUFA تغذیه شدند، با افزایش میزان HUFA جیره غذایی از رشد آن‌ها کاسته شد، البته هرچند این مقادیر از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. در آزمایش دوم با جیره‌های غذایی دارای سطح ثابت HUFA (۸ درصد) و سطوح افزایشی PUFA، بتدریج با افزایش PUFA از رشد ماهیان کاسته شد ( $p < 0/05$ )، بطوریکه در آزمایش اول و دوم

بیشترین میزان رشد به ترتیب مربوط به جیره‌های غذایی ۲ و ۶ بود.

**شمارش سلول‌های جاذب و جامی:** نتایج آنالیز آماری تعداد سلول‌های جاذب (Enterocytes) و جامی (Goblet) گروه‌های مختلف آزمایشی در جدول ۳ آمده است. کمترین تعداد سلول‌های جامی و در نتیجه بیشترین تعداد سلول‌های جاذب در تیمارهای ۳ ( $PUFA=20$  و  $HUFA=1$ ) و ۶ ( $PUFA=20$  و  $HUFA=8$ ) قابل مشاهده بود. چنین می‌توان بیان نمود که با افزایش سطح HUFA جیره برای بهبود روند جذب مواد مغذی باید سطح PUFA جیره غذایی افزایش یابد.

جدول ۲: شاخص‌هایی رشد گروه‌های آزمایشی در پایان دوره پرورش (Mean±SE, n=۳)

Table 2: Growth indices of various dietary groups at the end of experiment

| (Mean±SE, n=3)                                                                                 |                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------|
| افزایش وزن (میلی گرم)                                                                          | وزن نهایی (میلی گرم)       | تیمار     |
| ۶۵۳/۹۷±۲۳/۰۹                                                                                   | ۸۹۸/۹۷±۴۵/۰۵               | HUFA=٪۰   |
| ۶۶۰/۰۲±۱۴/۳۴                                                                                   | ۹۰۵/۰۲±۳۰/۵۳               | HUFA=٪۰/۵ |
| ۶۰۲/۹۲±۲۰/۲۴                                                                                   | ۸۴۷/۹۲±۶۲/۴۷               | HUFA=٪۱   |
| ۵۹۶/۳۲±۱۰/۱۸                                                                                   | ۸۴۱/۳۲±۸/۹۵                | HUFA=٪۲   |
| ۰/۶۱                                                                                           | ۰/۶۱                       | P-value   |
| ۶۲۳/۰۳±۳۶/۱۴ <sup>b</sup>                                                                      | ۸۷۱/۳۶±۵۸/۷۱ <sup>b*</sup> | PUFA=٪۱۰  |
| ۶۳۲/۳۰±۱۵/۲۴ <sup>b</sup>                                                                      | ۸۷۷/۳۰±۱۹/۵۲ <sup>b</sup>  | PUFA=٪۲۰  |
| ۲۵۰/۳۰±۱۸/۲۳ <sup>a</sup>                                                                      | ۴۹۵/۲۸±۲۸/۶۴ <sup>a</sup>  | PUFA=٪۳۰  |
| ۲۶۹/۶۴±۲۴/۰۶ <sup>a</sup>                                                                      | ۵۱۴/۶۴±۲۳/۰۹ <sup>a</sup>  | PUFA=٪۴۰  |
| ۰/۰۰                                                                                           | ۰/۰۰                       | P-value   |
| * حروف متفاوت در هر ستون (برای هر گروه آزمایشی) نشانه وجود اختلاف معنی دار آماری است (p<۰/۰۵). |                            |           |

افزایش میزان PUFA در جیره غذایی، تعداد این واکوئل‌ها کاهش یافت، به نحوی که در گروه دریافت کننده ۴۰ درصد PUFA و ۸ درصد HUFA تعداد این واکوئل‌ها کمترین بود و اپیتلیوم کاملاً طبیعی قابل مشاهده بود (شکل ۳، D). در رنگ آمیزی به شیوه PAS (شکل ۴) مشخص شد که این واکوئل‌ها مربوط به تجمع چربی در داخل سلول‌های اپیتلیوم بود، که در موارد شدید سبب از هم گسیختگی سلول‌ها و ریزش سلولی اپیتلیوم شد. نسبت تعداد سلول‌های جامی به سلول‌های اپیتلیالی دارای تجمعات چربی رفته رفته با افزایش میزان PUFA جیره افزایش یافت و در گروه دریافت کننده ۴۰ درصد PUFA به حداکثر خود رسید و روده به شکل طبیعی خود بازگشت.

