

## "مقاله پژوهشی"

## اثر سطوح مختلف سلیوم‌های آلی و معدنی بر ریخت‌شناسی پرزهای روده و تغییرات بافتی کبد در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*)

کاوس نظری<sup>\*۱</sup>

۱- بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۳

### چکیده

مطالعه حاضر باهدف بررسی تاثیر سطوح مختلف سلیوم‌های آلی و معدنی در جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) بر ریخت‌شناسی پرزهای روده و بافت‌شناسی کبد به مدت ۶۰ روز انجام شد. بدین منظور تعداد ۱۰۸۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌ظاهر سالم با میانگین وزنی  $5.0 \pm 2/8$  گرم به‌صورت تصادفی در سه گروه مساوی و هر گروه شامل سه تکرار تقسیم شدند. در این آزمایش ۹ جیره آزمایشی شامل سطوح مختلف سلیوم آلی و سلیوم معدنی هر یک حاوی ۰/۱۵، ۰/۳۰، ۰/۴۵ و ۰/۶۵ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی و یک گروه شاهد بود. در پایان روز آخر، از هر تیمار ۳ قطعه بچه ماهی به‌طور تصادفی صید و پس از بیهوشی و خارج کردن بافت‌های کبد و روده طبق روش‌های استاندارد نسبت به تهیه نمونه‌های بافتی اقدام و نهایتاً توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. مطالعات میکروسکوپی و ریخت‌شناسی بیانگر بهبود معنی‌دار تغییرات ساختاری بافت روده شامل افزایش سطح جذب، طول و ضخامت پرزهای روده و کاهش عمق کریپت پرزهای روده در تیمار حاوی ۰/۴۵ میلی‌گرم سلیوم آلی در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد بود ( $p < 0/05$ ). همچنین کمترین تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت کبد نیز در تیمار حاوی ۰/۴۵ میلی‌گرم سلیوم آلی و شدیدترین تغییرات در تیمارهای شاهد و سطوح بالای سلیوم معدنی مشاهده شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده تیمار حاوی ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلیوم آلی به‌عنوان بهترین تیمار برای تحریک توسعه دستگاه گوارش و همچنین کاهش اثرات احتمالی آسیب‌شناسی بافت کبد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تشخیص داده شد.

**کلمات کلیدی:** قزل‌آلای رنگین‌کمان، سلیوم، بافت‌شناسی، پرز روده.

## مقدمه

سلنیوم به عنوان یک ماده معدنی کم مصرف و یکی از اجزاء تشکیل دهنده جیره های غذایی در تغذیه حیوانات مختلف از جمله ماهیان مورد توجه است (Lin, 2014; Rotruck et al., 1973). گرچه در برخی از مطالعات انجام شده نیز هیچ گونه تأثیر مثبتی در استفاده از سلنیوم در جیره غذایی گونه های مختلف آبزیان مشاهده نشده است (Gatlin and Wilson, 1984; Lorentzen et al., 1994; Kim et al., 2003). سلنیوم علاوه بر نقش خود در ارتباط با آنزیم گلوکوتائون پراکسیداز در سیستم های آنزیمی دیگری همچون چرخه تنظیم و انتقال انرژی، اسپرما توژنز، سنتز اسیدهای چرب ضروری، سنتز پایه پورین و پیریمیدین و سیستم های ایمنی حیوانات نیز نقش دارد (Lin, 2014; Lin et al., 2005). ورود سلنیوم به ساختمان همگی این آنزیم ها از طریق ایجاد سلنوسیسستین و متیونین بوده و تجمع اشکال معدنی باقی مانده این عنصر می تواند در سلول های بدن سمی باشد (Misra and Niyogi, 2009). به طور کلی هر یک از سلنیوم های آلی و معدنی، در حیوانات مختلف دارای فعالیت های متابولیکی و میزان جذب متفاوتی هستند (Burk, 1976; Sunde, 1984). طبق بررسی های انجام شده مشخص شده است که استفاده از سلنیوم آلی در جیره غذایی گونه های مختلف ماهیان دارای قابلیت بیشتر، انباشت بهتر و فعالیت های بیولوژیکی بالاتری در مقایسه با اشکال معدنی سلنیوم می باشد (Ashouri et al., 2015). در حال حاضر منع رایج تأمین کننده سلنیوم شکل معدنی آن یعنی سلنات سدیم می باشد که به دلیل مکانیسم جذب ضعیف آن در روده که از طریق انتشار صورت می گیرد. برای پیشگیری از اثرات مسمومیت زایی ناشی

از تجمع آن به شکل معدنی نوع جدیدی از منابع سلنیوم در تغذیه حیوانات به صورت سلنومتیونین و سیستین مطرح شده است (محسنی و ستوده، ۱۳۹۳).

پرورش ماهیان سرد آبی و به ویژه ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) با توجه به ویژگی هایی نظیر: سازش خوب آن به شرایط پرورش متراکم، عدم سخت گیری در انتخاب غذا و سرعت رشد مناسب توسعه یافته و این خصوصیات مثبت باعث شد ماهی قزل آلا به عنوان ماهی شماره یک اکثر کارگاه های تکثیر و پرورش ماهیان سرد آبی در بیشتر کشورهای دنیا تبدیل شود و سهم بالایی از تولید ماهیان پرورشی را به خود اختصاص دهد (حبیب اللهی، ۱۳۸۹؛ وثوقی و مستجیر، ۱۳۸۱). طبق بررسی های انجام شده در پرورش ماهی قزل آلا، غذا تقریباً نصف هزینه های تولیدی را شامل می شود. لذا برای داشتن یک پرورش موفقیت آمیز، نیاز به جیره هایی فرموله با میزان بازدهی و جذب بالا است (Cahu et al., 2009). البته برای دستیابی به این موضوع در طول سال های اخیر تحقیقات فراوانی روی ترکیبات و مکمل های غذایی که در بالا بردن سلامت موجود و کارایی تغذیه نقش دارند صورت گرفته است (Gibson and Roberfroid, 1995). همچنین می توان با استفاده از این مکمل های غذایی قدرت مقابله آبزیان در برابر تنش های مختلف را نیز به میزان قابل ملاحظه ای بالا برد (Sukhoverkhov, 2006). با وجود اینکه استفاده از محرک های ایمنی نتایج مطلوب و جالب توجهی را ارائه داده است، اما نمی توان از آثار و عوارض جانبی احتمالی این مواد بر بافت های بدن آبزیان به طور کامل چشم پوشی کرد؛ لذا بررسی آثار جانبی خصوصاً تغییرات آسیب شناسی بافتی ناشی از محرک های رشد و ایمنی در آبزیان

اثرات هر یک از آن‌ها بر بافت‌های کبد و روده بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان طراحی و اجرا گردید.

### مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر طی ماه‌های فروردین و اردیبهشت سال ۱۳۹۵ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، واقع در پارک حفاظت‌شده خجیر (تهران) بر روی ۱۰۸۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی  $50 \pm 2/8$  گرم پس از تهیه از یکی از مزارع پرورش ماهی واقع در شهرستان نور (مازندران) انجام شد. اندازه‌گیری عوامل کیفی آب همچون دما به شکل روزانه با استفاده از دماسنج جیوه‌ای، pH آب، اکسیژن محلول و هدایت الکتریکی (EC) به ترتیب توسط دستگاه pH متر دیجیتال Hach مدل EC20، کیت اکسیژن سنج Karizab (ساخت ایران) و دستگاه EC متر دیجیتال Metrohm مدل 644 ساخت کشور آلمان به صورت هفتگی انجام گرفت. نتایج به‌دست‌آمده در قالب مقادیر میانگین در جدول ۱- ارائه شده است. لازم به ذکر است منبع اصلی تأمین‌کننده آب در حوضچه‌های پرورش چشمه‌ای واقع در ۵۰۰ متری حوضچه‌ها بود که از طریق دو عدد پمپ الکتریکی تأمین می‌شد. جهت تأمین نیاز اکسیژنی بچه ماهیان نیز در هر حوضچه از یک عدد سنگ هوا متصل به پمپ هواده استفاده شد. ضمن آنکه لوله‌های تأمین‌کننده آب هر حوضچه نیز از قسمت بالای هر حوضچه عبور داده شد که با فشار آب را به داخل حوضچه‌ها منتقل و عملیات هواده‌ی را کامل می‌کرد. عمل سیفون کردن نیز جهت تخلیه باقیمانده‌های غذا و مدفوع از داخل هر حوضچه و تعویض آب حوضچه‌ها به‌منظور کاهش بار آمونیاکی به شکل روزانه انجام

ضروری به نظر می‌رسد (Camargo and Martinez, 2007).

طبق بررسی‌های انجام‌شده در این زمینه افزودن سلنیوم به جیره غذایی باعث بهبود کارایی رشد و عملکردهای ایمنی در گروه‌های متنوعی از ماهیان می‌گردد (Jaramillo and Gatlin, 2004; Zhou et al., 2009). در همین ارتباط، اهمیت افزودن سلنیوم به جیره‌های غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Hilton et al., 1980)، گربه‌ماهی کانالی (Gatlin and Wilson, 1984)، هامور (Lin and Shiau, 2005) و گیش ماهی دم زرد (Le and Fotedar, 2013) گزارش شده است. Liu و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که پودر بوتیرات سدیم به عنوان یک ماده معدنی محرک رشد سبب افزایش طول پرز روده در ماهیان کپور علفخوار می‌گردد. همچنین بررسی روند تغییرات دستگاه گوارش و غدد ضمیمه در قسمت کبد و روده‌ها به دلیل اهمیت خاص آن در جذب و گوارش مواد غذایی و در نتیجه رشد و نمو بهتر لارها و بچه ماهیان و همین‌طور افزایش بازدهی تکثیر مصنوعی و موفقیت در امر پرورش ماهیان دارای جایگاه ویژه‌ای است (Jafari et al., 2008). با توجه به موارد ذکرشده و نبود اطلاعات کافی در زمینه تأثیر استفاده از انواع مختلف سلنیوم‌های آلی و معدنی در جیره غذایی بر مورفولوژی و تغییرات آسیب‌شناسی بافتی احتمالی آن‌ها در اندام‌های حساسی مانند کبد و روده ماهیان و از طرفی، با توجه به فواید تغذیه‌ای سلنیوم در ارتقاء پارامترهای رشد و بهبود فاکتورهای ایمنی، مطالعه حاضر باهدف بررسی اثرات استفاده از سطوح مختلف هر یک از سلنیوم آلی و معدنی در جیره‌های غذایی مکمل سازی شده توسط این محصولات و مقایسه

مقدار غذا برای کل دوره آزمایش (۶۰ روز) با استفاده از مواد اولیه (جدول ۲) و بر مبنای فرمول تهیه شده توسط نرم افزار UFFDA (Pesti et al., 1992) تهیه شدند. مواد اولیه ابتدا توسط آسیاب برقی خرد و الک (قطر ۱ میلی متر) شدند. سپس میزان هر کدام بر اساس فرمول تهیه شده محاسبه و وزن گردیده و با یکدیگر به صورت همگن مخلوط شده در نهایت با اضافه کردن آب و روغن به شکل خمیر درآمدند. خمیرهای مورد نظر به رشته های اکستروود تبدیل و در آون با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۸ ساعت خشک شدند و در نهایت به پلت های به قطر ۱/۵ در داخل کیسه های پلاستیک در یخچال نگهداری شدند. بچه ماهیان متناسب با میزان اشتها، روزانه به میزان ۵ درصد وزن بدن، بسته به دمای آب دومرتبه در روز در ساعت ۹ صبح و ۱۸ عصر به مدت ۶۰ روز غذایی شدند. جیره های غذایی مورد نظر پس از آماده سازی برای حصول اطمینان از کیفیت و ترکیب تقریبی به آزمایشگاه منتقل و میزان پروتئین با استفاده از روش کجگلدال، چربی خام مطابق با روش سوکسله و رطوبت، فیبر، خاکستر، کربوهیدرات نیز به روش ارایه شده توسط AOAC (1990) اندازه گیری شدند.

می شد. دوره نوری نیز در طول دوره پرورش به صورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد.

جدول ۱: دامنه تغییرات پارامترهای کیفی آب در استخرهای پرورشی در طول دوره پرورش (انحراف معیار  $\pm$  میانگین)

دما (C°)	اکسیژن محلول (mg/l)	هدایت الکتریکی (m $\mu$ /s)	pH
۱۵±۱	۸/۰±۳/۸۱	۰/۰±۶۳۰/۰۱	۶/۰±۳/۱۵

قبل از ذخیره سازی، تمام حوضچه به وسیله پرمنگنات پتاسیم به میزان ۱ میلی گرم در لیتر (زارعی، ۱۳۹۱) کاملاً ضد عفونی شده، سپس حوضچه ها تخلیه شدند. پس از دو بار آبگیری و تخلیه ی مجدد، مورد آبگیری نهایی قرار گرفتند. بچه ماهیان نیز پس از ضد عفونی شدن به مدت یک دقیقه در محلول نمک ۴ درصد، به صورت تصادفی در ۳۶ عدد حوضچه بتنی با ظرفیت ۱۰۰۰ لیتر (با حجم آبگیری ۸۰۰ لیتر) در ابعاد ۱۰۰×۱۰۰×۱۰۰ سانتی متر با تراکم ۳۰ قطعه بچه ماهی در هر حوضچه تقسیم شدند. پس از گذشت یک دوره یک هفته ای جهت سازگاری بچه ماهیان با شرایط جدید و جیره پایه تهیه شده از شرکت چینه (تهران)، تغذیه بچه ماهیان با جیره های غذایی مکمل سازی شده توسط سطوح مختلف سلنیوم های آلی و معدنی آغاز شد.

