



## تغییرات بافت شناسی دستگاه گوارش و ترکیب اسیدهای چرب ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) در اثر تغذیه با سطوح مختلف اسیدهای چرب ضروری EPA و DHA و ویتامین E جیره

ابراهیم ستوده<sup>۱</sup>، عبدالمحمد عابدیان کناری<sup>۱\*</sup>، صابر خدابنده<sup>۲</sup> و امین اوجی فرد<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، مازندران، نور

<sup>۲</sup>گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، مازندران، نور

<sup>۳</sup>گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

| نوع مقاله:       | چکیده   |
|------------------|---|
| پژوهشی           | در این بررسی اثر ترکیبی مقادیر مختلف اسیدهای چرب ضروری HUFA n-3 و آلفا-توکوفرول جیره بر تغییرات بافتی روده و زوائد پیلوریک ماهی نوس آزاد دریای خزر ( <i>Salmo trutta caspius</i> ) با میانگین وزن اولیه $25 \pm 600$ (میلی‌گرم) پس از ۱۰ هفته بررسی شد. شش جیره حاوی سه نسبت اسیدهای چرب DHA n-3 به EPA به ترتیب ۱ به ۵/۰ (پایین)، ۲ به ۱ (متوسط) و ۴ به ۲ (بالا) در ۱۰۰ گرم جیره و هر یک از این مقادیر با یکی از سطوح ۳۰۰ (پایین) و ۱۰۰۰ (بالا) میلی‌گرم ویتامین E در کیلوگرم جیره تهیه شد. نتایج این مطالعه نشان داد افزایش ویتامین E جیره موجب افزایش اسیدهای چرب بلند زنجیره به ویژه در سطوح متوسط و بالای اسیدهای چرب HUFA در چربی‌های قطبی می‌گردد. بررسی بافت شناسی روده ابتدایی و زوائد پیلوریک نشان داد در سطح پایین اسیدهای چرب HUFA n-3 میانگین طول انتروسیت‌ها در این دو بخش تفاوت معنی‌داری ندارد اما در تیمارهای تغذیه شده با سطوح متوسط و بالای اسیدهای چرب HUFA ارتفاع انتروسیت‌ها بیشتر بود ( $P > 0.05$ ). در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد افزایش همزمان اسیدهای چرب HUFA n-3 و ویتامین جیره موجب افزایش اسیدهای چرب بلند زنجیره به ویژه در سطوح متوسط و بالای اسیدهای چرب HUFA می‌گردد که این اسیدهای چرب تأثیرات مفیدی در افزایش رشد و سلامتی این ماهی ایفا می‌نماید. |
| تاریخچه مقاله:   |   |
| دریافت: ۹۳/۰۳/۲۴ |   |
| اصلاح: ۹۴/۰۶/۲۰  |   |
| پذیرش: ۹۴/۰۶/۲۵  |   |
| کلمات کلیدی:     |   |
| دریای خزر        |   |
| زوائد پیلوریک    |   |
| ماهی آزاد        |   |
| ویتامین E        |   |

### مقدمه

غذای ماهی و به ویژه غذاهای مورد استفاده در مراحل اولیه زندگی سرشار از اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع (HUFAs) ۲۰ اتم کربن یا بیشتر و ۳ پیوند دوگانه یا بیشتر) مانند ایکوزاپنتانوئیک اسید (C20:5n-3, EPA) و دوکوزاهگزانوئیک (C22:6n-3, DHA) می‌باشند. این اسیدهای چرب عملکردهای فیزیولوژیک مهمی دارند که به دو دسته تقسیم بندی می‌شوند: الف) به عنوان اجزاء مهم فسفولیپیدهای غشائی که فرآیندها و واکنش‌های غشائی را تسهیل می‌کنند که اسید چرب

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [aabedian@yahoo.co.uk](mailto:aabedian@yahoo.co.uk)

DHA در این زمینه به ویژه در سلول‌های عصبی اهمیت زیادی دارد. (ب) به عنوان پیش‌ساز ایکوزانوئیدها می‌باشند و در تنظیم طیف گسترده‌ای از واکنش‌های سلولی تاثیر می‌گذارند. با این حال این مواد مغذی حساسیت زیادی نسبت به آسیب‌های اکسیداتیو دارند (Halliwell and Gutteridge, 1996). هنگامی که اسیدهای چرب HUFAs با اکسیژن یا گونه‌های فعال اکسیژن فعال برخورد می‌کنند، به رادیکال‌های چربی و دیگر مشتقات تبدیل می‌شوند. اکسیداسیون چربی در غشای سلولی منجر به از دست رفتن یکپارچگی غشا، نشت و در نهایت لیز شدن سلول می‌شود. این کمبود بر تمام سلول‌ها و اندام‌ها تاثیر می‌گذارد. خطر بروز پراکسیداسیون در مرحله لاروی به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم غذا و همچنین افزایش ماندگاری غذا در آب افزایش می‌یابد (Izquierdo, 2005). بنابراین، وجود یک سیستم دفاعی در برابر چربی‌های اکسیده شده به خصوص در دوران لاروی ضروری است. علاوه بر این، چربی‌های موجود در بافت لارو ماهیان نیز حاوی مقادیر بسیار بالایی اسیدهای چرب HUFA هستند که این مسئله خطر پراکسیداسیون (Sargent *et al.*, 1999) و بروز آسیب‌های بافتی را افزایش می‌دهد (Kanazawa, 1993).

در شرایط طبیعی آنزیم‌های داخلی نقش بسیار مهمی در محافظت آنتی‌اکسیدانی فیزیولوژیک ایفا می‌نمایند (Blazer, 1982). این آنزیم‌ها مانند کاتالاز و سوپراکسیداز دیسموتاز به ترتیب بر روی هیدروژن پراکساید ( $H_2O_2$ ) و سوپراکساید ( $O_2^-$ ) اثر می‌کنند و گلوکاتایون پراکسیداز  $H_2O_2$  و هیدروپراکسیدهای لیپیدی را جمع‌آوری می‌کنند (Halliwell and Gutteridge, 1996). همچنین مواد غیر آنزیمی با وزن مولکولی کم مانند آلفا-توکوفرول (ویتامین E) به همراه سلنیوم و اسید آسکوربیک از واکنش اکسیداسیون زنجیره HUFA جلوگیری می‌نمایند. بنابراین ویتامین E در دادن اتم هیدروژن با اسیدهای چرب HUFA رقابت می‌کند و در نتیجه موجب ناقص شدن زنجیره‌ی واکنش‌های درگیر در اکسیداسیون خود به خودی چربی می‌شود. به همین دلیل لازم است که میزان این ویتامین در جیره‌های حاوی اسیدهای چرب HUFA افزایش یابد (Watanabe *et al.*, 2005; Lin and Shiao, 1987; Satoh *et al.*, 1981a,b). این ویتامین همچنین نقش مهمی در تقویت سیستم ایمنی ماهیان (Wang *et al.*, 2006)، رشد لاروی (Gonzalez *et al.*, 1995)، فرآیند تولید مثل (Izquierdo *et al.*, 2001) و مقاومت در برابر استرس (Montero *et al.*, 2001) دارد. میزان نیازمندی ویتامین E کاملاً تحت تاثیر سطوح دیگر مواد مغذی جیره مانند سلنیوم، ویتامین C (Hamre *et al.*, 1997) و اکسیداسیون اسیدهای چرب HUFA (Blazer, 1982) قرار دارد. در حقیقت در حضور اسیدهای چرب HUFA اکسیداسیون ویتامین E افزایش می‌یابد. در نتیجه این اسیدهای چرب موجب افزایش نیاز به ویتامین E می‌گردند (Watanabe, 1982). بنابراین برای جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها، افزایش میزان اسیدهای چرب HUFA نیازمند افزایش ویتامین E می‌باشد (Izquierdo *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 1981a,b). بنابراین بررسی اثر متقابل اسیدهای چرب EPA و DHA و ویتامین جیره و تاثیر آن بر متابولیسم چربی‌ها و بافت شناسی دستگاه گوارش بچه ماهیان نارس ماهی آزاد دریای خزر که تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است، اهمیت بسزائی دارد.

## مواد و روش‌ها

### فرمولاسیون جیره‌های آزمایشی

شش جیره با میزان ۵۰ درصد پروتئین و ۱۷ درصد چربی و مقادیر متفاوت اسیدهای چرب DHA به EPA به ترتیب به صورت ۱+۵/۰ (پایین، L)، ۱+۲ (متوسط، M) و ۲+۴ (بالا، H) درصد جیره و هر یک از این مقادیر با یکی از سطوح ۳۰۰ (پایین، L) و ۱۰۰۰ (بالا، H) میلی‌گرم ویتامین E (آلفا-توکوفرول استات) در کیلوگرم جیره تهیه شد (با توجه به میزان احتیاجات آزاد ماهیان به این اسیدهای چرب که حدود ۱ درصد می‌باشد (NRC, 2011)، سطوح مختلف اسیدهای چرب جیره نامگذاری شد) نامگذاری تیمارها به اختصار به صورت LL، LH، ML، MH، HL و HH، که حرف لاتین اول نشان دهنده میزان دو اسید چرب n-3 و حرف دوم بیانگر میزان ویتامین E است) نامگذاری شدند (جدول ۱).

برای ساخت جیره، ابتدا تک تک ویتامین‌های محلول در آب و محلول در چربی مورد نیاز آزاد ماهیان بر اساس منابع موجود (NRC, 2011) به دقت توزین و از سلولز (آلفا-سلولز) به عنوان ماده حامل جهت ساخت مخلوط ویتامینی استفاده گردید (Huang and Huang, 2004).

