نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۴ بهار ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.107809

بررسی تاثیر افزودن خوراکی ویتامین C بر عملکرد بیوشیمیایی سرمی کبد در ماهی قزل آلای رنگین کمان قبل از رسیدن به مرحله پرواربندی

• **فاطمه دارابی تبار (نویسنده مسئول)**
کارشناسی ارشد، دانشکده شیلات و محیط زیست،
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
• **سید علی اکبر هدایتی**
دانشیار دانشکده شیلات و محیط زیست،
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
• **امیرپرویز سلاطی**
استادیار دانشکده منابع طبیعی دریا،
دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
• **سید حسین حسینی فر**
استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست،
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
تاریخ دریافت: ۱۸-۱۱-۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۰۳-۰۳-۱۳۹۵
Email: Darabitabar@gmail.com

چکیده

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از مهم‌ترین گونه‌های آزاد ماهیان با ارزش اقتصادی بالا برای پرورش جهانی بوده و بخش بزرگی از میزان تولید آبزیان را به خود اختصاص می‌دهد و حضور پررنگی در زنجیره غذایی دارد. لذا در این تحقیق به بررسی عملکرد فعالیت آنزیم‌های کبدی این ماهی در مواجهه با غلظت‌های مختلف ویتامین C پرداخته شد. تعداد ۷۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزن ۱۰ ±۱۷۰ گرم، در تانک‌های ۷۰ لیتری قرار گرفتند. برای این مطالعه سه تیمار در نظر گرفته شد که شامل (شاهد، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم واحد غذا) بود. پس از قرارگیری ماهیان در معرض غلظت‌های مختلف ویتامین C در طی روزهای پنجم و دهم به‌منظور تهیه سرم، نمونه‌های خون ماهیان استحصال گردید. در روز دهم فعالیت آنزیم ALP در گروه‌های تیمار ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در روزهای پنجم و دهم فعالیت آنزیم ALT در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). روز پنجم در فعالیت آنزیم‌های ACP و AST در گروه‌های تیمار ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به‌هم اختلاف معناداری مشاهده شد (P<۰/۰۵) و هر دو نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). در روز دهم فعالیت آنزیم AST در تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین C در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان توانایی تاثیر بر بهبود عملکرد آنزیم ALT را دارد.

کلمات کلیدی: ویتامین C، پرورش ماهی، ماهی قزل آلای رنگین کمان، بهبود عملکرد آنزیمی

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 154-162

The effect of diets containing vitamin C on liver serum biochemical function in rainbow trout before fattening Point

By: Darabitabar, F., (Corresponding Author) Msc, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Hedayati, S. A. K., Associate Professor, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Salati, A. P., Assistant Professor, Khorramshahr Department of Fisheries, University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. Hosseinifar, S.H., Assistant Professor, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Email: Darabitabar@gmail.com

Received: 2016-02-07 Accepted: 2016-05-23

Rainbow trout is one of the main species of Salmonidae family. With high economic value and demand, large part of the aquaculture production has been allocated to this species. Therefore, study on diets that affect the feeding and growth can be a helpful way to improve trout culture. Seventy rainbow trout with an average weight of 170 ± 10 g were placed in 70-liters containers. Three treatments were considered for this study, including (0 (control), 400 and 800 mg/kg food). After fish were fed through different concentrations of vitamin C on days 5 and 10, fish were sampled for blood serum analysis. ALP activity in 400 and 800 mg/kg vitamin C groups on day 10 showed a statistically significant increase compared to control group (P<0/05). On days 5 and 10, ALT activity at 400 mg/kg vitamin C decreased significantly compared to control (P <0/05). On the fifth day, AST and ACP enzyme activity showed a significant difference (P<0/05) between the groups of 400 and 800 mg/kg vitamin C, it significantly increased compared to control (P<0/05). On day 10, AST enzyme activity showed a significant increase in 800 mg/kg vitamin C group compared to the other treatments (P<0/05). Overall, it can be concluded that 400 mg/kg vitamin C in the diet of rainbow trout has the ability to impact on the performance of ALT enzyme.

Key words: Vitamin C, Aquaculture, Rainbow trout, Improvement of enzymatic function