با توجه به تیمارهای تعیین شده، ۸ جیره غذایی که از لحاظ محتوای پروتئین خام، چربی خام و انرژی خام محتوای یکسانی داشتند با ۴ سطح مشخص از هر یک از سلنیوم آلی و معدنی (شرکت وتاک، شیراز) در شامل ۰/۱۵، ۰/۳۰، ۰/۴۵ و ۰/۶۰ میلی گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی به ترتیب تحت عنوان تیمارهای آلی ۱ تا ۴ و تیمارهای معدنی ۱ تا ۴ پس از محاسبه

جدول ۲: اجزای فرمول جیره های آزمایشی مرود استفاده در تغذیه بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با سطوح مختلف سلیوم های آلی و

معدنی

جیره‌های آزمایشی واجد سلیوم (میلی گرم در کیلو گرم)									
ترکیب غذایی (%)	شاهد	آلی ۱ (۰/۱۵)	آلی ۲ (۰/۳۰)	آلی ۳ (۰/۴۵)	آلی ۴ (۰/۶۵)	معدنی ۱ (۰/۱۵)	معدنی ۲ (۰/۳۰)	معدنی ۳ (۰/۴۵)	معدنی ۴ (۰/۶۵)
پودر ماهی	۳۴/۹	۳۴/۹	۳۴/۹	۳۴/۹	۳۴/۹	۳۴/۹	۳۴/۹	۳۴/۹	۳۴/۹
کنجاله سویا	۲۰/۵	۲۰/۵	۲۰/۵	۲۰/۵	۲۰/۵	۲۰/۵	۲۰/۵	۲۰/۵	۲۰/۵
گندم	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
روغن کلزا	۹/۹	۹/۹	۹/۹	۹/۹	۹/۹	۹/۹	۹/۹	۹/۹	۹/۹
ذرت	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸
دی کلسیم فسفات	۲/۰۵	۲/۰۵	۲/۰۵	۲/۰۵	۲/۰۵	۲/۰۵	۲/۰۵	۲/۰۵	۲/۰۵
کریوکسی متیل سلولز	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
کربنات کلسیم	۱/۷۷	۱/۷۷	۱/۷۷	۱/۷۷	۱/۷۷	۱/۷۷	۱/۷۷	۱/۷۷	۱/۷۷
مواد معدنی	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مخلوط ویتامین	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴
ویتامین C	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸
کولین کلراید	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵

جدول ۳: آنالیز ترکیب شیمیایی جیره مورد استفاده در تغذیه بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با سطوح مختلف سلیوم های آلی و

معدنی

ترکیب	درصد
رطوبت	۱۱/۰۶
پروتئین خام	۴۱/۵
چربی خام	۸/۵
کربوهیدرات	۲۱
خاکستر	۱۳/۲
انرژی خام (Mj.kg <sup>-1</sup> )	۱۸/۸

در پایان دوره ۶۰ روزه پرورش، تعداد ۳ نمونه ماهی از هر یک از تیمارهای آزمایشی (تعداد یک نمونه از هر تکرار) به‌طور تصادفی صید و توسط ۲۰۰ ppm پودر گل میخک (Ghobadi et al., 2009) بیهوش شدند.

پس از بیهوشی کامل بچه ماهیان و عملیات کالبدشکافی، بافت‌های موردنظر از قسمت میانی کبد و قسمت قدامی روده جدا شده و پس از شستشو توسط سرم فیزیولوژی به‌منظور تثبیت شدن، به مدت ۴۸ ساعت در داخل میکروتیوب های حاوی محلول فیکساتور بوئن قرار داده شدند ( Ganji and Arvand, 2002). در مرحله بعد به‌منظور تهیه لام‌های بافتی ابتدا بافت‌های تهیه شده با اتیل الکل با غلظت‌های ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۹۶ درصد آبگیری شده و سپس نمونه‌ها به‌منظور الکل گیری و شفاف‌سازی از محلول زایلول قرار داده شدند؛ در مرحله بعد نمونه‌ها در پارافین مایع قرار گرفته و سپس قالب گیری در پارافین صورت پذیرفت. پس از قرار دادن نمونه‌ها در یخچال و اطمینان از استحکام آن‌ها، با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌های نواری شکل با ضخامت ۰/۳ میکرون (شریف پور و همکاران،

آزمایشی از طریق آزمون آماری کروسکال والیس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. کلیه تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار آماری (SPSS 21) و رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel (2013) انجام شد.

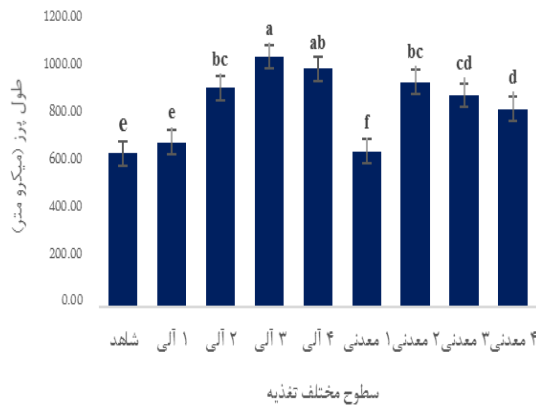
### نتایج

طی اندازه گیری طول و ضخامت پرزهای روده، عمق کریپت پرزهای روده و همچنین محاسبه سطح جذب پرزهای روده در تیمارهای مختلف به منظور تعیین تأثیر سطوح مختلف سلینیوم های آلی و معدنی در جیره غذایی بچه ماهیان انگشت قد قزل آلاهی رنگین کمان مشخص شد که با افزایش سطح سلینیوم آلی در تیمارهای آزمایشی تا سطح ۰/۴۵ میلی گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی سطح جذب پرزهای روده و طول و ضخامت آنها روندی صعودی داشته و در تیمار حاوی ۰/۶۰ میلی گرم سلینیوم آلی سطح این شاخص ها کاهش یافته و این افزایش از لحاظ آماری در مقایسه با گروه شاهد دارای اختلاف معنی داری بود ( $p < 0/05$ ). لازم به ذکر است در خصوص کاهش سطح جذب پرزهای روده در تیمار آلی ۴ در مقایسه با تیمار آلی ۳ این کاهش فاقد اختلاف معنی دار ( $p > 0/05$ ) و در خصوص طول و ضخامت پرزها این کاهش از اختلاف معنی داری برخوردار بود ( $p < 0/05$ ). بررسی تغییرات عمق کریپت پرزهای اندازه گیری شده در بافت روده نیز بیشترین تغییرات به وجود آمده را در تیمار آلی ۳ نشان داد که در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد به شکل معنی داری کاهش یافته بود ( $p < 0/05$ ). همچنین در تیمارهای آلی ۴ و معدنی ۱ نیز تغییرات عمق کریپت پرزهای روده در مقایسه با گروه

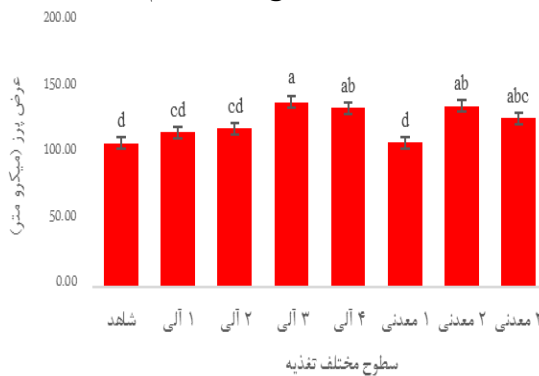
از بافت ها تهیه و روی لام منتقل شدند. سپس رنگ آمیزی لام ها با استفاده از رنگ های هماتوکسیلین - اتوزین (H&E) انجام شد (Figueiredo- Fernandes *et al.*, 2007). در پایان رنگ آمیزی، هر لام توسط یک لامل و چسب به الزام پوشیده شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین عکس برداری مورد بررسی و آسیب شناسی قرار گرفتند. به منظور اندازه گیری تغییرات طول و ضخامت پرزهای روده و همین طور عمق کریپت های پرزهای روده، در هر اسلاید ۳ میدان دید یکسان و از هر تیمار ۳ اسلاید انتخاب شد و یک میانگین برای هر کدام از موارد مذکور در هر اسلاید محاسبه گردید. به منظور بررسی سطح جذب پرزهای روده از فرمول ارائه شده توسط Sakamoto (2000) استفاده شد.