جدول ۱. اجزاء و ترکیب بیوشیمیایی جیره‌های غذایی برای تغذیه ماهیان نورس آزاد دریای خزر

| HH    | HL    | MH    | ML    | LH    | LL    | ترکیبات جیره                         |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------------------|
| ۴۶    | ۴۶    | ۴۶    | ۴۶    | ۴۶    | ۴۶    | پودر ماهی <sup>۱</sup>               |
| ۲۱    | ۲۱    | ۲۱    | ۲۱    | ۲۱    | ۲۱    | کازئین <sup>۲</sup>                  |
| ۴/۹   | ۴/۹   | ۹/۷   | ۹/۷   | ۱۲/۱  | ۱۲/۱  | اولئیک اسید <sup>۳</sup>             |
| ۲/۸   | ۲/۸   | ۱/۴   | ۱/۴   | ۰/۷   | ۰/۷   | EPA <sup>۴</sup>                     |
| ۶/۸   | ۶/۸   | ۳/۴   | ۳/۴   | ۱/۷   | ۱/۷   | DHA <sup>۵</sup>                     |
| ۹     | ۹     | ۹     | ۹     | ۹     | ۹     | دکستروزین <sup>۲</sup>               |
| ۱/۵   | ۱/۵   | ۱/۵   | ۱/۵   | ۱/۵   | ۱/۵   | لسیتین سویا                          |
| ۲     | ۲     | ۲     | ۲     | ۲     | ۲     | مخلوط ویتامینی                       |
| ۳     | ۳     | ۳     | ۳     | ۳     | ۳     | مخلوط مواد معدنی                     |
| ۰/۲۵  | ۰/۲۵  | ۰/۲۵  | ۰/۲۵  | ۰/۲۵  | ۰/۲۵  | کولین کلراید                         |
| ۰/۲۵  | ۰/۲۵  | ۰/۲۵  | ۰/۲۵  | ۰/۲۵  | ۰/۲۵  | ضد قارچ                              |
| ۱     | ۱     | ۱     | ۱     | ۱     | ۱     | مونوکلسیم فسفات                      |
| ۰/۱   | ۰/۰۳  | ۰/۱   | ۰/۰۳  | ۰/۱   | ۰/۰۳  | ویتامین E <sup>۶</sup>               |
| ۱/۴   | ۱/۴۷  | ۱/۴   | ۱/۴۷  | ۱/۴   | ۱/۴۷  | سلولز                                |
|       |       |       |       |       |       | آنالیز شیمیایی ترکیبات جیره          |
| ۱۰۱۰  | ۳۲۰   | ۱۰۴۰  | ۳۳۰   | ۱۰۵۰  | ۳۲۵   | آلفا-توکوفرول (mg kg <sup>-1</sup> ) |
| ۴۹/۳۷ | ۴۸/۸۹ | ۵۰/۲۹ | ۴۹/۶۸ | ۴۹/۵۰ | ۵۰/۱۲ | پروتئین                              |
| ۱۷/۳  | ۱۶/۹۶ | ۱۶/۸۵ | ۱۷/۳۲ | ۱۷/۰۵ | ۱۷/۲  | چربی                                 |
| ۹/۲   | ۹/۵   | ۸/۶   | ۸/۹   | ۹/۴   | ۹/۱   | خاکستر                               |
| ۸/۱۲  | ۷/۱   | ۷/۷۲  | ۷/۸۵  | ۷/۶۵  | ۸/۱   | رطوبت                                |
| ۱۶/۱  | ۱۶/۶  | ۱۶/۲  | ۱۶/۰۹ | ۱۶/۰۴ | ۱۵/۴  | کربوهیدرات                           |
| ۲۱/۲۸ | ۲۱/۱۰ | ۲۱/۳۲ | ۲۱/۳۳ | ۲۱/۱۷ | ۲۱/۲۸ | انرژی ناخالص (Kj/g)                  |

۱- تهیه شده در شرکت پارس کیلکا ۲- ساخت شرکت Merk، آلمان ۳- تولید شرکت Appllichem، آلمان ۴- روغن ماهی تصفیه و غنی شده Incromega TG6015 (حاوی ۱۸/۴ گرم در ۱۰۰ گرم DHA و ۵۹/۲ گرم در ۱۰۰ گرم EPA)، ساخت شرکت Croda، انگلیس ۵- روغن ماهی تصفیه و غنی شده Incromega DHA500TG (حاوی ۵۸/۶ گرم در ۱۰۰ گرم DHA و ۸/۴ گرم در ۱۰۰ گرم EPA)، ساخت شرکت Croda، انگلیس. ۶- ویتامین E به صورت DL- a-tocopherol acetate، تولید شرکت Sigma، آلمان، با درجه خلوص ۹۶ درصد.

### تهیه بچه ماهی و شرایط پرورشی

بچه ماهیان نورس ماهی آزاد دریای خزر (با میانگین وزن  $25 \pm 60$  میلی گرم) با استفاده از تانک مجهز به کپسول اکسیژن از مرکز تکثیر و پرورش شهید باهنر کلاردشت به سالن تکثیر و پرورش دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. این بچه ماهیان نورس در ترف‌هایی با ابعاد  $18 \times 42 \times 230$  سانتیمتر مجهز به سیستم مدار بسته (با میزان تعویض روزانه ۳۰ درصد) در ۶ تیمار و ۳ تکرار (۶۰ بچه ماهی در هر ترف و تراکم ۲ عدد در لیتر) ذخیره شدند. غذادهی روزانه در ۵ نوبت و در ساعات ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶ و ۱۸ در حد سیری انجام گرفت. عوامل کیفی آب، همچون دمای آب ( $14 \pm 0.5$ ) درجه سانتیگراد) و اکسیژن (۸-۶ میلی گرم در لیتر) به صورت روزانه و نیترات ( $0.13$  میلی گرم در لیتر)، آمونیاک (کمتر از  $0.08$  میلی گرم در لیتر) و pH ( $7.6$ ) به صورت هفتگی اندازه‌گیری شد.

### تعیین ترکیب اسیدهای چرب جیره‌های آزمایشی و بدن

ابتدا چربی کل بدن و جیره‌ها با به کارگیری کلروفورم:متانول (۲ به ۱) (Folch et al., 1957) استخراج و سپس در گروه چربی‌های خنثی و قطبی جداسازی شدند. به منظور استری کردن چربی از روش (Metcalf and Schmitz, 1961) استفاده

شد. ۵ میلی لیتر سود متانولی ۲٪ به چربی استخراج شده اضافه شد. سپس اسیدهای چرب با Boron Trifluoride (BF3) در متانول متیله و نمونه‌های متیل استر شده چربی به وسیله n-هگزان بازیافت گردیدند. برای بررسی و شناسایی اسیدهای چرب موجود در نمونه‌ها از دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) (model:CP 3800 Varian, Walnut Creek, CA, USA) مجهز به ستون کاپیلاری از نوع (BPX 70 SGM; 60 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 mm, Victoria, Australia) و آشکار ساز نوع یونش شعله‌ای FID استفاده شد. دمای آشکار ساز و محل تزریق به ترتیب بر روی ۲۴۰ و ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای ستون بین ۱۶۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد با نرخ ۲ درجه افزایش دما در دقیقه برنامه ریزی گردید. در این روش از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل و گاز هیدروژن به عنوان سوخت، ازت به عنوان گاز کمکی و هوای خشک استفاده شد. جدول ۲ ترکیب اسیدهای چرب جیره‌های مورد استفاده را نشان می‌دهد.

جدول ۲. ترکیب اسیدهای چرب جیره‌های مورد استفاده

| جیره‌های مختلف |       |       |       |       |       | اسیدهای چرب (درصد)      |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------|
| HH             | HL    | MH    | ML    | LH    | LL    |                         |
| ۷/۳۲           | ۶/۸۰  | ۸/۲۸  | ۸/۸۲  | ۱۰/۳۳ | ۹/۱۶  | C16:0                   |
| ۷/۶۱           | ۵/۴۹  | ۴/۶۰  | ۴/۶۶  | ۳/۴۷  | ۴/۷۸  | C18:0                   |
| ۵۳/۲۳          | ۵۴/۳۰ | ۵۹/۰۲ | ۵۸/۶۲ | ۶۴/۷۸ | ۶۶/۷۳ | C18:1n-9                |
| ۹/۶۷           | ۹/۸۵  | ۱۰/۰۲ | ۱۰/۲۵ | ۹/۵۵  | ۹/۰۴  | C18:2n-6                |
| ۰/۳۲           | ۰/۷۱  | ۰/۹۶  | ۰/۵۶  | ۰/۴۹  | ۰/۲۳  | C18:3n-6                |
| ۰/۸۵           | ۰/۹۱  | ۰/۳۶  | ۰/۳۷  | ۰/۴۳  | ۰/۴۴  | C18:3n-3                |
| ۱/۲۳           | ۱/۹۹  | ۱/۸۹  | ۱/۶۶  | ۱/۱۷  | ۱/۰۵  | C20:1n-9                |
| ۱/۰۳           | ۰/۹۸  | ۰/۶۳  | ۰/۴۹  | ۰/۲۵  | ۰/۱۹  | C20:4n-6                |
| ۲/۱۹           | ۲/۲۷  | ۱/۳۶  | ۱/۲۱  | ۰/۵۲  | ۰/۴۲  | C20:5n-3                |
| ۵/۱۵           | ۴/۰۷  | ۲/۰۳  | ۲/۱۷  | ۱/۲۵  | ۱/۱۹  | C22:6n-3                |
| ۱۶/۲           | ۱۳/۴۸ | ۱۳/۹۶ | ۱۴/۸۳ | ۱۵/۴۴ | ۱۵/۷۶ | $\sum$ SFA <sup>۱</sup> |
| ۵۵/۸۵          | ۵۷/۷۵ | ۶۱/۸۶ | ۶۱/۲۸ | ۶۶/۸  | ۶۸/۳۱ | $\sum$ MUFA             |
| ۸/۷            | ۹/۳   | ۴/۶۹  | ۴/۴۵  | ۲/۶۲  | ۲/۶   | n-3                     |
| ۱۱/۱۹          | ۱۱/۷۶ | ۱۱/۸  | ۱۱/۴۶ | ۹/۴۹  | ۹/۷۹  | n-6                     |
| ۰/۴۴           | ۰/۵۶  | ۰/۶۷  | ۰/۵۶  | ۰/۴۱  | ۰/۵۵  | EPA/DHA                 |
| ۰/۷۷           | ۰/۷۹  | ۰/۳۹  | ۰/۳۸  | ۰/۲۱  | ۰/۲۶  | n-3/n-6                 |