مقدمه

اسید آسکوربیک یا ویتامین C به‌عنوان یکی از ضروری‌ترین مواد مغذی است، که در ماهیان نقش بسیار مهمی را در تشکیل کلاژن، برای بافت‌های پیوندی شامل غضروف، استخوان و پوست ایفا می‌کند و بر روی شاخص‌های ایمنی نقش بسیار مهمی دارد (۶). ماهی قزل آلای رنگین‌کمان از نوع ماهیان سردآبی است و در زیرگروه ماهیان آزاد جای می‌گیرد. قزل آلای رنگین-کمان متعلق به آب‌های سرد و شفاف، بستر سنگی، سنگلاخی و شنی است. این ماهی در شرایط طبیعی در رودخانه‌ها و دریاچه‌های سرد و خنک زیست می‌کند (۲۷). اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی به‌طور عمده در تشخیص وضعیت فیزیولوژی ماهی و تعیین حالت عمومی سلامتی ماهی استفاده می‌شود. از جمله فاکتورهای بیوشیمیایی مهم، آنزیم‌های کبدی ALT (آلانین آمینو ترانسفراز)، AST (اسپاراتات آمینو ترانسفراز)، ACP (اسید فسفاتاز) و ALP (آلکالین فسفاتاز) هستند، که از سنجش آن‌ها به‌عنوان یک شاخص آزمایشگاهی استاندارد جهت بررسی اختلالات کبدی در موجودات استفاده می‌شود (۲۳). دو آنزیم AST و ALP در هنگام ضایعه از بافت‌های مختلف از جمله عضلات، استخوان و قلب خارج می‌شوند. به‌عبارتی افزایش معنادار این دو آنزیم ممکن است در نتیجه نشت از بافت‌های مختلف و جمع اثر آن‌ها باشد (۳۳). به‌علت این‌که آنزیم ALT در سیتوپلاسم سلول‌های کبدی زیاد است و هنگام آسیب از غشای سلولی عبور می‌کند و وارد خون می‌شود، این آنزیم به عنوان شناساگر اختصاصی آسیب کبدی شناخته شده است (۳۳). آلکالین فسفاتاز نیز به‌طور عمده از کبد سرچشمه می‌گیرد و مقدار آن در بیماری‌های مجاری کبدی، صفراوی و گسترش ضایعات کبدی افزایش می‌یابد (۱۲). آنزیم ALP موجود در کبد نقش مهمی در متابولیسم گلیکوژن ایفا می‌کند و می‌تواند آنزیم‌های فسفوریلاز را غیر فعال نماید و سنتز گلیکوژن را در کبد تحریک نماید (۲۶). تحریک و افزایش تولید این آنزیم در کبد با تجزیه گلیکوژن جهت تامین انرژی مورد نیاز تحت شرایط استرس‌زا در ارتباط بوده و هم‌چنین سبب کاهش نرخ فسفوریلاسیون شده و از فسفوریلاسیون اکسیداتیو در زنجیره تنفسی جلوگیری می‌نماید (۲۶). مطالعات نشان می‌دهند که اکثر ماهیان استخوانی به‌دلیل عدم وجود آنزیمی تحت عنوان ال- گلونولاکتون

اکسیداز قادر به سنتز ویتامین C از ال-گلوکز نبوده و لذا ضروری است که مقدار مورد نیاز این ویتامین از راه تغذیه خارجی تامین شود (۲۵). ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نیز از ماهیان استخوانی است که قادر به سنتز این آنزیم نبوده و باید این ویتامین را از راه تغذیه به ماهی داده شود. لذا با توجه به یکی از ویژگی‌های ویتامین C مبنی بر افزایش ایمنی و بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی خون، مطالعه مذکور با هدف بررسی تاثیر مقادیر مختلف ویتامین C بر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرمی کبد انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

در فروردین ماه ۱۳۹۴، تعداد ۷۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزن ۱۰ ± ۱۷۰ گرم (به‌منظور ارزیابی اثر ویتامین بر روی ماهیان قبل از رسیدن به مرحله پرواری) از مرکز ماهی‌سرای کهر با نام تجاری اکسیر سلامت واقع در شهرستان کرج خریداری شد. سپس ماهیان به آزمایشگاه تکثیر و پرورش دانشگاه تهران منتقل شدند. در آزمایشگاه به‌منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، ماهی‌ها در تانک‌های ۷۰ لیتری که قبل از شروع آزمایش به‌وسیله پرمنگنات پتاسیم و آب‌نمک غلیظ ۷۰ درصد کاملاً شسته شده تا محیط عاری از هر گونه آلودگی و بیماری، و برای ماهیان مناسب باشد، قرار گرفتند. این مخازن حاوی آب کلرزدایی شده با دمای ۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد بودند. که به‌صورت ۲۴ ساعته هوادهی می‌شدند. ماهیان در دوره نوری ۱۳ ساعت تاریکی و ۱۱ ساعت روشنایی به‌مدت یک هفته نگهداری شدند، تا به شرایط آزمایشگاه سازگار شوند. در دوره سازگاری دوبار غذادهی انجام شد. طی این دوره ماهی‌ها با غذای تجاری به میزان ۲ درصد وزن بدن در روز تغذیه شدند و آب تانک‌های نگهداری ماهی‌ها هر ۲۴ ساعت یک‌بار تعویض شد (۴). فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده در کارگاه شامل دما ۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ با دستگاه قابل حمل سنجش پی‌اچ (مدل تی اس، ساخت کشور تایوان)، ۷/۲±۰/۴ و اکسیژن محلول با دستگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن) مدل دی او – ۵۵۱۰، ساخت کشور تایوان)، ۶/۷۴±۰/۲ و سختی آب ۱۶±۱۸۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور روزانه اندازه‌گیری شدند. به‌منظور بررسی اثرات ویتامین C بر میزان تغییرات در پارامترهای موردنظر، دو سطح ویتامین C افزودنی به غذا (۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا) (۱۷، ۲۲ و ۲۸) اعمال شد. پس از اتمام دوره تطابق، ۵۴ قطعه ماهی در نه گروه آزمایشی (هر گروه ۶ قطعه) و هر تیمار با سه تکرار تقسیم شدند. به‌طوری که گروه‌های موردنظر عبارت بودند از (غذای معمولی× بدون ویتامین، ۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین C در غذا و ۸۰۰ میلی‌گرم ویتامین C در غذا). ویتامین C از نوع ال- اسکوربیل ۲- پلی فسفات متعلق به شرکت ACROS، ساخت کشور آمریکا با درصد خلوص ۹۹ درصد از تهران خریداری شد. پلت‌های تجاری از شرکت فرادانه براساس GFT برای رشد ماهی تهیه شد. نوع و ترکیب جیره تجاری مصرفی (تولیدی کارخانه تولید خوراک دام و آبزیان فرادانه) شامل ۴۵ درصد پروتئین خام، ۱۵ درصد چربی، ۱۵ درصد کربوهیدرات، ۱۳ درصد خاکستر، ۴ درصد فیبر، ۱ درصد فسفر و ۱۱ درصد رطوبت بود. به‌منظور ترکیب ویتامین C با پلت‌ها، ابتدا ویتامین C در ۱۰ سی سی آب حل شد. به‌منظور جدا نشدن ویتامین C از پلت‌ها، مقداری روغن کانولا به محلول آب و ویتامین C اضافه شد و سپس توسط آب‌پاش به‌روی پلت‌ها اسپری شد. پلت‌های آغشته شده به روغن کانولا به تمام تیمارها داده شد. روش مخلوط کردن جیره با ویتامین براساس روش روغن پوش‌سازی (Oil coating) بود (۳۵). سپس پلت‌های آغشته شده در دو نوبت صبح و بعدازظهر به ماهیان داده شد.