$$\text{پرز (میکرومتر مربع)} = 2\pi \times 0/2 \times \text{عرض پرز} \times \text{ارتفاع پرز} = \text{سطح جذب}$$

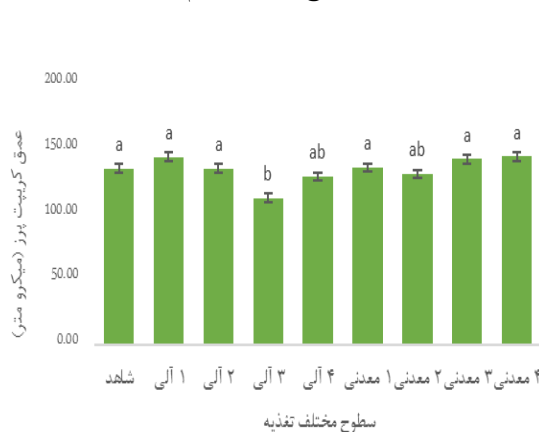
به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده های به دست آمده پس از تعیین نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون کواموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov)، برای تعیین معنی دار بودن اختلاف بین شاخص های مورد بررسی در خصوص ساختار بافتی روده در تیمارهای مختلف از طریق مسیر تحلیلی آنالیز واریانس یک طرفه (Own-Way ANOVA) مورد سنجش قرار گرفتند و در صورت مشاهده اختلاف بین داده ها از آزمون تعقیبی توکی (Tukey) جهت تعیین معنی دار بودن یا اختلاف موجود در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $p < 0/05$ ) استفاده گردید. در نهایت داده های به دست آمده به صورت مقادیر میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه گردید. به منظور بررسی آسیب شناسی بافت کبد نیز، داده های به دست آمده به صورت کیفی از تیمارهای



شکل ۲: اندازه طول پرزهای روده در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در اثر تغذیه با سطوح مختلف سلیوم‌های آلی و معدنی

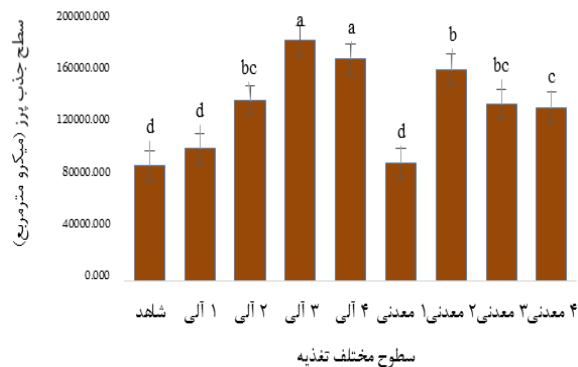


شکل ۳: اندازه ضخامت پرزهای روده در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در اثر تغذیه با سطوح مختلف سلیوم‌های آلی و معدنی



شکل ۴: اندازه عمق کریپت‌های روده در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در اثر تغذیه با سطوح مختلف سلیوم‌های آلی و معدنی

شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ( $p > 0.05$ )؛ اما بین سایر تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری در خصوص این شاخص مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). بر اساس نتایج به دست آمده بالاترین میزان سطح جذب پرزهای روده معادل ۱۸۵۷۱۵/۸ میکرومتر مربع، بیشترین طول پرزهای روده معادل ۱۰۵۳/۲ میکرومتر، بیشترین ضخامت پرزهای روده معادل ۱۴۰/۳ میکرومتر و کمترین عمق کریپت پرزهای روده معادل ۱۱۲/۷ میکرومتر در تیمار آلی ۳ مشاهده شد. در حالی که طبق نتایج به دست آمده پایین‌ترین میزان سطح جذب (۸۸۷۳۳/۴۵ میکرومتر بر مترمربع)، کمترین طول (۶۴۶/۰۱ میکرومتر) و کمترین ضخامت (۱۰۹/۳۶ میکرومتر) پرزهای روده در تیمار شاهد و بیشترین میزان عمق کریپت پرزهای روده (۱۴۴/۹۰ میکرومتر) در تیمار معدنی ۴ به دست آمد.



شکل ۱: مساحت سطح جذب پرزهای روده در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در اثر تغذیه با سطوح مختلف سلیوم‌های آلی و معدنی

مقایسه نتایج به دست آمده در خصوص تغییرات بافت‌شناسی در نمونه‌های بافت کبد بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که بچه ماهیان تغذیه شده در تیمار حاوی ۰/۴۵ میلی گرم سلیوم آلی در هر کیلوگرم جیره غذایی (تیمار آلی ۳) در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد دارای کبدی سالم‌تر و طبیعی‌تر بودند. بطوریکه در این تیمار آزمایشی هیچ‌گونه تغییرات بافتی (-) در خصوص پینکوز هسته‌ای، پرخونی (خونریزی) و نکروز سلولی در نمونه‌های بافت کبد در این بچه ماهیان دیده نشد. ضمن آنکه سلول‌های بافت کبد در برابر واکنش شدن و آتروفی نیز در این تیمار آزمایشی دارای تغییرات خفیفی (+) بودند. درحالی‌که بر اساس نتایج به دست آمده بچه ماهیان تغذیه شده در تیمارهای شاهد (فاقد هرگونه ماده افزودنی) و تیمارهای تحت تأثیر سطوح بالای سلیوم معدنی (۰/۴۵ و ۰/۶ میلی گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی) از آسیب‌های کبدی بیشتری در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی برخوردار بودند. بطوریکه در کبد بچه ماهیان تغذیه شده توسط این