در رنگ‌آمیزی PAS مشخص شد که اکثریت این واکوئل‌ها مربوط به تجمع چربی در داخل سلول‌های اپیتلیوم و نه مربوط به افزایش تعداد سلول‌های جامی بود، که در موارد شدید سبب از هم گسیختگی سلول‌ها و ریزش سلولی اپیتلیوم شد. نسبت تعداد سلول‌های جامی به سلول‌های اپیتلیالی دارای تجمعات چربی رفته رفته با افزایش میزان HUFA جیره افزایش یافت و در گروه دریافت کننده ۲ درصد HUFA به حداکثر خود رسید و روده شکل طبیعی خود را بازیافت.

### بررسی‌های آسیب شناسی بافت روده ابتدایی

**آزمایش نخست:** مقاطع عرضی روده کوچک نشان دهنده از هم گسیختگی و ریزش اپیتلیوم و حضور واکوئل‌های فراوان در داخل سلول‌های اپیتلیالی روده بود (شکل ۱، A) با پیکان نشان داده شده است. میزان این واکوئل‌ها در لاروهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲۰ درصد PUFA و فاقد HUFA بیشترین بوده (شکل ۱، A) و به تدریج با افزایش میزان HUFA جیره غذایی از تعداد این واکوئل‌ها کاسته شد. در لاروهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲۰ درصد PUFA و ۲ درصد HUFA تعداد این واکوئل‌ها کمترین تعداد بود و اپیتلیوم کاملاً ظاهری طبیعی داشت (شکل ۱، D). برای تعیین ماهیت این واکوئل‌ها و تشخیص تفریقی مابین سلول‌های جامی و واکوئل‌های چربی، رنگ آمیزی PAS انجام شد (شکل ۲).

### آزمایش دوم: مقاطع عرضی روده کوچک نشان دهنده

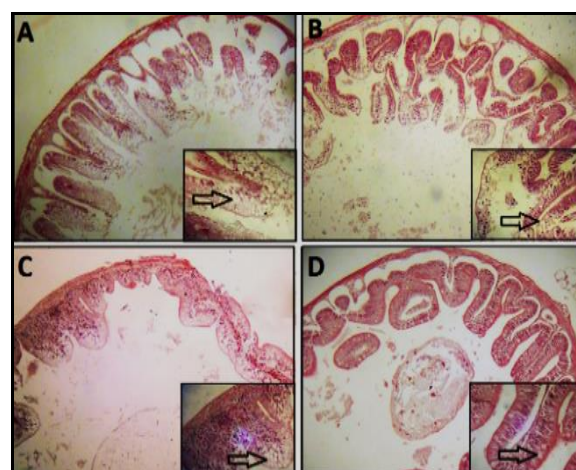
از هم گسیختگی و ریزش اپیتلیوم و حضور واکوئل‌های فراوان در داخل سلول‌های اپیتلیالی روده بود، که با فلش نشان داده شده‌اند (شکل ۳). میزان این واکوئل‌ها در لاروهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۰ درصد PUFA و ۸ درصد HUFA بیشترین (شکل ۳، A) و به تدریج با

جدول ۳: تعداد سلول‌های جاذب و جامی تیمارهای مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش (درصد)

Table 3. Enterocyte and goblet cell counts of various experimental groups (percent)