در روزهای پنجم و دهم پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف ویتامین C، جهت حصول نمونه‌های خون به‌منظور بررسی پارامترهای آنزیمی از ماهیان در گروه‌های آزمایشی نمونه‌برداری به‌عمل آمد. سپس نمونه‌ها برای آنالیز به آزمایشگاه کاو منتقل شدند. جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی، ابتدا ماهیان به‌صورت تصادفی با ساچوک برداشته شدند و در داخل تشت پلاستیکی ۵ لیتری که حاوی ۲۰۰ واحد در میلیونپودر بیهوش کننده گل میخک بود، بیهوش شدند و سپس از ماهیان نمونه خون گرفته شد. برای تهیه سرم به‌منظور اندازه‌گیری آنزیم‌های سرمی ACP، ALP، ALT و AST، دو تا سه سی سی خون به داخل ویال‌های بدون انعقاد ریخته و در داخل سانتریفیوژ، ۴۰۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار شد تا سرم خون تهیه شود (۳۶). سپس سرم خون در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر برای انتقال به آزمایشگاه نگه‌داری شد (۲۰). شاخص‌های آنزیمی کبد با استفاده از دستگاه الایزا (الایزا ریدر، مدل ۸۰۰ ELX)، ساخت کشور آمریکا براساس دستورالعمل شرکت سازنده دستگاه و با استفاده از کیت‌های مخصوص خریداری شده از شرکت من ساخت کشور ایران اندازه‌گیری شد. مقادیر ALT و AST توسط روش IFFC (فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) و ALP به‌روش DGKC (استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان) استفاده شد (۳۱).

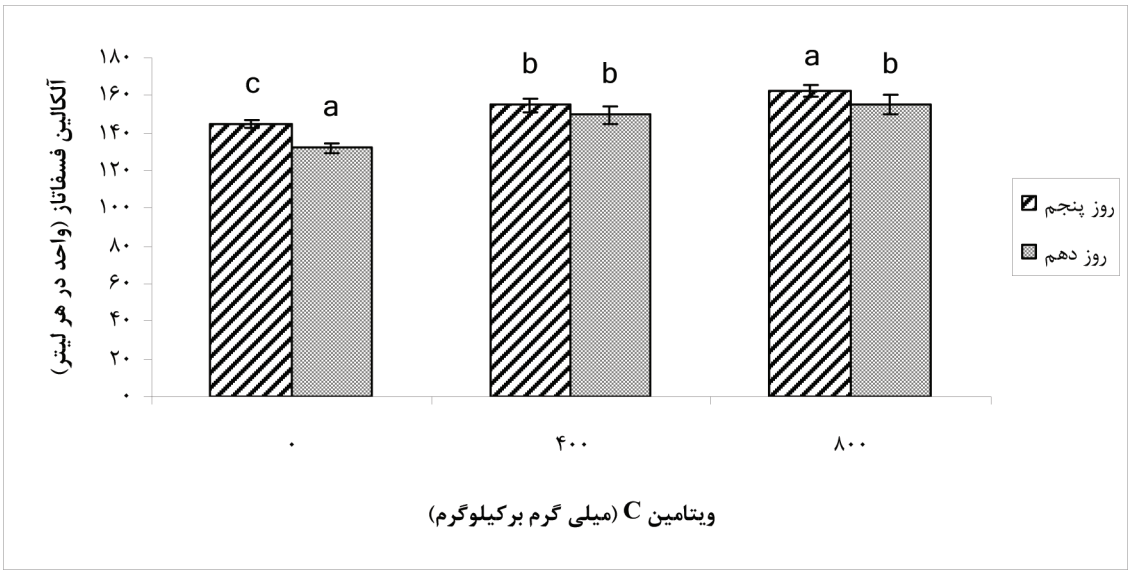
برای آنالیز اطلاعات تحقیق از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ استفاده گردید. پس از محاسبه نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگراف- اسمیروف ابتدا اثر متقابل زمان و گروه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و با توجه به عدم تاثیر متقابل این دو فاکتور، از تجزیه واریانس یکطرفه (ANOVA) برای بررسی تفاوت میانگین تیمارهای مختلف ویتامین C استفاده گردید. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از تست تکمیلی Duncan در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد (۱۳).