<sup>۱</sup>SFA اسیدهای چرب اشباع و MUFA: اسیدهای چرب تک غیر اشباع

### نمونه برداری انتهای دوره و بافت شناسی کلاسیک

در پایان آزمایش، غذادهی بچه ماهیان به مدت ۲۴ ساعت قطع گردید. بچه ماهیان با افزودن مقدار بیش از حد MS-222 به آب بیهوش شدند. نمونه‌های دستگاه گوارش بچه ماهیان بلافاصله پس از جداسازی به مدت ۴۸ ساعت در محلول فیکساتیو بوئن فیکس و پس از آن جهت حذف بوئن، نمونه‌ها چندین بار با اتانول ۷۰٪ شستشو شدند. برای آبگیری، نمونه‌ها به ترتیب با درصدهای افزایشی الکل آبگیری شدند. پس از آبگیری به مدت ۳ ساعت در زایلن نگهداری شدند و بعد از آن جهت پارافینه شدن بافت در پارافین مذاب (دمای ۵۹-۶۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. پس از قالب‌گیری به وسیله پارافین، نمونه‌ها برای برش آماده شد. از قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش برش‌هایی به قطر ۴ میکرون تهیه و لام‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. لام‌ها به وسیله زایلن، پارافین زدایی و به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شده و پس از چسباندن لامل روی لام با چسب مخصوص انتالن آماده سازی شدند. لام‌ها با میکروسکوپ نوری بررسی و عکسبرداری شدند. جهت بررسی و اندازه گیری طول انتروسیت‌ها، مساحت لایه مخاطی و طول ویلی‌های زوائد پیلوریک و روده ابتدایی و قطر سلول‌های کبدی از نرم افزار ImageJ 1.45 استفاده گردید.

## تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 18 انجام شد. قبل از تجزیه تحلیل، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون همگنی واریانس با تست Levene انجام گرفت. برای مقایسه کلی داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه One-way-ANOVA استفاده گردید. برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون آماری Duncan در سطح اعتماد ۹۵ درصد استفاده شد. همبستگی و الگوی بین اسیدهای چرب بچه ماهیان و جیره‌های مورد آزمایش با استفاده از تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA<sup>۱</sup>) و بکارگیری نرم افزار PC-ORD مورد مطالعه قرار گرفت. این روش می‌تواند برای کاهش ابعاد داده مورد استفاده قرار بگیرد، به این ترتیب مولفه‌هایی از مجموعه داده را که بیشترین تاثیر در واریانس را دارند حفظ می‌کند.

## نتایج

## ترکیب اسیدهای چرب بدن

افزایش میزان HUFA n-3 در جیره‌ها با کاهش میزان اسیدهای چرب تک غیراشباع (به دلیل کاهش میزان اولئیک اسید، ۱۸/۲۳ درصد کاهش)، افزایش میزان اسیدهای چرب n-3 (افزایش EPA و DHA) و افزایش نسبت اسیدهای چرب n-3/n-6 همراه شد. در خصوص ترکیب اسیدهای چرب بدن بچه ماهیان، به طور کلی ترکیب اسیدهای چرب (خنثی و قطبی) بچه ماهیان آزاد تحت تاثیر اسیدهای چرب جیره مورد استفاده قرار گرفت. اسیدهای چرب قطبی نسبت به خنثی شباهت بیشتری به ترکیب جیره داشت. به طور مثال مقدار اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع 22:6n-3 و 20:5n-3 چربی‌های قطبی با افزایش میزان آن در جیره افزایش و همچنین کاهش میزان C18:1n-9 در جیره نیز باعث کاهش میزان این اسید چرب در بدن گردید. میزان کل اسیدهای چرب اشباع بدن در چربی‌های خنثی تغییرات چندانی نشان نداد و تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های HL و HH بالاترین میزان اسیدهای چرب اشباع داشتند. در چربی‌های قطبی با افزایش میزان HUFA n-3 میزان کل اسیدهای چرب اشباع به طور معنی‌داری کاهش یافت و تیمارهای حاوی مقادیر پایین HUFA بالاترین مقدار اسیدهای چرب اشباع داشتند. چربی‌های قطبی میزان بالاتری از اسید چرب آراشیدونیک (6-20:4n-6) نشان دادند و میزان آن تحت میزان HUFA n-3 قرار گرفت. افزایش ویتامین E جیره از سطح پایین به بالا موجب افزایش اسیدهای چرب بلند زنجیره به ویژه در سطوح متوسط و بالای اسیدهای چرب HUFA در چربی‌های قطبی گردید. به طور مثال میزان اسید چرب 20:4n-6 در تیمار MH نسبت به ML ۴۳/۶ و در تیمار HH نسبت به HL ۴۶/۴ درصد افزایش یافت. مجموع اسیدهای چرب n-3 در تیمار MH نسبت به ML ۶/۱ و در تیمار HH نسبت به HL ۱۰/۱ درصد افزایش یافت (جدول‌های ۳-۴ و ۴-۴).

نتایج آنالیز تجزیه مولفه اصلی (PCA) اسیدهای چرب نشان داد محور اول (۴۱/۶ درصد واریانس داده‌ها) در درجه اول همبستگی نزدیکی با اسیدهای چربی خنثی تیمارهای سطوح پایین و متوسط HUFA n-3 دارد. اسیدهای چرب خنثی تیمار حاوی سطح بالای HUFA n-3 و اسیدهای چرب چربی‌های قطبی تیمارهای حاوی سطوح بالای EPA و DHA همبستگی مثبتی با محور دوم (۲۴/۲ درصد واریانس داده‌ها) نشان دادند. آنالیز PCA نشان داد اسیدهای چرب EPA و DHA (به ترتیب  $r=0/493$  و  $r=0/551$ ) و مجموع اسیدهای چرب n-3 ( $r=0/569$ ) همبستگی مثبتی با محور دوم و تیمارهای HL و HH دارد و همبستگی منفی (به ترتیب  $r=-0/923$  و  $r=-0/931$ ) با اسید چرب C18:1n-9 بدن دارند. اسیدهای چرب چربی‌های قطبی تیمارهای حاوی سطوح متوسط و اسید چرب C20:4n-6 همبستگی مثبتی ( $r=0/406$ ) با محور سوم (۱۰/۵ درصد واریانس داده‌ها) داشتند (شکل ۱).

<sup>1</sup> Principal component analysis

جدول ۳. ترکیب اسیدهای چرب خنثی بچه ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی مختلف