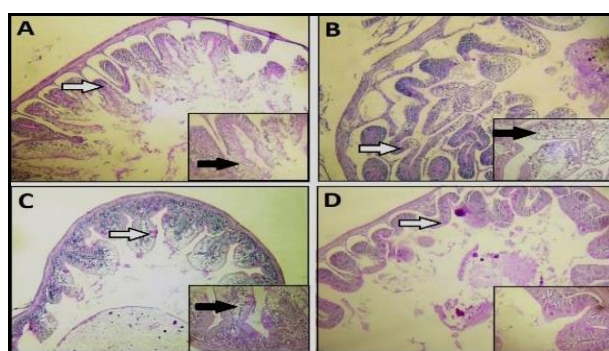
| آزمایش نخست (PUFA=۲۰٪) |                   |                   |                   |                  |      |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------|
| تیمارهای آزمایشی       |                   |                   |                   |                  |      |
| HUFA=۲٪                | HUFA=۱٪           | HUFA=۰.۵٪         | HUFA=۰٪           |                  |      |
| ۳۶/۷ <sup>b</sup>      | ۵۴ <sup>a</sup>   | ۳۵/۸ <sup>b</sup> | ۲۸/۳ <sup>b</sup> | تعداد مشاهده شده | جاذب |
| ۶۳/۳ <sup>a</sup>      | ۴۶ <sup>b</sup>   | ۶۴/۲ <sup>a</sup> | ۷۱/۷ <sup>a</sup> | تعداد مشاهده شده | جامی |
| آزمایش دوم (HUFA=۸٪)   |                   |                   |                   |                  |      |
| تیمارهای آزمایشی       |                   |                   |                   |                  |      |
| PUFA=۴۰٪               | PUFA=۳۰٪          | PUFA=۲۰٪          | PUFA=۱۰٪          |                  |      |
| ۳۵ <sup>c</sup>        | ۵۱/۴ <sup>b</sup> | ۶۰ <sup>a</sup>   | ۵۷ <sup>ab</sup>  | تعداد مشاهده شده | جاذب |
| ۶۵ <sup>a</sup>        | ۴۸/۶ <sup>b</sup> | ۴۰ <sup>b</sup>   | ۴۳ <sup>b</sup>   | تعداد مشاهده شده | جامی |

گوارش به ویژه بخش پیشین روده طی تکامل توسعه یافته و متأثر از غذای مصرفی گونه‌ها، امکان گوارش کارآمد بویژه چربی‌ها را فراهم می‌سازد (NRC, 2011). همچنین، آنتروسیست‌های روده وظیفه جذب و ترشح آنزیم‌های گوارشی را برعهده دارد و هر گونه کاهش ارتفاع و تعداد آنتروسیست‌های روده لارو ماهیان نشان دهنده عدم توانایی جذب، کاهش رشد و شرایط نامناسب تغذیه ای می باشد (Hall & Bellwood, 1995). بنابراین با توجه به اهمیت هیستومورفولوژی بخش پیشین روده، در این مطالعه سعی شد تا تاثیر سطوح مختلف PUFA و HUFA جیره غذایی بر سلامتی این بخش از دستگاه گوارش بچه‌ماهیان نوس ماهی قزل آلا رنگین کمان مورد بررسی قرار گیرد.



شکل ۱: مقاطع عرضی روده کوچک، واکوئل‌ها با پیکان نشان داده شده‌اند. میزان این واکوئل‌ها در تصویر A که مربوط به لاروهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲۰ درصد PUFA و فاقد HUFA بیشترین بوده و در تصاویر C و D رفته رفته کاهش یافته‌اند، که ترتیب مربوط به جیره‌های حاوی ۱ و ۲ درصد HUFA می‌باشند (H & E,  $\times 100$ ,  $\times 400$ ).

Figure 1: Cross sectional view of small intestine. Vacuoles in intestinal epithelia were indicated. Vacuoles count in larvae fed diets containing 20 % PUFA and lacking HUFA were the most (A) while their numbers were gradually decreased in those larvae received diets contained 1 and 2 % HUFA (C and D) (H & E,  $\times 100$ ,  $\times 400$ ).



شکل ۲: مقاطع عرضی روده کوچک با رنگ آمیزی PAS نشان دهنده حضور فراوان واکوئل‌های چربی داخل سلول‌های اپیتلیال روده می باشد که با پیکان سیاه رنگ نشان داده شده است (H & E,  $\times 100$ ,  $\times 400$ ).

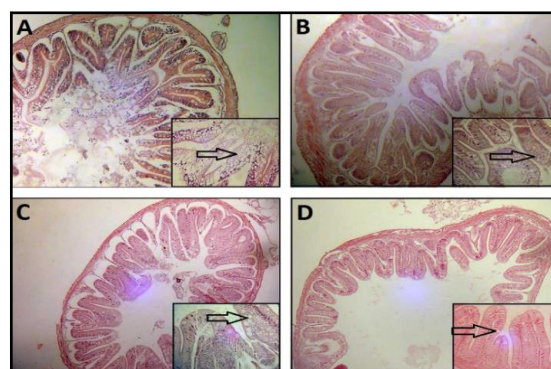
Figure 2: Cross sectional view of small intestine (PAS staining). Vacuoles in intestinal epithelia were indicated ( $\times 100$ ,  $\times 400$ ).