نتایج

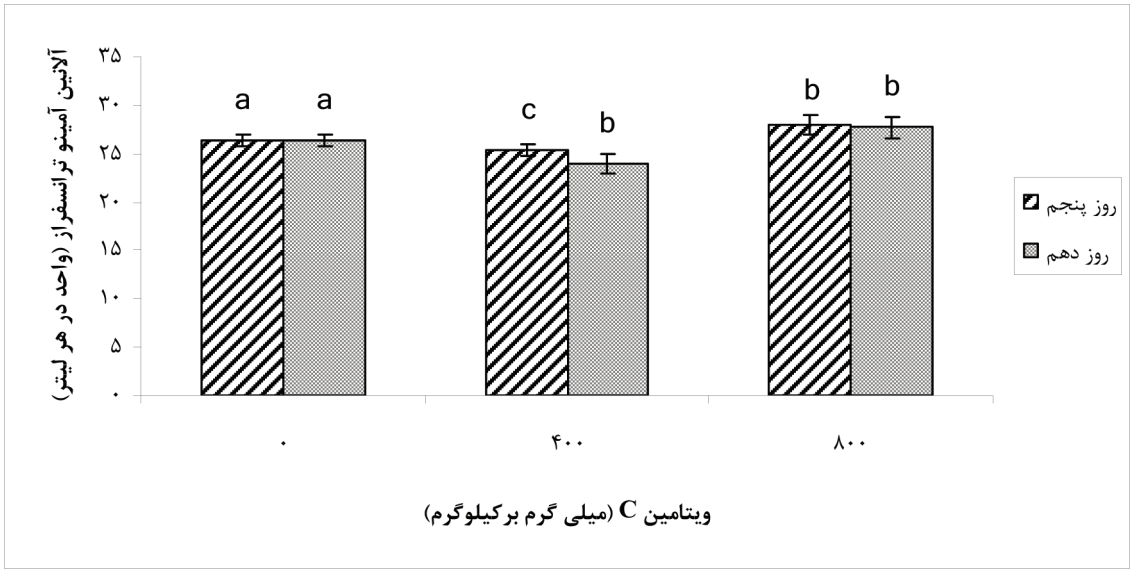
طبق بررسی نتایج آماری آنزیم‌های کبدی، هیچ گونه اختلاف معنی‌داری در بین ماهیان گروه شاهد مشاهده نشد (p>۰/۰۵). همچنین در طی مدت زمان آزمایش (پنج و ۱۰ روز) هیچ‌گونه تلفاتی در گروه ماهیان شاهد مشاهده نشد.

در روز پنجم فعالیت آنزیم ALP در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده شد. تفاوت در سطح احتمال (P<۰/۰۵) معنی‌دار در نظر گرفته شد. در روز دهم فعالیت آنزیم ALP در گروه‌های تیمار ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). ولی غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی-گرم بر کیلوگرم نسبت به‌هم اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵).

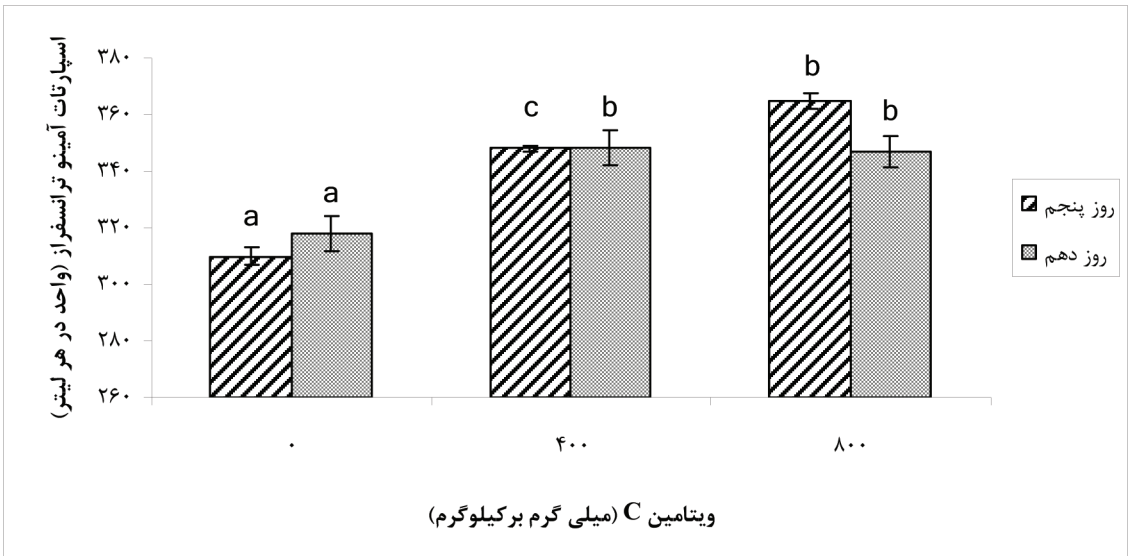
در روز پنجم، فعالیت آنزیم ALT در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). همچنین در تیمار ۸۰۰ نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده



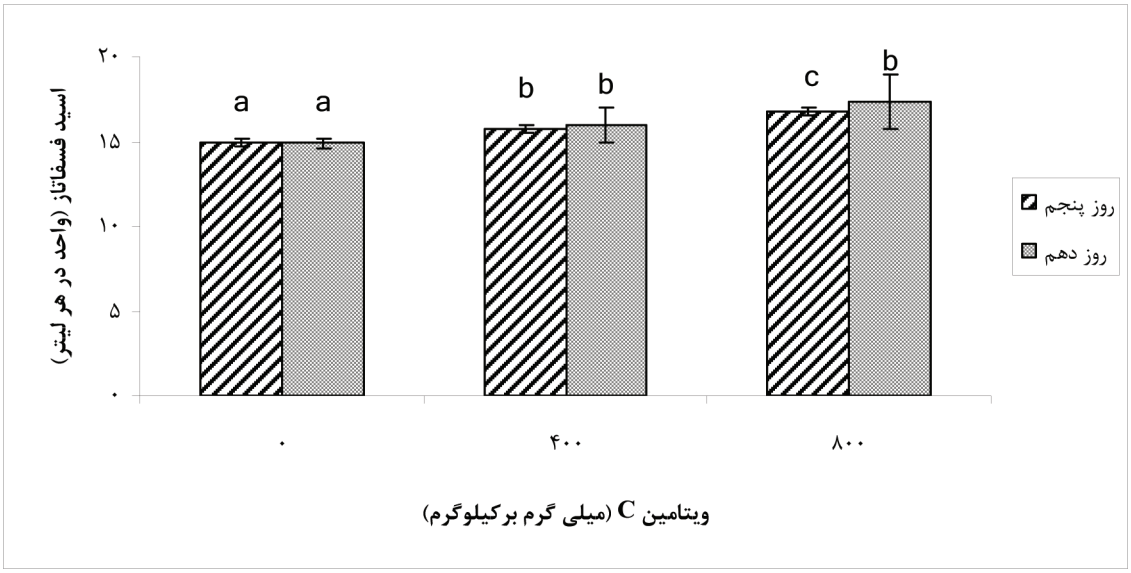
شکل ۱- بررسی تغییرات آنزیم آلکالین فسفاتاز در غلظت‌های مختلف ویتامین C در روزهای پنجم و دهم



شکل ۲- بررسی تغییرات آنزیم ALT در غلظت‌های مختلف ویتامین C در روزهای پنجم و دهم



شکل ۳- بررسی تغییرات آنزیم اسپارتات آمینوترانسفراز در غلظت‌های مختلف ویتامین C در روزهای پنجم و دهم



شکل ۴- بررسی تغییرات آنزیم ACP در غلظت‌های مختلف ویتامین C در روزهای پنجم و دهم

شـد (P<۰/۰۵). در روز دهم، فعالیت آنزیم ALT در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسـبت به تیمار شـاهد کاهش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) و همچنیـن در تیمـار ۸۰۰ نسـبت به تیمار شـاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). در تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ نسبت به‌هم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵).

در روز پنجـم، فعالیت آنزیـم AST در گروه‌های تیماری ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C اختلاف معناداری نشـان داد (P<۰/۰۵) و هر دو گروه نسـبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). در روز پنجـم در غلظت‌هـای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بـر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد مشـاهده شد (P<۰/۰۵). روز دهم فعالیت آنزیم AST در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). ولی تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵).

در روز پنجـم، فعالیـت آنزیم ACP در گروه‌هـای تیمار ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسـبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشـت (P<۰/۰۵). همچنین در تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به تیمار شـاهد و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). در روز دهـم، فعالیت آنزیـم AST در تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به سـایر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). ولی تیمارهـای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به‌هم اختلاف معناداری نداشتند (P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، تغییر در سـطوح آنزیم‌هـای ALT، AST، ACP و ALP در سـرم خون ماهیانی که در معرض ویتامین C بودند در مقایسه با گروه کنترل و دیگر گروه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از مکمل ویتامین C به تنهایی موجب تغییراتی در عملکرد آنزیم‌های سـرمی ALT، AST، ACP و ALP گردیـد که شـامل افزایش معنـی‌دار این آنزیم‌ها در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C در روزهای پنج و ۱۰ شد. در این مطالعه همچنین افزایش غلظت آنزیم‌های AST و ALP مشاهده شده در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم ممکن اسـت به دلیل افزایش آنابولیسم یا کاهش کاتابولیسم آن‌ها باشـد (۵). غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C باعث کاهش فعالیت آنزیم ALT پس از ۱۰ روز نسـبت به تیمار شاهد شد. همچنین ویتامین C بیشـترین تاثیر را در فعالیت این آنزیم نشـان داد. به علت این که ALT در سیتوپلاسـم سـلول‌های کبدی زیاد است و هنگام آسـیب از غشای سـلولی عبور و وارد خون می‌شـود، این آنزیم به عنوان شناساگر اختصاصی آسیب کبدی شناخته شده است (۱۲).