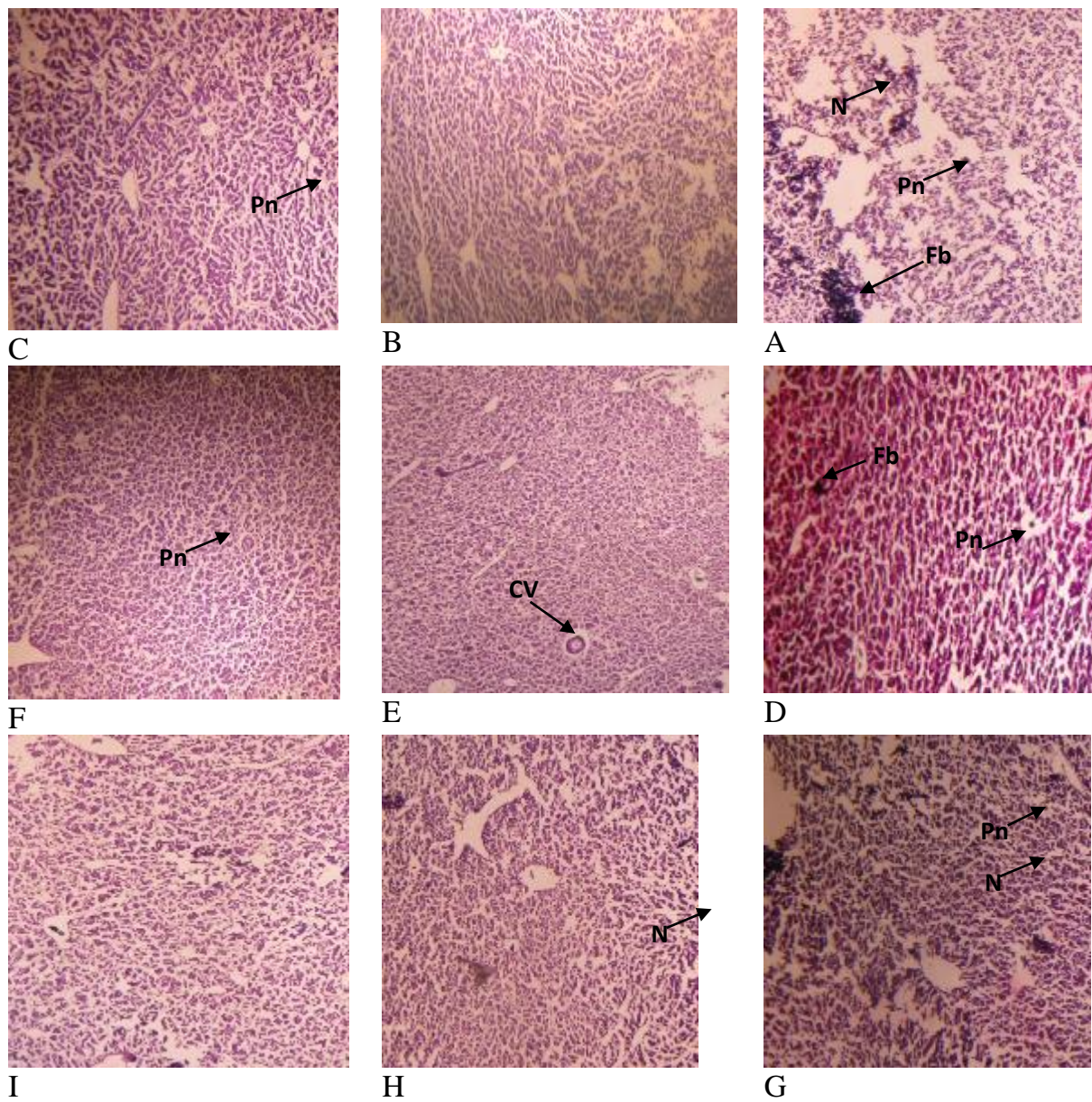
تیمارهای آزمایشی شاهد تغییرات شدیدی (+++) در خصوص واکنش شدن سلولی و همچنین تغییرات متوسطی (++) در خصوص پینکوز هسته‌ها، آتروفی و پرخونی (خونریزی) در سلول‌های کبدی بچه ماهیان در این تیمارهای آزمایشی مشاهده شد. تغییرات مربوط به نکروزه شدن سلول‌های بافتی نیز در تیمار حاوی ۰/۴۵ گرم سلیوم معدنی به شکل تغییرات متوسط (++) و در تیمار حاوی ۰/۶ میلی گرم سلیوم معدنی به شکل تغییرات خفیف مشاهده شد. ضمن آنکه در تیمار شاهد پینکوزه شدن هسته‌ای نیز به شکل تغییرات شدید (+++) مشاهده شد. این در حالی است که در تیمارهای حاوی سطوح پایین سلیوم معدنی، بخصوص در تیمار حاوی ۰/۳ میلی گرم تغییرات بافتی تحت بررسی از قبیل واکنش زایی سیتوپلاسمی، آتروفی و پرخونی عروق (خونریزی) به شکل خفیف‌تر (+) مشاهده شد و یا اینکه این تغییراتی مانند پینکوز هسته‌ای و نکروز کاملاً بدون تغییر (-) بود.

جدول ۳: خلاصه‌ای از تغییرات هیستوپاتولوژیکی کبد بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر سطوح مختلف سلیوم‌های آلی و معدنی

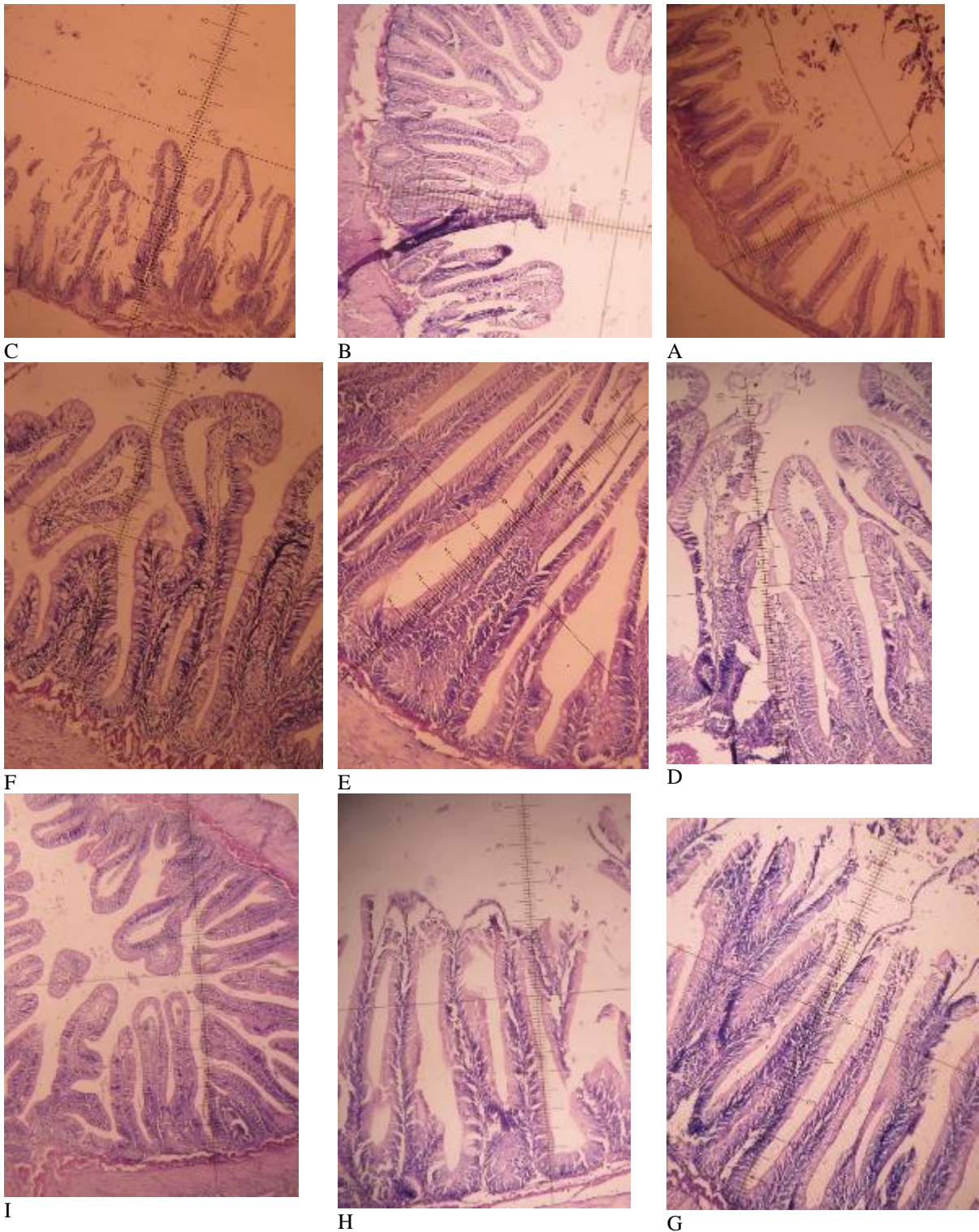
اثرات هیستوپاتولوژیکی	شاهد	آلی				معدنی			
		۱	۲	۳	۴	۱	۲	۳	۴
واکنش زایی	+++	+	-	+	+	++	+	+++	+++
سیتوپلاسمی	+++	-	+	-	+	+	-	++	++
پینکوز هسته	++	+	++	+	+++	++	+	++	++
آتروفی	++	+	++	+	++	++	+	++	++
پرخونی (خونریزی)	++	+	++	-	++	++	+	++	++
نکروز سلولی	++	-	++	-	++	++	-	++	+