## بحث

گوارش فرآیند انحلال و تجزیه مواد مغذی به اجزاء و عناصر ریزتر قابل انتقال از میان دیوار روده به منظور حمایت از فرآیندهای فیزیولوژیکی بدن حیوان است. آناتومی دستگاه

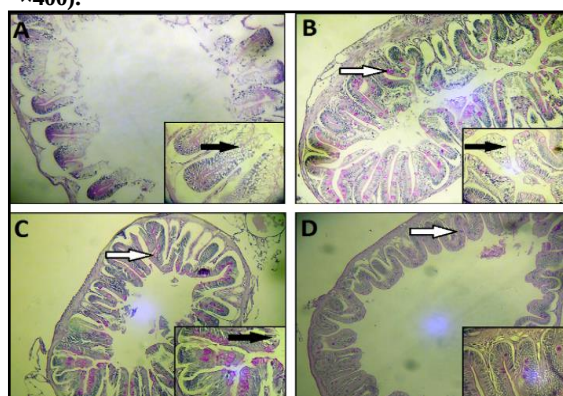


در کفشک ماهی دگرگونی ریخت شناسی روده قبل از انتقال از مرحله لاروی به بزرگسالی اتفاق می افتد که شامل کوتاه شدن ضخامت اپیتلیوم، افزایش تعداد چین های سطح اپیتلیوم و تکثیر سلول های اپیتلیوم و مزانشیمی می باشد (NRC, 2011). Salhi و همکاران (۱۹۹۹) در بررسی اثرات نسبت های مختلف EPA/DHA بر روده لارو ماهی سیم سرطلایی دریافتند که EPA/DHA در نسبت بالای ۰/۶۲ سبب تجمع قطرات چربی در قسمت اپیتلیوم روده می شود. اثر جایگزینی روغن ماهی با روغن های گیاهی و در نتیجه تغییر نسبت اسیدهای چرب ضروری جیره غذایی بر وضعیت تکاملی روده لارو ماهی سیم سرطلایی حاکی از عدم وجود تفاوت قابل توجه در ارتفاع و تعداد چین های اپیتلیوم روده لارو های گروه های آزمایشی با تیمار شاهد بود. همچنین تفاوت عمده در تجمع قطرات زیاد چربی در آنتروست های روده لاروهای تغذیه شده با ۸۰ درصد جایگزینی روغن بذر کتان مشاهده شد (Caballero et al., 2003). همچنین Castro و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی تأثیر جایگزینی روغن ماهی با روغن گیاهی در هیستومورفولوژی دستگاه گوارش ماهی های جوان باس دریایی اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) دریافتند که هیچ گونه تغییری در هیستومورفولوژی بافت پیلوریک، قسمت قدامی و خلفی روده ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی روغن گیاهی مشاهده نگردید، در حالی که تجمع واکوئل های چربی در کبد این ماهیان قابل مشاهده بود. در پژوهشی Modal و همکاران (۲۰۱۴) تأثیر جایگزین روغن ماهی جیره غذایی آزاد ماهی اقیانوس اطلس با منابع گیاهی را مورد بررسی قرار دادند. بررسی ایمونوهیستوشیمی و بافت شناسی هیچ تفاوتی در میزان التهاب و یا تکثیر سلول های مخاطی در ارتباط با گروه های غذایی نشان نداد. البته تغییراتی در میزان بیان ژن های سیستم ایمنی قابل مشاهده بود. هرچند ممکن است با کوتاه شدن چین روده سطح روده کاهش یابد و در جذب مواد غذایی یا رشد اختلال ایجاد شود، اما نتایج نشان داد که جایگزینی بخشی از روغن ماهی جیره غذایی با روغن های گیاهی هیچ تأثیر منفی ملموسی در سلامت روده آزاد ماهی اقیانوس اطلس نداشت. در مطالعه حاضر بررسی بافتی روده ماهیان در آزمایش اول نشان داد که به تدریج با افزایش میزان HUFA جیره غذایی از تعداد این واکوئل های چربی



شکل ۳: مقاطع عرضی روده کوچک، واکوئل های فراوان در اپیتلیوم روده قابل مشاهده هستند که با فلش نشان داده شده اند. تعداد این واکوئل ها در تصویر A که مربوط به گروه دریافت کننده ۱۰٪ PUFA و ۸٪ HUFA است به بیشترین میزان و در تصاویر B، C و D به ترتیب با ۲۰، ۳۰، ۴۰ و مقدار ۸٪ HUFA درصد کاهش پیدا کرده و در تصویر D به کمترین میزان خود رسید (H & E,  $\times 100$ ,  $\times 400$ ).