ویتامین C، آنتی‌اکسیدانی با وزن مولکولی پائین است که گونه اکسیژن فعـال (ROS) مایـع را از طریق انتقال خیلی سـریع الکترون هضم کرده و از پراکسیداسـیون چربی جلوگیری می‌کند (۹). طی تحقیقات بسیاری که انجام شـده مشخص شده اسـت که از میان ویتامین‌ها، ویتامین C بر سیسـتم ایمنی و افزایـش مقاومت آبزیان نقش موثرتری نسـبت به بقیه ویتامین‌ها دارد. از نظر فرمول شـیمیایی این ویتامین از سـاده‌ترین انواع ویتامین‌هاسـت و شباهت ساختمانی نسبی با اسید آسکوربیک دارد (۲۵). ویتامین C به‌راحتی از دسـتگاه گوارش جذب می‌شود و به‌طور گسترده در تمام بدن پخش می‌شـود. این ویتامین به‌میزان زیادی در افزایش و تداوم واکنش‌های ایمنی و سـازگاری نقش داشته و فعالیت‌های بیولوژیکی مانند مقاومت در برابر اسـترس‌ها و همچنین مسمومیت‌ها و فعالیت‌های ایمنی در لاروهای گونه‌های مختلف آبزیان توسط به‌کارگیری مکمل‌های ویتامین C بهبـود می‌یابد. نقش مواد محرک عمدتا بالا بردن ایمنی غیر اختصاصی است (۳۰). در بررسـی که صیاد بورانی و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی تاثیر سـطوح مختلف ویتامین C و ویتامین E در جیره بر پارامترهای رشد و سیسـتم ایمنی ماهی آزاد دریای خزر انجام دادند، نتایج نشان داد که در بین تیمارهای مختلف ویتامین C و E، ماهیان سـه تیمار(۷، ۸ و ۹) که با غـذای حاوی ویتامین C و ویتامیـن E به‌ترتیب به مقدار بالاتر ویتامین C یعنـی (۳۰۰-۴۰)، (۳۰۰-۳۰)، (۳۰۰-۲۰) میلـی گرم بر کیلوگرم تغذیه شده بودند، بیشترین افزایش وزن بدن و درصد بازماندگی را بدست آوردند و ماهیان تیمار ۱۰ که با غذای فاقد ویتامین تغذیه شـدند، کم‌ترین افزایش وزن بدن و درصد بازماندگی را داشـتند (۲۹). مونترو و همکاران در سـال ۱۹۹۸ با تجویز ویتامین‌های C و E بهبود پاسـخ ایمنی و افزایش مقاومت در برابر استرس‌های محیطی را در *Sparus aurata* گزارش دادند (۲۱).

طبق پژوهشی که توسط وینسـتون و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام گرفت مشخص شـد ویتامین E، اسید آسـکوربیک (ویتامین C)، یوریک اسـید و گلوتاتیون، در حدود ۷۰ درصد از سـهم آنتی اکسیدانی کل را به خود اختصاص می‌دهند. نتایج این مطالعه نشـان‌دهنده سـهم قابل توجه ویتامیـن E و C در ظرفیت آنتی اکسـیدان کل می‌باشـد (۳۷). Gatlin و همـکاران در سـال ۲۰۰۲ دریافتند که ویتامین C نقـش مهمی را در فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف بدن ماهی ایفا می‌کند (۱۱). در خلال تحقیقـات تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی که بـر گونه‌های مختلفی از آبزیان صورت گرفت، ثابت شـد که مکمل ویتامین C باعث تقویت عملکرد رشـد و بالابردن سیستم ایمنی بدن می‌گردد (۲۱). Ai و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش دادند که وجود ویتامین C در سطح مناسبی در جیره غذایی آبزیـان دارای تاثیر مثبتی بر فاکتورهای ایمنی از جمله تحریک فعالیت راه میانبر کمپلمان و لیزوزیم سـرم، مقدار آنتی‌بادی کل پلاسما، تشدید عمل بیگانه‌خواری گلبول‌های سـفید و تکثیر لنفوسیت‌ها می‌شود (۲). مطالعه حاضر نشـان داد که مکمـل ویتامین C در غلظت بـالای ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگـرم در جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگیـن کمان باعث افزایش آنزیم‌هـای AST و ALP کبدی در خون پس از پنج و ۱۰ روز شـد که این موضوع می‌تواند نشـان‌دهنده موثر نبودن ویتامین C در غلظت بالا باشـد. ولی ویتامین C تاثیر چندانی بر فعالیت آنزیم‌های ACP و ALT در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم نشان نداد. همان‌گونه که در تحقیقات پیشین نیز نشان داده شده اسـت، ویتامین‌ها تنها در غلظت‌های معینی دارای اثر مثبت هستند و بالا رفتن غلظت بیش از حد مطلوب اثر آنتاگونیسـتی بر سـلامت ماهی دارد (۱۶). در استفاده از محرک‌های ایمنی برای تحریک و ارتقای سیستم ایمنـی آبزیان باید دقت زیادی در مورد مقدار ماده مورد اسـتفاده به‌عمل بیایـد. گونه‌های مختلف آبزیان و نوع ماده محرک ایمنی به‌کار برده شـده در تعیین مقدار آن بسـیار حائز اهمیت هستند، به‌گونه‌ای که یک محرک ایمنی خاص ممکن اسـت در گونه‌های مختلف آبزیـان با مقادیر متفاوتی قادر به تاثیر مثبت بر سیستم ایمنی گردد و یا ممکن است که یک محرک

ایمنی در گونـــه‌ای از آبزیان تاثیر مطلوب و در گونه دیگر بی‌تاثیر یا همراه با تاثیرات منفی باشد (۱۵). تجویز خوراکی عملی‌ترین روش برای استفاده و معرفی محرک‌های ایمنی اســـت، اما با این حال تاثیرات و عواقب استفاده طولانـــی مدت محرک‌های ایمنی به‌صورت خوراکـــی هنوز چندان واضح و مشخص نیست (۳۸).