گرفته شد. تجمع نوتروفیل‌ها در مناطقی که سلول‌های کبدی از بین رفته و لیز هیاتوسیت اتفاق افتاده بود، به‌عنوان نکروز کانونی هیاتوسیت تعریف شد. نکروز کانونی، نکروز منتشر، آپوپتوز، هیپرپلازی سلول‌های کوپفر، اتساع سینوزوئیدها و پرخونی در صورت وجود با علامت + یا عدم وجود با علامت - مشخص شدند.

نحوه امتیازدهی به این تغییرات نیز به این ترتیب بود که در صورت عدم مشاهده تغییرات در نظم ساختار کبد با علامت منفی (-)، وجود اختلال به‌صورت کانونی در نظم و ساختار لبول‌های کبد به‌صورت خفیف و با علامت (+)، درگیری ۵۰ درصد از لبول‌ها و توبول‌های کبد متوسط به‌صورت +۲ و در صورت عدم تشخیص ساختار منظم کبد و کلیه شدید با علامت +۳ گزارش شدند. عدم مشاهده مجاری با ساختارهای سلول‌های اپی‌تلیال مکعبی هیپرپلاستیک با علامت (-) و مشاهده سه مجرای صفراوی در هر تریاد به‌صورت (+)، چهار یا پنج مجرا به همراه بافت همبند در هر تریاد با علامت (+۲) و بیش از پنج مجرای صفراوی در هر تریاد به‌صورت (+۳) تشخیص داده شدند. عدم نکروز قطعه‌ای در اطراف ناحیه پورتال و توبول‌های نزدیک گلومرولی به شکل (-)، نکروز قطعه قطعه ای خفیف به‌صورت (+)، درگیر شدن کمتر از ۵۰ درصد هیاتوسیت‌ها در اطراف پورتال تراکت و لوله‌های خمیده نزدیک و دور ناحیه کورتکس متوسط با علامت (+۲) و درگیر شدن بیش از ۵۰ درصد هیاتوسیت‌ها در اطراف پورتال تراکت و توبول‌های ناحیه کورتکس به‌صورت (+۳) در نظر گرفته شد. عدم مشاهده فیروز در ناحیه پورتال به‌صورت (-)، گسترش پورتال فیروزی خفیف به‌صورت، پل فیروزی متوسط با علامت (+۲) و سیروز شدید به‌صورت (+۳) در نظر



شکل ۵: اثرات آسیب‌شناسی بافت کبد در غلظت‌های متفاوت سلنیوم‌های آلی و معدنی در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان. (A) تیمار شاهد، (B) تیمار آلی (C، ۱) تیمار آلی ۲، (D) تیمار آلی ۳، (E) تیمار آلی ۴، (F) تیمار معدنی ۱، (G) تیمار معدنی ۲، (H) تیمار معدنی ۳، (I) تیمار معدنی ۴. Pn: پیکنوز شده هسته‌ای، N: نکروزه شدن، CV: واکونله شدن سیتوپلاسم، Fb: پرخونی



شکل ۶: بررسی بافت شناسی روده در استفاده از سطوح مختلف سلیوم‌های آلی و معدنی در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان. (A) تیمار شاهد (B) تیمار آلی ۱، (C) تیمار آلی ۲، (D) تیمار آلی ۳، (E) تیمار آلی ۴، (F) تیمار معدنی ۱، (G) تیمار معدنی ۲، (H) تیمار معدنی ۳، (I) تیمار معدنی ۴.

## بحث

کبد و روده، مهم‌ترین ارگان‌ها برای هضم و جذب مواد مغذی موجود در خوراک آبزیان هستند، بنابراین بررسی‌های بافت‌شناسی این دو عضو برای ارزیابی تأثیرات استفاده از مواد محرک ایمنی که به روش خوراکی تجویز می‌شوند روش انتخابی مناسبی می‌باشد (Raskovic et al., 2011). با توجه به نقش بسیار مهم که پرزهای روده در امر گوارش و همچنین نقش کبد در اعمال مختلف مرتبط با متابولیسم و نقش این اندام پروسه‌هایی مثل نقل و انتقالات زیستی و حساسیت بالای آن در بروز صدمات ناشی از مواد شیمیایی نسبت به آلودگی‌های مختلف و شناسایی آن به عنوان اندامی جهت بررسی تأثیر محرک‌های محیطی بر موجودات مختلف علم بافت‌شناسی این اندام‌ها در ماهیان دارای اهمیت بالایی می‌باشد (Ramezani-Fard et al., 2011؛ رضوانی و همکاران، ۱۳۸۵). با توجه به این ذکر شده، نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر در خصوص تأثیر استفاده از سطوح مختلف سلنیوم‌های آلی و معدنی در جیره‌های غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در ارتباط با تأثیر این مواد بر تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت کبد نشان داد که استفاده از سلنیوم آلی در مقایسه با سلنیوم معدنی بخصوص در تیمار حاوی ۰/۴۵ میلی‌گرم سلنیوم آلی در هر کیلوگرم جیره غذایی دارای تأثیرات به مراتب بهتری در مقایسه با سایر تیمارهای تحت بررسی در بافت کبد بوده و ضایعه قابل توجهی در این تیمار آزمایشی در بافت کبد مشاهده نشد. فقط در برخی موارد مختصری افزایش واکنش‌ها و آتروفی جزئی در این تیمار آزمایشی مشاهده شد. طبق تحقیقات انجام‌شده در این زمینه مشخص شده که آسیب‌های

بافتی حاصل در کبد ماهی‌ها در مزارع پرورش ماهی بیشتر شامل تغییر در شکل هسته، پیکنوز و نکروز، واکنش‌ها شدن، مرز نشینی هسته هپاتوسیت‌ها و پرخونی رگ‌های کبد بود که در تیمارهایی که سلنیوم معدنی نسبت به آلی استفاده کرده بودند و همچنین گروه شاهد بیشتر بود. آسیب‌های وارد شده به کبد همچنین منجر به دژنراسیون و نکروز برخی سلول‌ها و تجمع کانونی سلول‌های آماسی در کبد می‌شود (Zamani et al., 2015). در تائید این موارد در مطالعه حاضر نیز تمام تغییرات آسیب‌شناسی بافتی در کبد بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان شامل پیکنوز هسته‌ای، آتروفی، پرخونی، نکروز و علی‌الخصوص واکنش‌ها شدن سلول‌های بافت کبد در تیمارهای شاهد و استفاده از سطوح بالای سلنیوم معدنی به صورت تقریباً مشابه مشاهده شد. در صورتی که در تیمارهای تغذیه‌شده با سلنیوم آلی بخصوص در سطوح بالا تغییرات آسیب‌شناسی مدنظر به حداقل مقدار ممکن رسید و یا این تغییرات اصلاً مشاهده نشد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده این موضوع را می‌توان این‌چنین توجیه کرد که با توجه به نقش تصفیه‌کنندگی کبد استفاده از مقدار ۰/۴۵ میلی‌گرم سلنیوم آلی در هر کیلوگرم جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث کارایی بهتر این اندام در این غلظت و در نتیجه میزان آسیب‌دیدگی کمتر بافتی در این اندام می‌گردد. همسو با این نتایج پورمقیم و همکاران (۱۳۹۵) نیز با بررسی تأثیر جیره‌های غذایی مکمل سازی شده با مقدار ۱٪ پودر عصاره گیاه صبر زرد (*Aloe vera*) در جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان فقط شاهد افزایش خفیف توسعه مراکز ملانوماکروفازی در ماهیان تغذیه شده با گیاه صبر زرد بودند. این محققین