Figure 3: Cross sectional view of small intestine. Vacuoles in intestinal epithelia were indicated. Vacuoles count in larvae fed diets containing 10 % PUFA and 8 % HUFA were the most (A) while their numbers were gradually decreased in those larvae received diets contained 20, 30 and 40 % PUFA at the fixed level of 8 % HUFA (B, C and D) (H & E,  $\times 100$ ,  $\times 400$ ).



شکل ۴: مقاطع عرضی روده کوچک با رنگ آمیزی PAS نشان دهنده حضور فراوان واکوئل های چربی داخل سلول های اپیتلیال روده می باشد که با فلش سیاه رنگ نشان داده شده است. همچنین تعداد کمی سلول های جامی که با فلش سفید رنگ نشان داده شده است نیز قابل مشاهده است. در تصویر D تعداد فراوان سلول های جامی مشاهده می گردد و روده ظاهر و ساختار طبیعی دارد (PAS,  $\times 100$ ,  $\times 400$ ).

Figure 4: Cross sectional view of small intestine (PAS staining) indicating frequently visible lipid vacuoles in intestinal epithelia (dark arrows). Less frequent lipid vacuoles were also depicted (light arrows). Higher frequency of goblet cells with normal histology was observable in fig. D ( $\times 100$ ,  $\times 400$ ).

کاسته شد و در لاروهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲۰ درصد PUFA و ۲ درصد HUFA تعداد این واکوئل‌ها کمترین تعداد بود و اپیتلیوم کاملاً ظاهری طبیعی داشت. چنین بنظر می‌رسد که در جایگزینی منابع روغن دریایی سرشار از اسیدهای چرب بلند زنجیره با منابع گیاهی به نسبت بهینه اسیدهای چرب توجه داشت، علی‌رغم آن‌که لارو ماهیان تفاوتی از نظر شاخص‌های رشد نشان ندادند، اما بررسی بافت روده ماهیان کاملاً گویای وضعیت نامناسب تغذیه‌ای آن‌ها در گروه‌های آزمایشی ۱، ۲ و ۳ در این سری از آزمایش‌هاست.

در مطالعه Bowyer و همکاران (۲۰۱۲) ماهی *Seriola lalandi* با پنج جیره غذایی که در آن‌ها چربی جیره غذایی با ۱۰۰ درصد چربی طیور (Poultry Oil: PO) یا روغن کانولا (CO)، نسبت برابر روغن ماهی و چربی طیور (FO/PO) و یا ترکیبی از نسبت برابر روغن ماهی و روغن کانولا (FO/CO) جایگزین شده بود، در دو دمای ۱۸ یا ۲۲ درجه سانتی‌گراد تغذیه شدند. پس از پنج هفته، تغییرات بافتی دستگاه گوارش مورد بررسی قرار گرفت. بافت روده قدامی و روده خلفی هیچ نشانه‌ای از آنتریت ناشی از جیره غذایی نشان نداد. با این حال، افزایش تعداد سلول‌های جامی و کاهش شدید واکوئل‌های اطراف هسته در همه تیمارها از جمله تیمار شاهد حاوی روغن ماهی، در دو درجه حرارت ۱۸ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد در اول دوره وجود داشت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کمترین تعداد سلول‌های جامی در تیمارهای ۳ (PUFA=۲۰ و HUFA=۱) و بیشترین تعداد سلول‌های جاذب در تیمار ۶ (PUFA=۴۰ و HUFA=۸) قابل مشاهده بود. چنین می‌توان بیان نمود که با افزایش سطح HUFA جیره برای بهبود روند جذب مواد مغذی باید سطح PUFA جیره غذایی افزایش یابد.

Caballero و همکاران (۲۰۰۲) قزل‌آلای رنگین‌کمان را با روغن‌های مختلف گیاهی و حیوانی تغذیه کردند. آن‌ها اظهار داشتند که جایگزینی ۵۰ درصد روغن ماهی با منابع روغن گیاهی در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش قطرات چربی پیرامون هسته آنتروسیت‌ها گردید که خود سبب جابجایی هسته به لایه پارین (Parin) می‌شود. در مطالعه حاضر نیز با افزایش میزان PUFA جیره غذایی و کاهش سطح HUFA آن تجمع واکوئل‌های چربی و همچنین تخریب دیواره روده کاملاً مشهود بود. بیان شده