| جیره‌های مختلف          |                         |                         |                          |                         |                        | اسیدهای چرب<br>(درصد) |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| HH                      | HL                      | MH                      | ML                       | LH                      | LL                     |                       |
| ۰/۷۹±۰/۰۶               | ۰/۸۴±۰/۰۵               | ۰/۹۶±۰/۰۵               | ۰/۸۵±۰/۰۸                | ۰/۹۵±۰/۰۶               | ۱/۰۲±۰/۱۱              | C14:0                 |
| ۱۵/۹۵±۰/۸               | ۱۶/۲۱±۱/۰۵              | ۱۳/۳۴±۱/۶               | ۱۳/۶۵±۲/۳                | ۱۰/۰۸±۱/۲               | ۱۱/۸۹±۱/۴              | C16:0                 |
| ۵/۲۲±۰/۴                | ۵/۴۳±۰/۳                | ۵/۸۵±۰/۴                | ۶/۶۹±۰/۲                 | ۱۰/۷۱±۰/۳               | ۸/۶۹±۰/۲               | C18:0                 |
| ۰/۰۵±۰/۰                | ۰/۱۰±۰/۰۲               | ۰/۰۸±۰/۰                | ۰/۰۷±۰/۰                 | ۰/۰۵±۰/۰                | ۰/۰۹±۰/۰۱              | C20:0                 |
| ۰/۰۹±۰/۰                | ۰/۰۷±۰/۰                | ۰/۰۸±۰/۰                | ۰/۰۳±۰/۰                 | ۰/۰۸±۰/۰۲               | ۰/۰۶±۰/۰               | C24:0                 |
| ۰/۶۴±۰/۰۹               | ۰/۷۶±۰/۰۶               | ۰/۵۲±۰/۰۴               | ۰/۳۷±۰/۰۷                | ۰/۲۷±۰/۰۴               | ۰/۳۰±۰/۰۵              | C16:1n-7              |
| ۳۶/۲۱±۴/۳ <sup>d</sup>  | ۳۳/۵۰±۲/۸ <sup>cd</sup> | ۴۴/۹۲±۳/۴ <sup>bc</sup> | ۴۱/۳۸±۴/۱ <sup>ab</sup>  | ۵۱/۰۱±۳/۸ <sup>a</sup>  | ۴۹/۳۴±۵/۲ <sup>a</sup> | C18:1n-9              |
| ۷/۰۵±۱/۲                | ۸/۲۴±۱/۳                | ۷/۸۰±۱/۱                | ۹/۱۳±۰/۸                 | ۸/۰۲±۱/۲                | ۸/۶۸±۱/۵               | C18:2n-6              |
| ۰/۵۳±۰/۰۳               | ۰/۶۶±۰/۰۸               | ۰/۵۴±۰/۰۴               | ۰/۲۹±۰/۰۳                | ۰/۲۲±۰/۰۷               | ۰/۳۲±۰/۰۴              | C18:3n-6              |
| ۲/۶۶±۰/۰۴               | ۲/۸۱±۰/۰۶               | ۱/۴۹±۰/۰۲               | ۱/۵۴±۰/۰                 | ۱/۱۲±۰/۰۱               | ۱/۱۸±۰/۰۲              | C18:3n-3              |
| ۲/۳۳±۰/۱                | ۲/۲۱±۰/۰۷               | ۱/۵۷±۰/۰۴               | ۱/۰۹±۰/۰۸                | ۰/۲۵±۰/۰۶               | ۰/۳۹±۰/۰               | C20:1n-9              |
| ۰/۱۱±۰/۰۵               | ۰/۱۲±۰/۰۳               | ۰/۳۷±۰/۰                | ۰/۳۵±۰/۱                 | ۰/۲۴±۰/۰۳               | ۰/۲۴±۰/۰۷              | C20:3n-6              |
| ۰/۲۷±۰/۰۵               | ۰/۳۱±۰/۰۴               | ۰/۳۱±۰/۰۶               | ۰/۱۴±۰/۰۵                | ۱/۱۹±۰/۰۹               | ۱/۰۹±۰/۱               | C20:3n-3              |
| ۰/۷۴±۰/۱ <sup>abc</sup> | ۰/۹۶±۰/۱ <sup>a</sup>   | ۰/۸۳±۰/۴ <sup>ab</sup>  | ۰/۶۵±۰/۱ <sup>bc</sup>   | ۰/۷۴±۰/۲ <sup>abc</sup> | ۰/۵۳±۰/۲ <sup>c</sup>  | C20:4n-6              |
| ۶/۹۰±۱/۱ <sup>a</sup>   | ۴/۷۳±۰/۳ <sup>b</sup>   | ۲/۶۵±۰/۳ <sup>c</sup>   | ۱/۹۹±۰/۳ <sup>cd</sup>   | ۰/۹۲±۰/۱ <sup>e</sup>   | ۱/۲۷±۰/۶ <sup>de</sup> | C20:5n-3              |
| ۱۵/۸۶±۱/۳ <sup>a</sup>  | ۱۵/۸۸±۱/۶ <sup>a</sup>  | ۱۰/۵۸±۱/۱ <sup>b</sup>  | ۸/۹۸±۰/۶ <sup>b</sup>    | ۳/۱۴±۰/۶ <sup>c</sup>   | ۴/۱۸±۱/۲ <sup>c</sup>  | C22:6n-3              |
| ۱/۱۹±۰/۰۹               | ۰/۷۳±۰/۰۸               | ۱/۰۰±۰/۰                | ۱/۳۷±۰/۱                 | ۰/۳۶±۰/۰۵               | ۰/۳۵±۰/۰۷              | C24:1n-9              |
| ۲۲/۶۳±۲/۳               | ۲۳/۲۸±۲/۸               | ۲۰/۸۴±۱/۴               | ۲۲/۰۰±۲/۱                | ۲۲/۴۵±۴/۸               | ۲۲/۲۴±۴/۳              | <sup>۱</sup> Σ SFA    |
| ۴۰/۵۴±۳/۳ <sup>bc</sup> | ۳۷/۳۳±۴/۷ <sup>c</sup>  | ۴۸/۱۸±۴/۲ <sup>ab</sup> | ۴۴/۳۹±۳/۲ <sup>abc</sup> | ۵۲/۰۳±۵/۱ <sup>a</sup>  | ۵۰/۵۶±۴/۱ <sup>a</sup> | Σ MUFA                |
| ۲۵/۶۸±۲/۵ <sup>a</sup>  | ۲۳/۷۲±۴/۴ <sup>a</sup>  | ۱۴/۲۴±۱/۳ <sup>b</sup>  | ۱۳/۴۳±۱/۲ <sup>b</sup>   | ۶/۳۶±۰/۷ <sup>c</sup>   | ۷/۷۲±۰/۲ <sup>c</sup>  | n-3                   |
| ۷/۹۰±۰/۶                | ۹/۳۲±۱/۸                | ۹/۰۰±۱/۴                | ۱۰/۱۲±۰/۹                | ۹/۰۰±۱/۱                | ۹/۴۵±۱/۶               | n-6                   |
| ۲۳/۳۳±۲/۷ <sup>a</sup>  | ۲۱/۹۹±۳/۲ <sup>a</sup>  | ۱۴/۷۴±۱/۴ <sup>b</sup>  | ۱۲/۰۹±۱/۱ <sup>b</sup>   | ۶/۲۳±۰/۶ <sup>c</sup>   | ۷/۳±۰/۸ <sup>c</sup>   | Σ HUFA                |
| ۰/۴۴±۰/۰۳               | ۰/۳۰±۰/۰۴               | ۰/۲۹±۰/۰۲               | ۰/۲۹±۰/۰۲                | ۰/۱۹±۰/۰۳               | ۰/۳۰±۰/۰۴              | EPA/DHA               |
| ۳/۲۵±۰/۲                | ۲/۵۴±۰/۰۱               | ۱/۴۹±۰/۰۶               | ۱/۴۹±۰/۰۸                | ۱/۴۱±۰/۰۴               | ۰/۸۲±۰/۰۶              | n-3/n-6               |

<sup>۱</sup>SFA: اسیدهای چرب اشباع، MUFA: اسیدهای چرب تک غیراشباع و HUFA: اسیدهای چرب بلند زنجیره غیراشباع

### مطالعات بافت شناسی

بررسی بافت شناسی روده ابتدایی و زوائد پیلوریک نشان داد ساختار ویلی‌ها، سلول‌های انتروسیت و سلول‌های موکوسی بچه ماهیان مورد مطالعه کاملاً طبیعی است (شکل ۲). میانگین طول انتروسیت‌ها در این دو بخش تفاوت معنی‌داری نداشت. با این حال در انتروسیت‌های تیمارهای تغذیه شده با سطوح متوسط و بالای اسیدهای چرب HUFA ارتفاع انتروسیت‌ها اندکی بیشتر بود (شکل ۳).

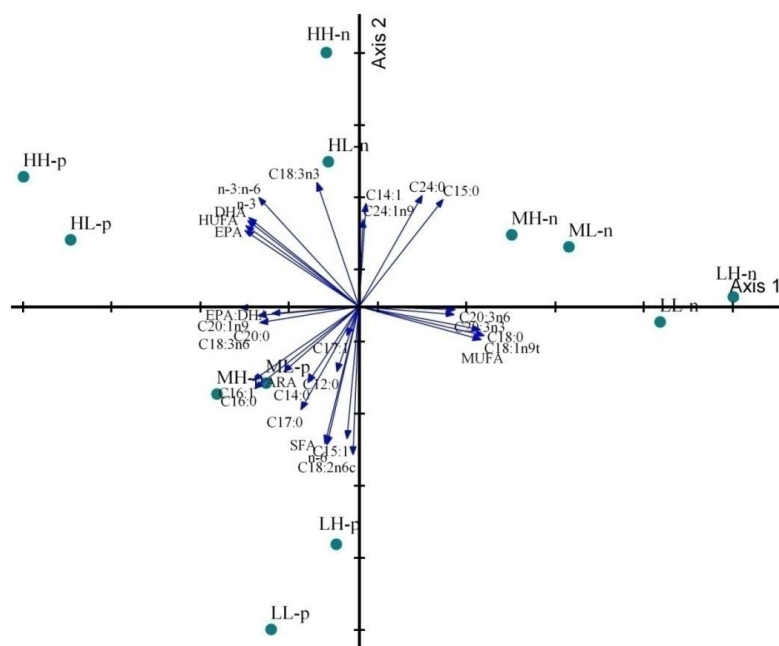
جدول ۴. ترکیب اسیدهای چرب قطبی بچه ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره های آزمایشی مختلف