مورفولوژی پرزهای روده در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان داشته، درحالی‌که نوع معدنی آن به علت عدم تجزیه و انباشت موجب ایجاد اثرات نامطلوب بر سلول‌های آنتروسیست روده گردیده است ( Olsen *et al.*, 2001). افزایش سلیوم می‌تواند باعث جذب اسیدهای چرب امگا-۳ در مقایسه با اسیدهای چرب امگا-۶ از طریق اپیتلیوم روده سبب شده که این امر و یک منبع انرژی مهم برای میزبان تلقی شده باعث تقویت آنتروسیست‌های روده از طریق تامین منابع انرژی مورد نیاز سلول‌ها بشود (Kralik *et al.*, 2013). در توجیه این موارد نتایج مطالعه حاضر نیز در خصوص تأثیر استفاده از سطوح مختلف سلیوم‌های آلی و معدنی در جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بر روی تغییرات مورفولوژی بافت روده نشان داد که استفاده از مقدار ۰/۳ گرم سلیوم آلی در هر کیلوگرم جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقایسه با سایر تیمارهای تحت بررسی و تیمار شاهد به شکل معنی‌داری باعث سطح جذب پرزهای روده، طول پرز روده، عرض پرزهای روده و کاهش عمق کریپت پرزهای روده می‌گردد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی در خصوص نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر می‌توان این‌چنین بیان داشت که استفاده از سطوح مختلف سلیوم‌های آلی و معدنی در جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بخصوص مقدار ۰/۴۵ میلی‌گرم سلیوم آلی در هر کیلوگرم جیره غذایی می‌تواند علاوه بر ارتقاء شاخص‌های مرتبط با رشد و توسعه دستگاه گوارش از طریق بهبود تغییرات مورفولوژیک بافت روده به لحاظ افزایش سطح جذب، طول و ضخامت پرزهای روده و همچنین کاهش عمق کریپت پرزهای روده، باعث

دلیل این موضوع را به‌عنوان یک عارضه پاتولوژیک مطرح نکرده و توسعه خفیف مراکز ملانوماکروفاژی را به واکنش طبیعی این بافت در برابر عوامل خارجی تحریک‌کننده نسبت دادند. همچنین مشکینی و همکاران (۱۳۹۴) نیز در مطالعه خود با بررسی تأثیر استفاده از محرک ایمنی لوامیزول به‌عنوان یک داروی ضد کرم در جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی حاصل از مصرف این دارو در بافت کبد گزارش دادند که استفاده از این محرک ایمنی در سطوح بالا باعث ایجاد بیشترین شدت صدمات بافت کبدی در بچه ماهیان قزل‌آلای می‌گردد.

محققین تأثیر نوع تغذیه ( Ramezani-Fard *et al.*, 2011)

ترکیب مواد غذایی (Mai *et al.*, 2005) و ساختار ژنتیکی (Ming-Yih *et al.*, 2005) را برای شکل‌گیری پرزهای روده از لحاظ ارتفاع و ضخامت آن برای هرگونه از ماهی منحصربه‌فرد دانسته‌اند. در همین ارتباط، با توجه به اینکه در مطالعه حاضر بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف توسط جیره‌های غذایی حاوی سطوح تقریباً یکسان پروتئین تغذیه‌شده بودند و نوع غذاهای نیز در تمام تیمارها یکسان بود، بنابراین بهبود سطح جذب، طول، ضخامت و عمق کریپت پرزهای روده را در تیمارهای حاوی ۰/۴۵ میلی‌گرم سلیوم آلی را احتمالاً می‌توان به استفاده از این ماده در جیره غذایی بچه ماهیان نسبت داد. در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده در خصوص تأثیر استفاده از جیره‌های غذایی مکمل‌سازی شده توسط سطوح مختلف سلیوم‌های آلی و معدنی به نظر می‌رسد نوع سلیوم آلی اثرات بهتری بر جمعیت میکروارگانیزم‌های مفید دستگاه گوارش و یا

۳. رضوانی گیل کلایی، س.، شریف پور، ع.، کاظمی، ر.، ۱۳۸۵. بررسی آثار هیستوپاتولوژیک ناشی از برخی عوامل زیست محیطی دریای خزر بر روی ماهیان استخوانی شکارچی (ماهی آزاد و ماهی سوف دریای خزر). موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۵۰ صفحه.

۴. زارعی، ا.، ۱۳۹۱. خلاصه آزمایش‌های اصول تغذیه دام، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی. ۹۵ صفحه.

۵. شریف پور، ع.، حلاجیان، ع.، کاظمی، ر.ا.، ۱۳۹۳. روش‌های آزمایشگاهی بافت‌شناسی آبرزیان. انتشارات موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۳۴۷ صفحه.

۶. محسنی، م.، ستوده، ا.م.، ۱۳۹۳. اثر سطوح مختلف سلنیوم جیره غذایی بر روند رشد و استرس اکسیداتیو بچه فیل ماهی پرورشی (*Huso huso*) تغذیه شده با سطوح بالای مس، مجله علمی شیلات ایران، ۲۱ (۴)، ۱۰۵-۱۱۴.

۷. مشکینی، س.، تهرانی، ع.ا.، آق، ن.، ۱۳۹۴. اثر لوامیزول بر پاسخ ایمنی و تغییرات هیستوپاتولوژیکی در تراکم بالای ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران، دوره ۹، شماره ۱، ۱۳-۳.

۸. وثوقی، غ.، مستجیر، ب. ۱۳۸۱. ماهیان آب شیرین. دانشگاه تهران، تهران، ۳۱۷.

9. AOAC (Association of Official Analytical Chemists)., 1990. Official method of analysis AOAC, Washington DC, USA, 1263 P.

کاهش بروز اثرات محتمل هیستوپاتولوژیک نیز در بافت کبد به‌عنوان اندام اصلی دفع‌کننده سموم و آلودگی‌های مختلف در بدن شود که این موارد در نهایت منجر به افزایش توانایی دستگاه گوارش در بهره‌برداری بهتر در هضم و جذب مواد مغذی و سلامت عمومی ماهیان خواهد گردید و از این طریق میتوان به افزایش تولید در واحد سطح در مزارع پرورش ماهی به‌عنوان هدف نهایی صنعت آبرزی پروری تا حدودی دست یافت.

### سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

### منابع

۱. پورمقیم، ح.، حقیقی، م.، شریف روحانی، م.، ۱۳۹۵. بررسی آسیب‌شناسی بافتی کبد، کلیه، روده و آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با غذای حاوی 1% پودر عصاره گیاه صبر زرد (*Aloe vera*). پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، ۱۳ (۲)، ۱۸۹۸-۱۸۹۱.

۲. حبیب‌اللهی، ر.، ۱۳۸۹. تأثیر پروبیوتیک پریمالاک بر شاخص‌های رشد، بقاء و برخی شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۵۳ صفحه.

- selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Nutrition, 110, 2527–2535.
20. Jafari, M., Kamarudin, M.S., Saad, C.R., 2009. Development of morphology in hatchery-reared *Rutilus frisii kutum* Larvae. European Journal of Scientific Research, 38(2), 296-305.
  21. Jaramillo, F., Gatlin, D., 2004. Comparison of Purified and Practical Diets Supplemented with or without  $\beta$ -Glucan and Selenium on Resistance of Hybrid Striped Bass *Morone chrysops*♀ $\times$  *M. saxatilis*♂ to Streptococcus iniae Infection. Journal of the World Aquaculture Society, 35(2), 245-252.
  22. Kim, K. W., Wang, X., Choi, S. M., Park, G. J., Koo, J. W., Bai, S. C., 2003. No synergistic effects by the dietary supplementation of ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopheryl acetate and selenium on the growth performance and challenge test of *Edwardsiella tarda* in fingerling Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture Research, 34(12), 1053-1058.
  23. Kralik, Z., Kralik, G., Biazik, E., Strakova, E., Suchy, P., 2013. Effects of organic selenium in broiler feed on the content of selenium and fatty acid profile in lipids of thigh muscle tissue. Acta Veterinaria Brno, 82, 277–282.
  24. Le, K.T., Fotedar, R., 2013. Dietary selenium requirement of yellowtail kingfish (*Seriloa lalandi*). Journal of Agricultural Science, 4, 68–75.
  25. Lin, Y.H., 2014. Effects of dietary organic and inorganic selenium on the growth, selenium concentration and meat quality of juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture. 430: 114–119.
  26. Lin, Y.H.A., Shiau, S.Y., 2005. Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture, 250, 356–363.
  27. Liu, M., Guo, W., Wu, F., Qu, Q., Tan, Q., Gong, W., 2017. Dietary supplementation of sodium butyrate may benefit growth performance and intestinal function in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Aquaculture Research, 48(8), 4102-4111.
  10. Ashouri, S., Keyvanshokoh, S., Salati, A. P., Johari, S. A., Pasha-Zanoosi, H., 2015. Effects of different levels of dietary selenium nanoparticles on growth performance, muscle composition, blood biochemical profiles and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, 441, 25-29.
  11. Burk, R.F., 1976. Selenium in man. In: Prasad, A.S. (Ed.), Trace Elements in Human Health and Disease. Academic Press, London, pp. 105–134.
  12. Cahu, C.L., Gisbert, E., Villeneuve, L.A.N., Morais, S., Hamza, N., World, P.A., Zambonino Infante, J., 2009. Influence of dietary phospholipids on early ontogenesis of fish. Aquaculture Research, 40, 989-999.
  13. Camargo, M.P., Martinez, B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in urban stream. Neotropical Ichthyology, 5(3), 327-336.
  14. Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A., 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. Pesquisa Veterinária Brasileira, 27(3), 103-109.
  15. Ganji, F. K., Arvand, M., 2002. Histology practical. University of Medical Sciences and Health Services Mashhad. ISBN 7 - 08 - 5627 - 964, p15-19.
  16. Gatlin, D.M., Wilson, R.P., 1984. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. Journal of nutrition, 114, 627–633.
  17. Ghobadi, Sh., Matinfar, A., Nezami, Sh. A., Soltani, M., 2009. Influence of supplementary enzymes Avizyme on fish meal replacement by soybean meal and its effects on growth performance and survival rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Azadshahr Journal of Fisheries, 3(2), 11-22.
  18. Gibson, G.R., Roberfroid, M. B., 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition, 125, 1401-1412.
  19. Hilton, J.W., Hodson, P.V., Slinger, S.J., 1980. The requirement and toxicity of

- Bleeker. Journal of Applied Ichthyology, 27, 920-927.
36. Rašković, A., stilinovic, N., kolarovic, J., vasovic, V., vukmirovic, S., mikov, M., 2011. The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Molecules*, 16(10), 8601-8613.
37. Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G., 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179(4073), 585-590.
38. Stopskopf, M., 1993. Clinical pathology, In Fish medicine, Edited by M Stopskopf WB, Saunders Company, Philadelphia, USA, pp.113-131.
39. Sukhoverkhov, F.M., 2006. The effect of cobalt, vitamin, tissue preparations and antibiotics on carp. <http://www.FAO.com>.
40. Sunde, R.A., 1984. The biochemistry of selenoproteins. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 61, 1891-1900.
41. Vicenitini, C.A., franceschini, I.B., Vincentini, I.B., Bombonato, M.T.S., 2005. Morphological study of the liver in the Teleost oreochromis niloticus. *International journal of Morphology*, 23, 211-216.
42. Zamani, N., Naghsh, N., Fathpour, H., 2015. Comparing poisonous effects of thioacetamide and silver nanoparticles on enzymic changes and liver tissue in Syrian mice. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(2), 54-7.
43. Zhou, X., Wang, Y., Gu, Q., Li, W., 2009. Effects of different dietary selenium sources (selenium nanoparticle and selenomethionine) on growth performance, muscle composition and glutathione peroxidase enzyme activity of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquaculture*, 291(1), 78-
28. Lorentzen, M., Maage, A., Julshamn, K., 1994. Effects of dietary selenite or selenomethionine on tissue selenium levels of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 121(4), 359-367.
29. Mai, K., Yu, H., Duan, Q., Gisbert, E., Zambonino, J.L., Cahu, C., 2005. A histological study on the development of the digestive system of *Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology*, 67(4), 1094-1106.
30. Ming-Yih, L.O., Chyng-Hwa, L., Lee-Shing, F., 2005. Embryonic and larval development of the Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus* (Pisces: Serranidae). *Journal of Marine Biology*, 85, 1249-1254.
31. Misra, S. and Niyogi, S. 2009. Selenite causes cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes by inducing oxidative stress. *Toxicology in Vitro*. 23: 1249-1258.
32. Olsen, R.E., Mykle bust, R., Kryvi, H., Mayhew, T.M., Ringo, E., 2001. Damaging effect of dietary inulin on intestinal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture Research*, 32, 931-934.
33. Ozden, H., Bildirici, K., Ustuner, D., Ustuner, C., Cengiz, B.P., Tulay, A., 2005. Histopathologic examination of rat liver after experimental application of fluoxetine. *Turkish Journal of Ecopathol*, 11(1), 9-15.
34. Pesti, G.M., Miller, B.R., Hargrave, J., 1992. User-Friendly Feed Formulation, Done Again (UFFDA). Programed by J. Hargrave. University of Georgia, USA.
35. Ramezani-Fard, E., Kamarudin, M.S., Harmin, S.A., Saad, C.R., AbdSatar, M.K., Daud, S.K., 2011. Ontogenic development of the mouth and digestive tract in larval *Malaysian mahseer*, *Tor tambroides*