تاتینا و همکاران در ســـال ۲۰۱۰ تاثیر ویتامین C و E را بر فاکتورهای خونی و بیوشـــیمیایی در تاس ماهی (*Acipencer ruthenus*) بررسی کردند و افزایش تعداد گلبول سفید را به دنبال استفاده از این ویتامین‌ها به‌عنوان محرک ایمنی گزارش نمودند (۳۲). در مطالعه‌ای که توکمه‌چی و همکاران در ســـال ۲۰۱۲ به بررسی بهبود شـــاخص‌های رشد و برخی از پارامترهای پاســـخ ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با اســـتفاده توام از ویتامین C و پربیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* پرداختند، نتایج نشان داد که استفاده تـــوام ویتامین C (به میزان یک گرم در کیلوگرم) و پربیوتیک (به میزان ۷ ۱۰ ×CFU۵) می‌تواند شـــاخص‌هایی نظیر وزن نهایی، درصد افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه و پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل آلا (فعالیت لیزوزیم، فعالیت راه میانبر کمپلمان ســـرم و مقدار آنتی بادی تام پلاســـما) را بهبود ببخشد (۳۴)، اما برای به‌دســـت آوردن نتایج بهتر، انجام مطالعات میدانی بیشتر لازم است. در بررسی که رحیمی و همکاران بر روی تاثیر ویتامین C بر پارامترهای خونی، رشد و پاسخ به استرس دمایی در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان انجام دادند، نتایج تنش‌های دمایی نشان داده است که ماهیان تغذیه شـــده با سطوح مختلف مکمل ویتامین C بازماندگی بیشتری نسبت به ماهیان تغذیه شـــده بدون ویتامین C داشـــتند (۲۴). در مطالعه‌ای که میار و همکاران در ســـال ۲۰۱۳ بر روی اثر ســـطوح مختلف مکمل غذایی ویتامین C و ویتامین E بر روی شاخص‌های خونی و عملکرد رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرداختند. نتایج نشـــان داد که مکمل ویتامین C و E در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث بهبود رشـــد و سلامت ماهیان شد، ولی غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین C و E نتوانست باعث بهبود رشد و سلامت بچه ماهیان شود (۱۹). در مطالعه‌ای که فرامرزی در سال ۲۰۱۲ بر روی اثر مکمل غذایی ویتامین C بر پارامترهای رشد، تغذیه، لاشه و درصد بقاء در ماهی کپـــور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام داد، نتایج نشـــان داد کـــه در تیمارهای ویتامیـــن C (۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ضریب رشـــد ویژه (SGR) و بازده تبدیل غذایی (FCE) به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (P<۰/۰۵) و بالاترین ضریب رشد ویژه در تیمار ۱۲۰۰ میلی‌گرم مشاهده شد، اما اختلاف معناداری در میزان بقای مشاهده شده در بین تیمارها وجود نداشت (۸) (P>۰/۰۵).

اگرچه ارتباط اثرات نیازمند بررسی عوامل استرس اکسیداتیو و آنزیم‌های شرکت‌کننده در دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، مطالعات نشان می‌دهند که آنتی‌اکســـیدان‌هایی نظیر ویتامین E و C، اســـترس اکســـیداتیو را هم در حالت اســـتراحت و هم در پاســـخ به فعالیت کاهش داده‌اند (۱۸). براساس شـــواهد به‌دست آمده، استفاده از آنتی اکســـیدان‌ها روش امیدوارکننده‌ای برای درمان آسیب‌های کبدی به‌نظر می‌رسد. مصرف ویتامین E با دوز بالا می‌تواند باعث بهبود فعالیت انســـولین و کاهش سطح پلاسمایی انسولین و کاهش سطح قند خون به‌وســـیله کاهش استرس اکسیداتیو سلولی، تغییر خواص غشا و کاهش فعالیت‌های التهابی شود (۱۸).

در مطالعه‌ای که توســـط آویرام و همکاران در ســـال ۲۰۰۵ بر روی اثر ویتامین E بر آنزیم پاراکسوناز انجام شد، نتایج نشان داد که دریافت خوراکی ویتامین E یک عامل پیش‌بینی‌کننده برای فعالیت آنزیم پاراکســـوناز بود و افزایش دریافت این ویتامین با افزایش فعالیت آنزیم پاراکســـوناز همراه بود (۳). در ایـــن مطالعه افزایش ویتامیـــن C باعث افزایش میزان غلظت آنزیم AST در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم شد. مطالعات انجام شده توسط احمد و همکاران در سال ۲۰۰۳ حاکی از آن است که با مصرف ویتامین E و ســـلنیوم و به‌خصوص مصرف هم زمان هر دو، سیســـتم دفاع آنتی‌اکسیدانی کبد تقویت شده و به‌میزان زیادی ضایعات ناشی از بالا رفتن قند خون جبران می‌شـــود (۱). سیستم آنتی‌اکســـیدانی بدن شامل عوامل آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد. از آن جمله می‌توان به ویتامین E، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیســـموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز اشاره نمود (۱۴). گارســـیا و همکاران بهبود برخی فاکتورهـــای خونی و ایمنی ماهی (*Piaractus mesopotamicu*) کـــه با جیره غذایی ویتامین E و C غذادهی شـــده بود را گزارش نمودند و همچنین افزایـــش مقاومت در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا را در تیمارها مشاهده کردند (۱۰).