| جیره های مختلف          |                        |                         |                         |                        |                        | اسیدهای چرب<br>(درصد) |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| HH                      | HL                     | MH                      | ML                      | LH                     | LL                     |                       |
| ۱/۱۱±۰/۰۵               | ۱/۲۷±۰/۰۸              | ۰/۹۷±۰/۰۷               | ۰/۸۳±۰/۰۵               | ۰/۹۶±۰/۰۵              | ۱/۳۰±۰/۰۴              | C14:0                 |
| ۱۷/۰۷±۱/۳               | ۱۸/۷۷±۱/۶              | ۱۸/۰۹±۱/۷               | ۱۶/۴۹±۱/۴               | ۲۰/۴۹±۲/۶              | ۲۰/۵۵±۲/۲              | C16:0                 |
| ۲/۸۷±۰/۴                | ۲/۷۲±۰/۲               | ۳/۲۶±۰/۰۸               | ۵/۴۵±۰/۲                | ۶/۲۳±۰/۰۶              | ۵/۶۸±۰/۰۸              | C18:0                 |
| ۰/۴۵±۰/۰۵               | ۰/۵۴±۰/۰۳              | ۰/۱۲±۰/۰۲               | ۰/۲۴±۰/۰۴               | ۰/۱۵±۰/۰۳              | ۰/۲۵±۰/۰۴              | C20:0                 |
| ۰/۰۴±۰/۰                | ۰/۰۵±۰/۰۱              | ۰/۰۳±۰/۰۱               | ۰/۰۳±۰/۰                | ۰/۰۴±۰/۰               | ۰/۰۲±۰/۰               | C24:0                 |
| ۱/۵۴±۰/۰۷               | ۰/۹۰±۰/۰۴              | ۱/۳۳±۰/۰۸               | ۱/۴۳±۰/۰۲               | ۱/۳۲±۰/۰۴              | ۱/۲۸±۰/۰۶              | C16:1n-7              |
| ۱۸/۷۰±۰/۹ <sup>c</sup>  | ۲۰/۱۴±۱/۴ <sup>c</sup> | ۳۱/۰۶±۲/۳ <sup>b</sup>  | ۳۲/۷۰±۱/۹ <sup>b</sup>  | ۳۶/۸۸±۲/۳ <sup>a</sup> | ۳۸/۱۷±۱/۶ <sup>a</sup> | C18:1n-9              |
| ۷/۹۷±۱/۳                | ۸/۴۱±۱/۵               | ۹/۲۹±۱/۳                | ۸/۶۲±۱/۴                | ۹/۲۸±۱/۶               | ۹/۵۶±۱/۱               | C18:2n-6              |
| ۰/۶۷±۰/۰۳               | ۰/۵۵±۰/۰۹              | ۰/۴۴±۰/۰۷               | ۰/۷۲±۰/۰۵               | ۰/۶۱±۰/۰۴              | ۰/۶۱±۰/۰۸              | C18:3n-6              |
| ۱/۷۷±۰/۰۴               | ۱/۷۱±۰/۰۴              | ۱/۵۴±۰/۰۵               | ۱/۴۵±۰/۰۷               | ۱/۱۸±۰/۰۳              | ۱/۲۴±۰/۰۷              | C18:3n-3              |
| ۲/۶۴±۰/۱                | ۲/۳۲±۰/۱               | ۲/۷۲±۰/۰۷               | ۲/۱۵±۰/۰۹               | ۲/۱۹±۰/۱               | ۲/۰۶±۰/۰۲              | C20:1n-9              |
| ۰/۱۲±۰/۰۶               | ۰/۰۹±۰/۰۴              | ۰/۱۳±۰/۰                | ۰/۱۲±۰/۰۴               | ۰/۱۸±۰/۰۶              | ۰/۱۷±۰/۰۳              | C20:3n-6              |
| ۰/۱۸±۰/۰۵               | ۰/۱۵±۰/۰۶              | ۰/۲۲±۰/۰۴               | ۰/۳۶±۰/۰۷               | ۰/۳۴±۰/۰۵              | ۰/۲۳±۰/۰۸              | C20:3n-3              |
| ۱/۴۲±۰/۰۴ <sup>c</sup>  | ۰/۹۱±۰/۰۶ <sup>e</sup> | ۲/۲۷±۰/۰۶ <sup>a</sup>  | ۱/۵۸±۰/۱ <sup>b</sup>   | ۱/۳۸±۰/۰۳ <sup>c</sup> | ۱/۱۰±۰/۰۴ <sup>d</sup> | C20:4n-6              |
| ۱۰/۴۲±۰/۰۴ <sup>a</sup> | ۸/۹۱±۰/۰۶ <sup>b</sup> | ۵/۲۷±۰/۱ <sup>c</sup>   | ۴/۵۸±۰/۱۲ <sup>c</sup>  | ۲/۳۸±۰/۰۳ <sup>d</sup> | ۳/۱۰±۰/۰۴ <sup>d</sup> | C20:5n-3              |
| ۲۴/۴۴±۱/۶ <sup>a</sup>  | ۲۲/۶۵±۲/۳ <sup>a</sup> | ۱۴/۰۶±۱/۰ <sup>b</sup>  | ۱۳/۴۸±۱/۹ <sup>b</sup>  | ۸/۴۱±۰/۵ <sup>c</sup>  | ۶/۸۲±۰/۸ <sup>c</sup>  | C22:6n-3              |
| ۰/۶۲±۰/۰۷               | ۰/۵۵±۰/۰۶              | ۱/۰۹±۰/۱                | ۰/۲۳±۰/۰۳               | ۰/۴۶±۰/۰۵              | ۰/۳۸±۰/۰۷              | C24:1n-9              |
| ۲۱/۹۷±۱/۷ <sup>c</sup>  | ۲۴/۰۸±۱/۱ <sup>b</sup> | ۲۲/۸۰±۲/۳ <sup>c</sup>  | ۲۳/۳۴±۲/۴ <sup>bc</sup> | ۲۸/۴۰±۱/۱ <sup>a</sup> | ۲۸/۷۱±۲/۷ <sup>a</sup> | ∑ SFA                 |
| ۲۳/۶۸±۲/۰ <sup>c</sup>  | ۲۴/۰۴±۱/۴ <sup>c</sup> | ۳۶/۳۶±۳/۰ <sup>ab</sup> | ۳۶/۷۱±۳/۹ <sup>ab</sup> | ۴۱/۰۴±۴/۱ <sup>a</sup> | ۴۲/۰۹±۳/۴ <sup>a</sup> | ∑ MUFA                |
| ۳۶/۸۱±۲/۷ <sup>a</sup>  | ۳۳/۴۲±۰/۹ <sup>a</sup> | ۲۱/۰۹±۱/۷ <sup>b</sup>  | ۱۹/۸۷±۱/۷ <sup>b</sup>  | ۱۲/۳۰±۰/۸ <sup>c</sup> | ۱۱/۳۹±۱/۱ <sup>c</sup> | n-3                   |
| ۹/۵۱±۰/۷                | ۹/۴۱±۱/۰               | ۱۱/۶۸±۰/۹               | ۱۰/۳۲±۰/۹               | ۱۰/۸۳±۰/۶              | ۱۰/۸۳±۱/۴              | n-6                   |
| ۳۶/۵۸±۲/۶ <sup>a</sup>  | ۳۲/۷۱±۲/۹ <sup>a</sup> | ۲۱/۹۵±۲/۷ <sup>b</sup>  | ۲۰/۱۲±۲/۲ <sup>b</sup>  | ۱۲/۶۸±۱/۴ <sup>c</sup> | ۱۱/۴۱±۱/۲ <sup>c</sup> | ∑ HUFA                |
| ۰/۴۳±۰/۰۸               | ۰/۳۹±۰/۰۴              | ۰/۳۸±۰/۰۵               | ۰/۳۴±۰/۰۷               | ۰/۲۸±۰/۰۳              | ۰/۴۵±۰/۰۸              | EPA/DHA               |
| ۳/۸۷±۰/۲                | ۳/۵۵±۰/۱۵              | ۱/۸۰±۰/۱                | ۱/۹۳±۰/۰۶               | ۱/۱۴±۰/۰۹              | ۱/۰۵±۰/۰۸              | n-3/n-6               |

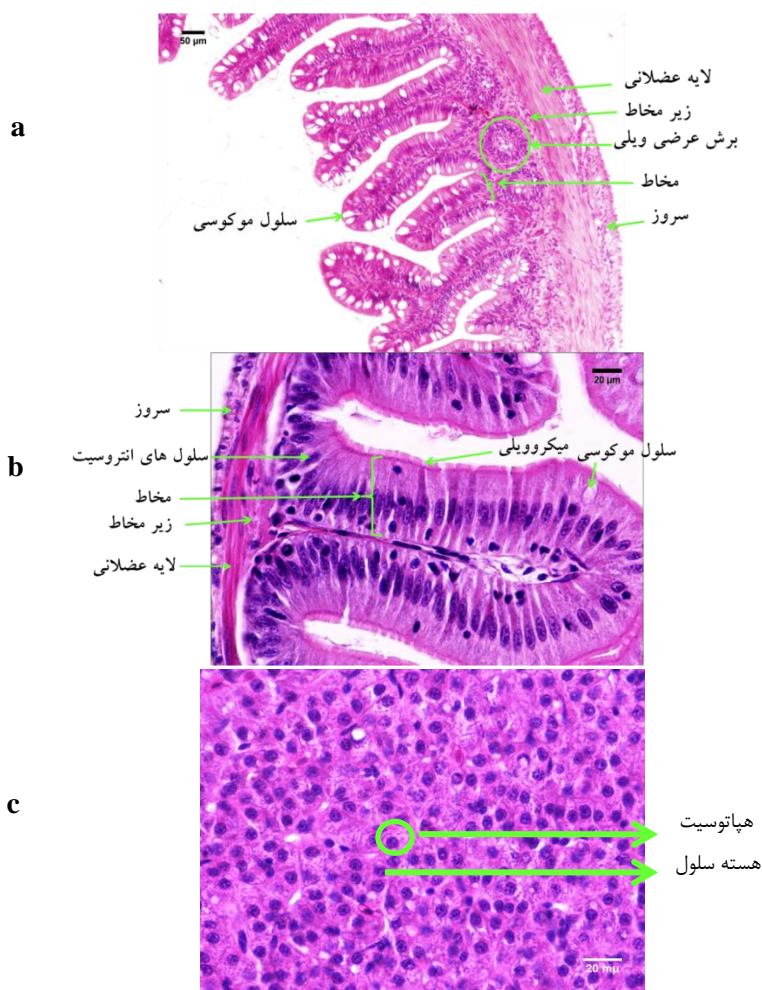
۱. SFA. اسیدهای چرب اشباع و MUFA. اسیدهای چرب تک غیر اشباع و HUFA. اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع

بررسی تصاویر همچنین نشان داد سطوح متوسط و بالای HUFA جیره باعث افزایش میانگین طول ویلی ها در روده ابتدایی می گردند. اگر چه این افزایش نسبت به تیمار LL معنی دار نبود. میانگین طول ویلی ها در بخش زوائد پیلوریک در تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۴).

میانگین مساحت لایه مخاطی در مقاطع عرضی زوائد پیلوریک تفاوتی نشان نداد. با این حال تغذیه بچه ماهیان آزاد دریای خزر با سطوح متوسط و بالای HUFA n-3 باعث افزایش سطح مخاطی ویلی های روده ابتدایی گردید. اما این افزایش سطح از نظر آماری اختلاف معنی داری نشان نداد (شکل ۵).