است که تجمع قطرات چربی در آنتروسیت‌ها ممکن است ناشی از ذخیره موقت چربی به علت ساخت ناکافی لیپوپروتئین‌ها باشد (Deplano et al., 1991). این تغییرات دستگاه گوارش می‌تواند انتقال و یا سوخت و ساز چربی را در بدن مختل نموده و سرانجام هضم چربی را کاهش دهد (Francis et al., 2007). همچنین مشاهده شده است که کمبود فسفولیپیدها موجب تجمع چربی‌ها درون سلول‌های جذب‌کننده روده و تغییرات بافت شناختی در ماهی کپور معمولی و آزاد ماهیان شده است (Fontagne et al., 1998; Olsen et al., 2003). نکته‌ای که حائز اهمیت بوده و مستلزم بررسی‌های بیشتری در مطالعات آتی است، این است که در بررسی حاضر کمبود فسفولیپیدها نمی‌تواند عامل ایجاد چربی در تجمع چربی در آنتروسیت‌های روده پیشین لارو ماهیان قزل‌آلا باشد و احتمالاً ناشی از سمیت سطوح بالای HUFA جیره غذایی در این ماهی باشد، که از طریق اختلال در روند اگزوسیتوز و ورود آن به جریان عمومی خون از طریق پروتومیکرون‌ها سبب چنین عارضه‌ای می‌شود (آزمایش دوم). البته کاهش بروز واکوئل‌های چربی در گروه تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی ۲۰ درصد PUFA با افزایش میزان HUFA جیره غذایی که به معنی افزایش میزان روغن ماهی در جیره غذایی است (آزمایش نخست)، به وجود میزان بالای اسید پالمیتیک در روغن ماهی باز می‌گردد که در ساخت درون‌زاد فسفاتیدیل کولین و در نتیجه افزایش امکان صدور چربی از آنتروسیت‌ها به جریان عمومی خون قابل ارتباط است (Olsen et al., 2000). با این حال برخی از محققین معتقد هستند که کل روغن ماهی جیره را می‌توان بدون هر گونه اثر منفی بر رشد و کارایی تغذیه‌ای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با منابع روغن‌های گیاهی جایگزین نمود (Oo et al., 2007; Drew et al., 2007).

Olsen و همکاران (۲۰۰۰) مشاهده کردند که در ماهی چار قطبی تغذیه شده با روغن بزرک تمایل به تجمع قطرات چربی در داخل سیتوپلاسم قابل مشاهده بود، در حالیکه در ماهی تغذیه شده با لسیتین سویا چنین حالتی گزارش نشد. آن‌ها چنین بیان نمودند که این تجمع می‌تواند به دلیل ناکافی بودن فسفولیپیدهای مورد نیاز برای تولید لیپوپروتئین‌ها باشد. با این حال، تفاوت نسبت ۳-n/6 در میان جیره‌های غذایی می‌تواند تجمع انتخابی اسیدهای چرب در قطرات چربی آنتروسیت‌ها را تحت تأثیر قرار دهد



نیکل و سیلیمارین. مجله علمی شیلات ایران، ۵۱-۶۸، ۲۵(۱):

عشقی، ش.، نوری، ف.، ایمانی، ا. و آق، ن.، ۱۳۹۶. اثرات جایگزینی جلبک *Dunaliella salina* با سبوس گندم و برنج و پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* بر شاخص‌های رشد، تجزیه تقریبی بدن و ترکیب اسیدهای چرب *Artemia franciscana* مجله علمی شیلات ایران، ۲۰۷-۲۱۲، ۲۶(۱):

**Agius, C. and Roberts, R.J., 2003.**

Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*. 26(9): 499-509. DOI: 10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x

**AOAC. 1990.** Official method of analysis. Association of official Analytical Chemists, Arlington, USA No. 934.06.

**Bowyer, J.N., Qin, J.G., Adams, L.R., Thomson, M.J.S. and Stone, D.A.J., 2012.** The response of digestive enzyme activities and gut histology in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) to dietary fish oil substitution at different temperatures. *Aquaculture*. 368: 19-28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.012>

**Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjorsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A.J. and Rosenlund, G., 2003.** Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*. 225: 325-340. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00299-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00299-0)

**Caballero, M.J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M. and Izquierdo, M.S., 2002.** Impact of different dietary lipid