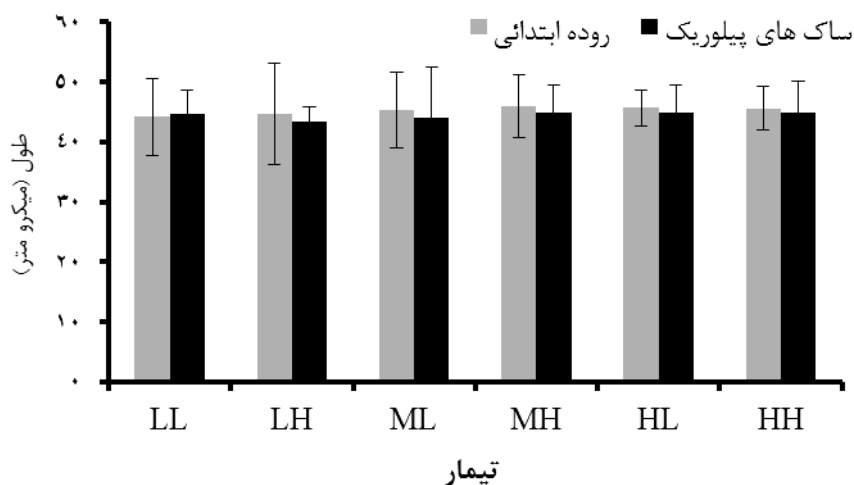


شکل ۱. آنالیز تجزیه مولفه اصلی اسیدهای چرب قطبی و خنثی تیمارهای مختلف بچه ماهیان آزاد دریای خزر. دو محور اول ۶۲/۲۶ واریانس داده‌ها را به خود اختصاص دادند.

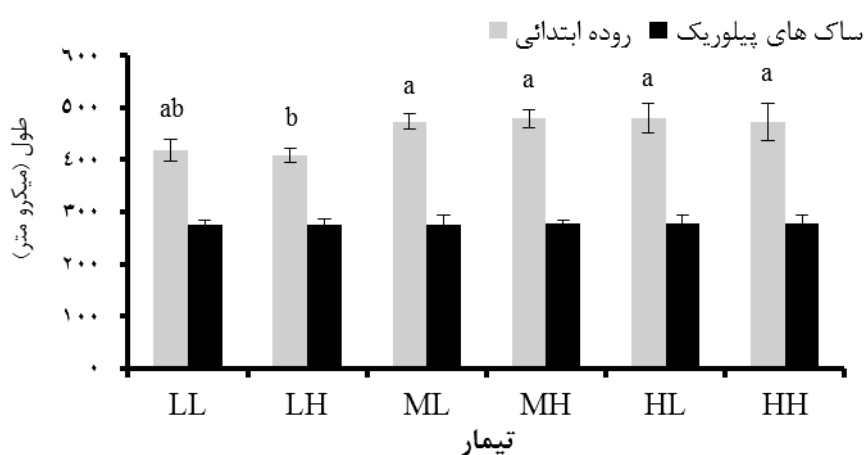


شکل ۲. ساختار روده ابتدایی (a)، زوائد پیلوریک (b) و کبد (c) بچه ماهی آزاد دریای خزر و سلول‌ها و لایه‌های مختلف در یک مقطع عرضی آنها، تیمار MH (رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین-ئوزین).

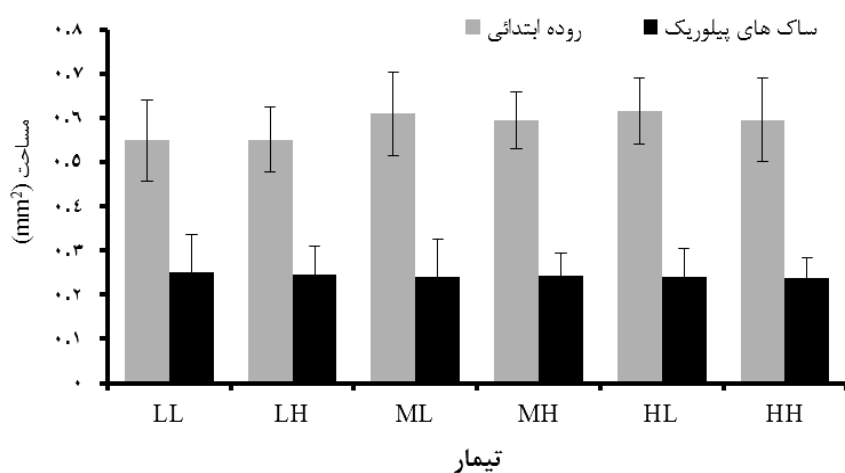




شکل ۳. طول انتروسیت زوائد پیلوریک و روده ابتدایی بچه ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره های آزمایشی

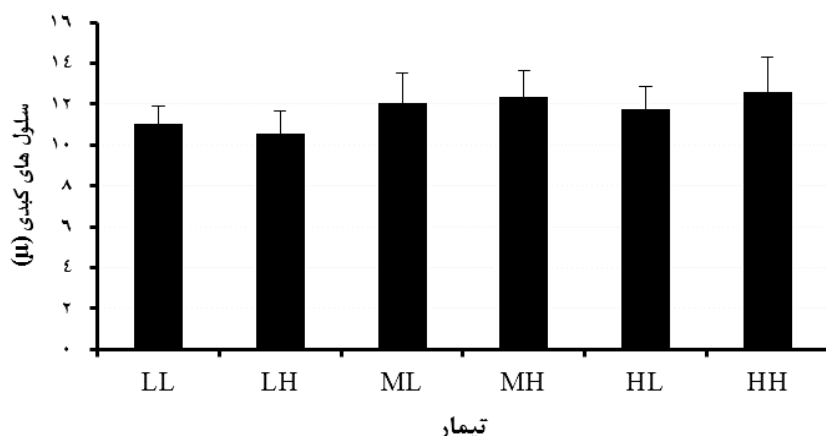


شکل ۴. میانگین طول ویلی های زوائد پیلوریک و روده ابتدایی بچه ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره های آزمایشی



شکل ۵. مساحت لایه مخاطی زوائد پیلوریک و روده ابتدایی بچه ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره های آزمایشی، شمارش از تعداد ۳۰ لام صورت گرفت.

مقایسه قطر سلول های کبدی نشان داد میانگین قطر سلول های کبدی تغییرات چندانی ندارد. با این حال میانگین قطر سلول ها در تیمارهای تغذیه شده با مقادیر متوسط و بالای EPA و DHA بالاتر بود (شکل ۶).



شکل ۶. میانگین قطر سلول های کبدی بچه ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره های آزمایشی، شمارش از تعداد ۳۰ لام صورت گرفت.

## بحث

### اسیدهای چرب

ترکیب اسیدهای چرب خنثی بدن منعکس کننده وضعیت تغذیه ای ماهی است، اما ترکیب اسیدهای چرب قطبی نشان دهنده احتیاجات غشای سلولی است و به همین دلیل در بسیاری از مطالعات تغذیه ای ترکیب اسیدهای چرب قطبی که در حقیقت اطلاعات بیشتری در خصوص احتیاجات اسیدهای چرب ضروری ماهی را بازگو می کند، مورد بررسی قرار می گیرند (Sargent *et al.*, 1999). به طور کلی در این بررسی ترکیب اسیدهای چرب قطبی و خنثی در بچه ماهیان مورد آزمایش تحت تاثیر ترکیب اسیدهای چرب جیره قرار گرفت. مطالعات متعدد در ماهی آزاد اقیانوس اطلس نشان می دهد هر دو عامل نوع و میزان چربی موجود در جیره تاثیر چشمگیری در متابولیسم اسیدهای چرب دارد (Bell *et al.*, 1997; Tocher *et al.*, 2003). میزان اسید چرب C16:0 چربی های خنثی در بچه ماهیان با افزایش HUFA n-3 افزایش یافت. این افزایش می تواند به دلیل افزایش میزان این اسیدهای چرب در جیره ها باشد. علاوه بر این ترکیب اسیدهای چرب موجود در چربی می تواند قابلیت هضم سایر اسیدهای چرب را نیز تغییر دهد. این تاثیرات می تواند به خاطر افزایش کارایی فعالیت تجزیه چربی توسط لیپاز گوارشی باشد، چرا که بررسی ها نشان می دهد لیپاز گوارشی ماهی تمایل بسیار زیادی برای اسیدهای چرب HUFA دارد (Koven *et al.*, 1994).