که نشان می دهد که جذب اسیدهای چرب در آنتروسیت ها از یک مکانیسم انتخابی تبعیت می کند. نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که در تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ مقاطع عرضی روده کوچک دچار از هم گسیختگی و ریزش اپیتلیوم و حضور واکوئل های فراوان در داخل سلول های اپیتلیالی روده بود. میزان این واکوئل ها در لاروهای تغذیه شده با جیره غذایی دارای ۲۰ درصد PUFA اما فاقد HUFA بیشترین بود و به تدریج با افزایش میزان HUFA جیره غذایی از تعداد این واکوئل ها کاسته شد. همچنین در لاروهای تغذیه شده با جیره غذایی دارای ۲۰ درصد PUFA و ۲ درصد تعداد این واکوئل ها کمترین تعداد بود و اپیتلیوم ساختاری کاملاً طبیعی داشت. همچنین در بررسی تکمیلی به کمک رنگ آمیزی PAS مشخص شد که درصد سلول های جامی به سلول های اپیتلیالی دارای تجمعات چربی با افزایش میزان HUFA جیره افزایش یافت و در لاروهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲ درصد HUFA به حداکثر خود رسید و روده شکل طبیعی خود را بازیافت. چنین روندی در گروه های آزمایشی ۵، ۶، ۷ و ۸ نیز مشاهده گردید؛ به نحوی که تعداد واکوئل های چربی در لاروهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۰ درصد PUFA و ۸ درصد HUFA بیشترین میزان بود و در گروه تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۴۰ درصد PUFA و ۸ درصد HUFA اپیتلیوم روده ظاهری طبیعی داشته و از تعداد واکوئل های چربی کاسته شد. بطور کلی در گروه های تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲۰ درصد PUFA و ۲ درصد HUFA یا ۴۰ درصد PUFA و ۸ درصد HUFA تعداد واکوئل های چربی کمترین بوده و اپیتلیوم طبیعی در بافت روده قابل مشاهده بود.

## منابع

پوستی، ا. و ادیب مرادی، م.، ۱۳۸۵. روش های آزمایشگاهی بافت شناسی. انتشارات دانشگاه تهران، ۲۹۶ صفحه.

نازدار، ن.، ایمانی، ا.، نوری، ف. و سروی مغاللو، ک.، ۱۳۹۵. فعالیت آنزیم های گوارشی و شاخص های رشد و تغذیه ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره های غذایی حاوی نانودره

- sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. 214: 253–271.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00852-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00852-3)
- Castro, C., Couto, A., Pérez-Jiménez, A., Serra, C.R., Díaz-Rosales, P., Fernandes, R., Corraze, G., Panserat, S. and Oliva-Teles, A., 2016.** Effects of fish oil replacement by vegetable oil blend on digestive enzymes and tissue histomorphology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Fish Physiology and Biochemistry. 42(1): 203–217. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0130-1>
- Deplano, M., Diez, J.P., Connès, R., Kentouri, M. and Cavalier, F., 1991.** Appearance of lipid-absorption capacities in larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. Marine Biology. 108: 361–371.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01313645>
- Dhert, P., Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1992.** Fatty acid requirements for European seabass (*Dicentrarchus labax*) and turbot (*Seophthalmus maximus*) in function of their ontogenetic development. In Book of Abstracts, Third Asian Fisheries Forum, Singapore, October 1992 Asian Fisheries Society, Philippines.
- Drew, M.D., Ogunkoya, A.E., Janz, D.M. and van Kessel, A.G., 2007.** Dietary influence of replacing fish meal and oil with canola protein concentrate and vegetable oils on growth performance, fatty acid composition and organochlorine residues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 267: 260–268. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.002>
- Fontagné, S., Geurden, I., Escaffre, A.M. and Bergot, P., 1998.** Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. Aquaculture, 161(1): 213–223.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00271-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00271-8)
- Francis, D.S., Turchini, G.M., Jones, P.L. and De Silva, S.S., 2007.** Effects of fish oil substitution with a mix blend vegetable oil on nutrient digestibility in Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. Aquaculture. 269: 447–455.  
DOI: [10.1016/j.aquaculture.2007.05.021](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.021)
- Hall, C.K. and Bellwood, R.D., 1995.** Histological effects of cyanide, stress and starvation on the intestinal mucosa of (*Pomacentrus coelestis*). Journal of Fish Biology. 47(3): 438–454.  
DOI: [10.1111/j.1095-8649.1995.tb01913.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1995.tb01913.x)
- Moldal, T., Løkka, G., Wiik-Nielsen, J., Austbø, L., Torstensen, B.E., Rosenlund, G. and Koppang, E.O., 2014.** Substitution of dietary fish oil with plant oils is associated with shortened mid intestinal folds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). BMC Veterinary Research. 10(1): 1.  
DOI: [10.1186/1746-6148-10-60](https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-60)
- National Research Council (NRC), 2011.** Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academy Press, Washington, DC, USA, 376 p.
- Olsen, R.E., Tore Dragnes, B., Myklebust, R. and Ringø, E., 2003.** Effect of soybean oil