نتایج آنالیز مولفه اصلی نشان داد میزان اسیدهای چرب EPA و DHA و مجموع اسیدهای چرب n-3 موجود در چربی های قطبی و خنثی همبستگی مثبتی با میزان این اسیدهای چرب در جیره ها دارد. همچنین در تیمارهای حاوی سطوح یکسان اسیدهای چرب EPA و DHA، افزایش میزان آلفا-توکوفرول از ۳۰۰ به ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث افزایش میزان کل اسیدهای چرب n-3 بویژه در چربی های قطبی و در سطوح بالاتر این اسیدهای چرب گردید که نشان می دهد در سطوح بالای این اسیدهای چرب ویتامین E نقش مهمی در جلوگیری از اکسیداسیون و محافظت از اسیدهای چرب ایفا می کند. با افزایش میزان EPA و DHA در جیره ها میزان اسیدهای چرب C18:3n-3 و بویژه C20:5n-3 در هر دو گروه چربی های خنثی و قطبی افزایش یافت. همبستگی مثبت بین ترکیب اسید چرب جیره و بدن در بسیاری از گونه های ماهی گزارش شده است (Ng *et al.*, 2011; Sotoudeh *et al.*, 2011; Abedian Kenari *et al.*, 2011; *al.*, 2003). علاوه بر این عوامل دیگری مانند قابلیت هضم (Torstensen *et al.*, 2000)، جذب و انتقال، فرایندهای غیر اشباع سازی و طول سازی (Bell *et al.*, 1997) و بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب (Torstensen *et al.*, 2000) نیز می تواند ترکیب اسیدهای چرب بدن را تحت تاثیر قرار دهد. میزان این دو اسید چرب در چربی های قطبی نسبت به چربی های خنثی بالاتر بود که می تواند نشان دهنده اهمیت این اسیدهای چرب به عنوان اسیدهای چرب ضروری در این گونه به ویژه در مراحل اولیه رشد باشد. گنجائید شدن بالای اسیدهای چرب HUFA در چربی های قطبی گونه هایی مانند قزل آلائی رنگین کمان (Leray and Pelletier, 1985)، سیم دریایی (Kalogeropoulos *et al.*, 1992) و کفشک (Lee *et al.*, 2003) به اثبات رسیده است. اسیدهای چرب EPA و به ویژه DHA چربی های قطبی بدن بچه

ماهیان به طور قابل توجهی نسبت به میزان آن در جیره‌های آزمایش بالاتر بود. این پدیده (ذخیره و نگهداری) اسید چرب DHA در بسیاری از گونه‌ها مانند ماهی آزاد اقیانوس اطلس (Bell *et al.*, 2001, 2002)، قزل‌آلای رنگین کمان (Caballero *et al.*, 2002)، گربه ماهی آفریقای (Ng *et al.*, 2003) و کفشک (Bell *et al.*, 1994, 1995) گزارش شده است. به نظر می‌رسد مکانیسم ذخیره انتخابی این اسید چرب به خاطر تمایل بالای آنزیم fatty acyl transferases برای DHA و تمایل کم این اسید چرب برای بتا-اکسیداسیون به منظور تامین انرژی باشد (Bell *et al.*, 2001).

## بافت شناسی

روده به عنوان محل اصلی هضم غذا و جذب مواد و کبد با ایفای نقش در سوخت و ساز واسطه، ذخیره‌سازی چربی و گوارش و فرایندهای سم‌زدایی نقش مهمی در فرآیند تغذیه ایفا می‌کنند. در نتیجه استفاده بهینه از مواد مغذی جیره به عملکرد مؤثر روده و کبد بستگی دارد. از این رو تغییرات بافت شناسی این اندام‌ها می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد کیفیت جیره، سوخت و ساز بدن و وضعیت تغذیه‌ای ماهی ارائه دهد. در این مطالعه بررسی ساختار سلول‌های کبدی نشان داد این سلول‌ها در همه تیمارها دارای ساختار نرمال با لوپول‌های منظم می‌باشند که هسته‌ها در مرکز سلول قرار گرفته است. این موضوع نشان می‌دهد تعادل لازم برای سوخت و ساز چربی‌ها وجود دارد و علیرغم وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در جیره‌ها میزان کافی آنتی‌اکسیدان برای جلوگیری از آسیب‌های ناشی از اکسیداسیون موجود است. قطر هپاتوسیت‌ها با افزایش میزان EPA و DHA جیره افزایش یافت، اگر چه این افزایش معنی دار نبود. سوخت و ساز چربی که شامل بیوسنتز و تجزیه اسیدهای چرب است، عمدتاً توسط کبد تنظیم می‌شود و تمایل آنزیم‌های تنظیم کننده این فرآیند برای اسیدهای چرب مختلف در کبد متفاوت است (Henderson, 1996؛ Kiessling and Kiessling, 1993). در نتیجه عدم تعادل در اسیدهای چرب جیره می‌تواند عملکرد و مورفولوژی این ارگان را تغییر دهد. علاوه بر این، عملکرد کبد به عنوان یک منبع اصلی ذخیره انرژی اغلب به صورت تری‌گلیسرید است. بنابراین، هنگامی که چربی یا انرژی جیره بیش از ظرفیت سلول‌های کبدی برای اکسید کردن اسید چرب باشد و یا زمانی که سنتز پروتئین دچار اختلال شود موجب افزایش بیوسنتز و تجمع تری‌گلیسرید در واکوئل می‌گردد که منجر به یک الگوی مورفولوژیکی شناخته شده به عنوان استئاتوز می‌شود. استئاتوز کبدی در نتیجه عدم تعادل تغذیه‌ای در ماهیان پرورشی است (Tacon, 1996). در سیم دریایی استئاتوز در نتیجه افزایش چربی جیره (Caballero *et al.*, 1999)، کمبود اسید چرب ضروری (Montero *et al.*, 2001)، استفاده از جیره‌های مصنوعی (Spisni *et al.*, 1998) و روغن‌های گیاهی (Alexis, 1997) گزارش شده است. افزایش قطر هپاتوسیت‌ها در این مطالعه می‌تواند با افزایش ظرفیت میتوکندری‌ها برای افزایش بتا-اکسیداسیون اسیدهای چرب باشد چرا که در ماهی آزاد اقیانوس اطلس انکوباسیون سلول‌های کبدی با مقادیر بالای EPA موجب افزایش مساحت میتوکندری گردید (Kjær *et al.*, 2008). از سوی دیگر اسید چرب EPA با افزایش میزان بتا-اکسیداسیون میتوکندریایی موش به عنوان مهمترین ترکیب کاهنده تری‌گلیسرید در روغن ماهی شناخته شده است (Madsen *et al.*, 1999). بنابراین، مطالعات مورفولوژیکی نشان می‌دهد که EPA باعث افزایش میتوکندری‌ها و پراکسیزوم‌ها موجب کاهش تعداد قطرات چربی در کبد می‌گردد (Totland *et al.*, 2000). استفاده از روغن‌های گیاهی به عنوان جایگزینی برای روغن ماهی موجب ایجاد واکوئل‌های بزرگ چربی در سلول‌های کبدی در ماهیان گردیده است (Caballero *et al.*, 2003, 2004). از آنجا که این روغن‌ها فاقد اسیدهای چرب HUFA می‌باشند، تجمع چربی به کمبود این اسیدهای چرب نسبت داده شده است. علاوه بر این وجود مقادیر بالای اولئیک اسید در جیره‌ها می‌تواند با عدم وجود قطرات چربی و ساختار نرمال سلول‌های کبدی در همه تیمارها مرتبط باشد. کاهش تجمع چربی در کبد ماهی سیم دریایی تغذیه شده با روغن کلزا نسبت به سایر روغن‌های گیاهی به وجود مقادیر بالای اولئیک اسید در این روغن نسبت داده شده است (Caballero *et al.*, 2004). در پستانداران نیز اسید اولئیک همانند اسیدهای چرب n-3 (با میزان کمتر) به عنوان عامل کاهنده چربی شناخته شده است (Halvorsen *et al.*, 2001).

به طور کلی مشاهدات بافت شناسی روده ابتدایی و زوائد پیلوریک بچه ماهیان مورد استفاده در این آزمایش نشان داد اختلافات مورفولوژیکی بسیار کمی در بین تیمارها وجود دارد. تغییرات بافت شناسی کبد و روده ماهی اغلب در اثر تغذیه با

جیره‌های حاوی مقادیر بالای چربی اتفاق می‌افتد (Kestemont *et al.*, 2001). بنابراین آسیب‌های بافتی در این اندام‌ها به میزان بالای چربی که به سختی جذب می‌شوند، از جمله روغن‌های گیاهی مرتبط است (Parpoura and Alexis, 2001). استفاده از روغن‌های گیاهی مانند روغن سویا، زیتون و کلزا در جیره ماهیانی مانند سیم دریایی، قزل آلی رنگین کمان و سایر آزادماهیان موجب تجمع چربی در انتروسیت‌ها، بزرگ شدن هسته سلول، تخریب غشای سلولی که منجر به نفوذ ماکروفاژها می‌گردد و وقوع نکروز سلول‌های کبدی گردیده است (Parpoura and Alexis, 2001؛ Caballero *et al.*, 2002). با این حال، تجمع چربی و آسیب سلولی نه تنها به میزان چربی بلکه به ماهیت اسیدهای چرب جیره نیز وابسته است (Olsen *et al.*, 2000). همانطور که قبلاً بحث شد یکی از دلایل تجمع چربی انتروسیت‌ها در اثر تغذیه با روغن‌های گیاهی کاهش میزان اسیدهای چرب HUFA n-3 و در نتیجه کاهش سنتز لیوپروتئین‌هاست (Watanabe, 1982؛ Olsen, 1989؛ Sargent *et al.*, 2000). بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد طول ویلی‌های روده ابتدایی در تیمارهای تغذیه شده با سطوح متوسط و بالای HUFA جیره افزایش یافته است. از سوی دیگر مساحت لایه مخاطی نیز در این تیمارها بیشتر بود. به نظر می‌رسد افزایش طول ویلی‌های روده در این تیمارها می‌تواند به عنوان مکانیسمی جهت افزایش سطح جذب مواد مغذی در روده عمل کند. به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد سطوح مختلف اسیدهای چرب HUFA n-3 و ویتامین جیره تاثیرات معنی داری بر ساختار روده ابتدایی و کبد بچه ماهی آزاد دریای خزر ندارد. با این حال افزایش شاخص‌هایی مثل لایه مخاطی و تعداد انتروسیت‌ها در واحد سطح می‌تواند به عنوان مکانیسمی جهت افزایش جذب مواد مغذی و عملکرد بهتر رشد این ماهی در این مرحله از رشد باشد.

تغییر ترکیب اسیدهای چرب جیره، شامل افزایش اسیدهای چرب DHA و EPA باعث تغییر پروفایل اسیدهای چرب بدن گردید که این تغییرات بر متابولیسم چربی‌ها و برخی از فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی مؤثر بود. در این بررسی شواهدی در خصوص بروز آسیب‌ها، تغییرات بافتی یا تجمع چربی در بافت روده ابتدایی، زوائد پیلوریک و کبد بچه ماهیان یافت نشد که نشان می‌دهد این اسیدهای چرب نقش سودمندی در جلوگیری از تجمع چربی‌ها دارند.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از خانم مهندس سیده فاطمه هاشمی و آقایان مهندس مهدی نادری کوشک و خالد خالقی به دلیل همکاری در نمونه‌برداری و انجام بخشی از آزمایشات به عمل می‌آورند. همچنین از ریاست محترم کارخانه خوراک دام و طیور آریان ساری جناب آقای مهندس کابلی، سرکار خانم گیلدا نماینده شرکت CRODA در ایران و مدیریت محترم شرکت ارس بازار به دلیل فراهم کردن بخشی از ترکیبات مورد نیاز جیره، همچنین از مدیریت بازسازی ذخایر سازمان شیلات ایران و مدیریت محترم کارگاه تکثیر و پرورش شهید باهنر کلاردشت به دلیل همکاری و در اختیار گذاشتن بچه ماهی سپاسگزاریم.

## منابع

- Abedian Kennari, A.M., Torfi Mozanzadeh, M., Pourgholam, R. 2011. Effects of total fish oil replacement to vegetable oils at two dietary lipid levels on the growth, body composition, haemato-immunological and serum biochemical parameters in Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Aquaculture Research*. 42: 1131-1144.
- Alexis, M. 1997. Fish meal and fish oil replacers in Mediterranean marine fish diets. *Cahiers Options Mediterraneennes*. 22: 186-204.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Sargent, J.R. 1994. Effect of supplementation with 20:3(n-6), 20:4(n-6) and 20:5(n-3) on the production of prostaglandins E and F on the 1-, 2- and 3-series in turbot (*Scophthalmus maximus*) brain astroglial cells in primary culture. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1211: 335-342.
- Bell, J.G., Castell, J.D., Tocher, D.R., MacDonald, F.M., Sargent, J.R. 1995. Effects of different dietary arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and

- prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 14: 139-151.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Farndale, B.M., Cox, D.I., McKinney, R.W., Sargent, J.R. 1997. The effect of dietary lipid on polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation. *Lipids*. 32: 515-525.
- Bell, M., Dick, J.R., Porter, E. 2001. Biosynthesis and tissue deposition of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids*. 36: 1153-1159.
- Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., Smullen, R.P., Sargent, J. 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition*. 132: 222-230.
- Blazer, V.S. 1982. The effect of marginal deficiencies of ascorbic acid and a-tocopherol on the natural resistance and immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). University of Rhode Island, USA.
- Caballero, M., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M., Izquierdo, M. 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 214: 253-271.
- Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjørsvik, E., Fernández, A.J., Rosenlund, G. 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases*. 27: 531-541.
- Caballero, M.J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F.J., Izquierdo, M.S., Fernandez, A.J. 1999. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 179: 277- 290.
- Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjørsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A.J., Rosenlund, G. 2003. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*. 225: 325-340.
- Folch, J., Less, M., Stainley, G.H.S. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*. 226: 497-509.
- Gonzalez, M.M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernandez-Cruz, C.M., Fernandez-Palacios, H. 1995. Dietary vitamin E for *Sparus aurata* larvae. *European Aquaculture Society*. 24: 239-242.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1996. Lipid Peroxidation: A Radical Chain Reaction. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (eds.). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford. pp.188-266.
- Halvorsen, B., Rustan, A.C., Madsen, L., Reseland, J., Berge, R.K., Sletnes, P., Christiansen, E. 2001. Effects of long-chain monounsaturated and n-3 fatty acids on fatty acid oxidation and lipid composition in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 45: 30-37.
- Hamre, K., Waagbø, R., Berge, R.K., Lie, Ø. 1997. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Free Radical Biology and Medicine*. 22: 137-149.
- Henderson, R.J. 1996: Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Archives of Animal Nutrition*. 49: 5-22.
- Izquierdo, M. 2005. Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. *Cahiers Options Mediterraneennes*. 63: 91-102.
- Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H., Tacon, A.G.J. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*. 197: 25-42.
- Kalogeropoulos, N., Alexis, M.N., Henderson, R. 1992. Effects of dietary soybean and cod liver oil levels on growth and body composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 104: 293-308.
- Kanazawa, K. 1993. Tissue injury induced by dietary products of lipid peroxidation. In: Corongiu, F. (ed.). *Free Radicals and Antioxidants in Nutrition*. Richelieu Press, London. pp. 383-399.
- Kestemont, P., Vandeloise, E., Melard, C., Fontaine, P., Brown, P. 2001. Growth and nutritional status of Eurasian perch *Perca fluviatilis* fed graded levels of dietary lipids with or without added ethoxyquin. *Aquaculture*. 203: 85-99.
- Kiessling, K.H., Kiessling, A. 1993. Selective utilization of fatty acids in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) red muscle mitochondria. *Canadian Journal of Zoology*. 71: 248-251.
- Koven, W.M., Henderson, R.J., Sargent, J. 1994. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*): I. Lipid class and fatty acid composition of digesta from different segments of the digestive tract. *Fish Physiology and Biochemistry*. 13: 69-79.

- Lee, S.M., Lee, J.H., Kim, K.D. 2003. Effect of dietary essential fatty acids on growth, body composition and blood chemistry of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture*. 225: 269-281.
- Lin, Y.H., Shiau, S.Y. 2005. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses. *Aquaculture*. 248: 235-244.
- Madsen, L., Rustan, C., Vaagenes, H., Berge, K., Dyrøy, E., Berge, R.K. 1999: Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference. *Lipids*. 34: 951-63.
- Metcalf L.D., Schmitz, A.A. 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatography analysis. *Analytical Chemistry*. 33: 363-364.
- Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., Izquierdo, M.S. 2001. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*. 11: 473-90.
- National Research Council (NRC). 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, Washington, DC, USA. 392 p.
- Huang, C.H., Huang, S.L. 2004. Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*×*O. aureus*, fed oxidized oil. *Aquaculture*. 237: 381-389.
- Ng, W.K., Lim, P.K., Boey, P.L. 2003. Dietary lipid and palm oil source affects growth, fatty acid composition and muscle  $\alpha$ -tocopherol concentration of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. 215: 229-243.
- Parpoura, A.C.R., Alexis, M. 2001. Effects of different dietary oils in seabass (*Dicentrarchus labrax*) nutrition. *Aquaculture International*. 9: 463-476.
- Olsen, R.E., Myklebust, R., Ringø, E., Mayhew, T. 2000. The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiology and Biochemistry*. 22: 207-216.
- Sargent, J., Henderson, R.J., Tocher, D.R. 1989. The lipids. In: Halver, J.E. (ed.). *Fish Nutrition*. Academic Press, London, UK. pp. 154-218.
- Roem, A.J., Kohler, C.C., Stickney, R. 1990. Vitamin E requirements of the blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner), in relation to dietary lipid level. *Aquaculture*. 87: 155-164.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Estevez, A., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*. 179: 217-229.
- Satoh, S., Takeuchi, T., Watanabe, T. 1987. Requirement of Tilapia for alpha-tocopherol. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 53: 119-124.
- Sotoudeh, E., Kenari, A.A., Rezaei, M.H. 2011. Growth response, body composition and fatty acid profile of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) juvenile fed diets containing different levels of soybean phosphatidylcholine. *Aquaculture International*. 19: 611-623.
- Spisni, E., Tugnoli, M., Ponticelli, A., Mordenti, T., Tomasi, V. 1998. Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *Journal of Fish Diseases*. 21: 177-184.
- Kjær, M., Vegusdal, A., Gjøen, T., Rustan, A.C., Todorčević, M. Ruyter, B. 2008. Effect of rapeseed oil and dietary n-3 fatty acids on triacylglycerol synthesis and secretion in Atlantic salmon hepatocytes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 1781: 112-122.
- Tacon, A.G. 1996. Lipid nutritional pathology in farmed fish. *Arch. Animal Nutrition*. 49: 33-39.
- Tocher, D.R., Bell, J.G., Dick, J.R., Crampton, V.O. 2003. Effects of dietary vegetable oil on Atlantic salmon hepatocyte fatty acid desaturation and liver fatty acid compositions. *Lipids*. 38: 723-32.
- Torstensen, B.E. Lie, Ø. Frøyland, L. 2000. Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids*. 35: 653-664.
- Leray, C., Pelletier, X. 1985. Fatty acid composition of trout phospholipids: effect of (n-3) essential fatty acid deficiency. *Aquaculture*. 50: 51-59.
- Totland, G.K., Madsen, L., Klementsens, B., Vaagenes, H., Kryvi, H., Froyland, L., Hexeberg, S. Berge, R.K. 2000. Proliferation of mitochondria and gene expression of carnitine palmitoyltransferase and fatty acyl-CoA oxidase in rat skeletal muscle, heart and liver by hypolipidemic fatty acids. *Biology of the Cell*. 92: 317-329.

- Wang, Z., Mai, K., Liufu, Z., Ma, H., Xu, W., Ai, Q., Zhang, W., Tan, B., Wang, X. 2006. Effect of high dietary intakes of vitamin E and n-3 HUFA on immune responses and resistance to *Edwardsiella tarda* challenge in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck and Schlegel). *Aquaculture Research*. 37: 681-692.
- Watanabe, T., Takeuchi, T., Wade, M. 1981a. Dietary lipid levels and a-tocopherol requirement of carp. *Bull. Japanese Society for the Science of Fish*. 47: 1585-1590.
- Watanabe, T., Takeuchi, T., Wada, M. Uehara, R. 1981b. The relationship between dietary lipid levels and a-tocopherol requirement of rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*. 47: 1463-1471.
- Watanabe, T. 1982. Lipid nutrition in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 73: 3-15.