- and soybean lecithin on intestinal lipid composition and lipid droplet accumulation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. Fish Physiology and Biochemistry. 29(3): 181-192. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000045708.67760.43>
- Olsen, R.E., Myklebust, R., Ringo, E. and Mayhew, T.M., 2000.** The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. Fish Physiology and Biochemistry. 22: 207-216. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1007879127182>
- Oo, A.N., Satoh, S. and Tsuchida, N., 2007.** Effect of replacements of fish meal and fish oil on growth and dioxin contents of rainbow trout. Fisheries Science. 73(4): 750-759. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01393.x>
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernandez-Cruz, C.M., Bessonart, M. and Fernandez-Palacios, H., 1999.** Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in polar lipid on the gut and liver histological structure of seabream (*Sparus aurata*) larvae. Aquaculture. 179: 253-264.
- DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00194-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00194-5)
- Sorgeloos, P. and Leger, P., 1992.** Improved larviculture outputs of marine fish; shrimp and prawn. Journal of the World Aquaculture Society. 23: 251-264. DOI: [10.1111/j.1749-7345.1992.tb00788.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1992.tb00788.x)
- Tacon, A.G.J., 1992.** Nutritional fish pathology: Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. FAO Fish Technical Paper, No. 330. Rome, FAO. 75 p.
- Tocher, D.R., Bendiksen, E.A., Campbell, P.J. and Bell, J.G., 2008.** The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. Aquaculture. 280: 21-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.034>
- Turchini, G.M., Bente, E.T. and Wing-keong, N., 2009.** Fish oil replacement in finfish nutrition. Reviews in Aquaculture. 1(1): 10-57. DOI: [10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x](https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x)
- Wold, P.A., Hoehne-Reitan, K., Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Rainuzzo, J. and Kjörsvik, E., 2007.** Phospholipids vs. neutral lipids: effects on digestive enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. Aquaculture. 272: 502-513. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2007.06.034](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.06.034)

## Histopathological study of proximal intestine of newly weaned rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fries fed with various dietary HUFA and PUFA (C<sub>18</sub>) levels

Haginezhad S.<sup>1</sup>; Imani A.<sup>1\*</sup>; Noori F.<sup>2</sup>; Sarvi Moghanlou K.<sup>1</sup>

\* a.imani@urmia.ac.ir

1-Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Iran

2-Urmia Lake Research Institute, Urmia University, I.R. of Iran

### Abstract

Imbalanced dietary fatty acid profile could influence the performance of larvae. In the present study the effect of various dietary levels of HUFA and PUFA (C<sub>18</sub>) on histoarchitecture of newly weaned rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae were investigated. To this end, various dietary HUFA levels (0, 0.5, 1 and 2 percent) at a fixed dietary PUFA of 20 percent (the first experiment) and various dietary PUFA levels (10, 20, 30 and 40 percent) at fixed dietary HUFA of 8 percent (the second experiment) were created and fed to larvae. The experiments were lasted for six weeks. At the end of the experiments, six fish were randomly taken and the proximal intestine was dissected out and fixed for histological studies. According to lipid epithelial disorganization and cell lifting along with frequency of enterocyte fat stores of proximal intestine of fries, it could be stated when dietary PUFA was fixed at 20 percent (mainly due to replacing dietary fish oil with plant sources), there is no way to prevent such deteriorative histological alterations except increasing dietary HUFA levels up to 2 percent of dietary lipid content. In the second experiment, increasing dietary PUFA to 40 percent of dietary lipid content improved proximal intestine integrity. Furthermore, the lowest goblet cells counts and consequently the highest number of enterocytes, or intestinal absorptive cells, were recorded in treatment 3 and 6. Concludingly, in those groups feeding on diet containing 20 percent PUFA with 2 percent HUFA or 40 percent PUFA with 8 percent HUFA lower lipid vacuoles were present and normal intestinal epithelia were observed.

**Keywords:** Proximal intestine, HUFA, PUFA (C<sub>18</sub>), Newly weaned fries, *Oncorhynchus mykiss*

---

\*Corresponding author