با توجه بـــه نتایج مطالعه‌ی حاضر و مطالعات اخیر ســـایر محققان در ســـایر گونه‌های جانوری از جمله ماهی، به‌نظر می‌رســـد که ویتامین C در روش خوراکی قادر اســـت باعث بهبود شـــاخص آنزیمی ALT که شناساگر اصلی کبد می‌باشـــد در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بـــر کیلوگرم ویتامین C در طی روزهای پنجم و دهم شـــود. ولی این ویتامین بر روی ســـایر آنزیم‌های کبدی تاثیر قابل توجهی نشـــان نداد و حتی باعث افزایش آنزیم‌های AST و ALP در غلظت‌هـــای ۴۰۰ و ۸۰۰ در طـــی روزهای پنجم و دهم شـــد، که با افزایش میـــزان غلظت ویتامین C (۸۰۰ میلی‌گـــرم)، میزان فعالیت آنزیم‌های مذکور در سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نیز افزایش پیدا کرد. تعیین مقادیر بهینه ویتامین‌ها در جیره غذایی آبزیان پرورشـــی بسیار حائز اهمیت می‌باشـــد. با افزودن ویتامین C به جیره غذایی ماهیان پرورش یافتـــه می‌توان از اثرات تخریبی بیماری‌ها و آلاینده‌ها تاحدودی کاســـت و باعث افزایش سیستم ایمنی بدن در پاسخ به استرس‌های محیطی که خود عاملی بر افزایش آنزیم‌های کبدی اســـت، شد. ولی برای رسیدن به این امر باید مطالعات بیشـــتری در غلظت‌های مختلف ویتامین C بر روی عملکرد آنزیم‌های کبدی در گونه‌های مختلف ماهی صورت پذیرد.

منابع مورد استفاده

1. Ahmad, M., A. S. Khan. I. Pirincci and B. Tasdemir. 2003. Naturally occurring antioxidant vitamin levels in patients with type-II diabetes mellitus. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad* 15(1): 54-57.

2. Ai, Q., K. Mai. C. Zhang. W. Xu. Q. Duan. B. Tan and Z. Liufu. 2004. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* 242(1-4): 489-500.

3. Aviram, M., M. Kaplan. M. Rosenblat and B. Fuhrman. 2005. Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. Handbook of Experimental Pharmacology 170: 263-300.

4. Chapman, P.M., R. N. Dexter and E. R. Long. 1998. Synoptic measures of sediments contamination, toxicity and infaunal community composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay. Marine Ecological Progress Series 37: 75-93.
5. Christ-Crain, M., C. Meier. J. Puder. J. Staub. P. Huber and U. Keller. 2004. Changes in liver function correlate with the improvement of lipid profile after restoration of euthyroidism in patients with subclinical hypothyroidism. *Exclinal Journal* 3: 1-9.
6. Dabrowski, K. 2001. Ascorbic acid in aquatic organisms Status and Perspectives. CRC Press, Florida, US.
7. Edsall, C.C. 1999. A blood chemistry profile for lake trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 11(1): 81-86.
8. Faramarzi, M., 2012. Effect of Dietary Vitamin C on Growth and Feeding Parameters, Carcass Composition and Survival Rate of Common Carp (*Cyprinus carpio*), *Global Veterinaria* 8 (5): 507-510.
9. Flora, S.J.S., and S.K. Tandon. 1986. Prevention and therapeutic effects of thiamin, ascorbic acid and their combination in lead intoxication. *Acta Pharmacologica Et Toxicologica* 58(5): 8-374.
10. Garcia, F., F. Pilarski. E. M. Onaka. F. R. Moraes and M. L. Martins. 2007. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C & E, challenged by *Aeromonas hydrophila. Aquaculture* 271(1-4): 39-46.
11. Gatlin, D.M. 2002. Nutrition and fish health. In: Fish Nutrition, (ed. Halver, J.E., Hardy, R.W.). *Academic Press* 671–702.
12. Hao, L., Z. Wang and B. Xing. 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp *(Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences* 21(10): 1459-1466.
13. Heydarnejad, M.S., M. Najafi. M. Mobini- Dehkordi and S. Rahnama. 2014. An assessment of acute oral toxicity of ZnO nanoparticles on serum biochemical function of liver in mice. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences* 16(1): 65-71.
14. Kassab-Chekir, A., S. Laradi. S. Ferchichi. A. Haj Khelil. M. Feki. F. Amri. H. Selmi. M. Bejaoui and A. Miled. 2003. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. *Clinica Chimica Acta* 338(1-2):79-86.
15. Kim, D.H., and B. Austin. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish and Shellfish Immunology* 21(5): 24-513.
16. Kiron, V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology* 173: 111-133.
17. Mclarebn. A., E. Keller. J. O'Donnedl and A. Elvehjecm. 1947. The nutrition of rainbow trout; studies of vitamin requirements. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 15(2): 78-169.
18. Medina, J., and R. Moreno-Otero. 2005. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs* 65(17): 61-2445.
19. Miar, A., A. Matinfar. M. Shamsaei and M. Soltani. 2013. Effects of different dietary vitamin C and E levels on growth performance and hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *World Journal of Fish and Marine Sciences* 5 (2): 220-226.
20. Moss, D.W. and Henderson, R. 1999. Clinical Enzimology. In: Burtis, C.A. and Asheewd, E.R. 1994. Text book of clinical chemistry. 3rd Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 617-721.
21. Muntro, D., M. Marrero. M. S. Izquierdo. L. Robaina. J . M. Vergara and L. Tort. 1998. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture* 171(3-4): 269–278.
22. NRC. 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, Washington DC.
23. Parma, M.J., A. Loteste. M. Campana and C. Bacchetta. 2007. Changes of hematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin. *Journal of Environmental Biology* 28(1):147-49.
24. Rahimi, M., M. Sudagar. H. Ouraji. S. A. Hosseini and V. Taghizadeh. 2012. The effect of vitamin C on growth performance, survival rate, hematological parameters and response to heat stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Veterinary Research* 67(4): 373-380.
25. Rasouli, S., and K. Abdi. 2005. Principles of fish immunology. published by Simorgh. Tehran, Iran.
26. Saha, S., and A. Kaviraj. 2009. Effects of cypermethrin on some biochemical parameters and its amelioration through dietary supplementation of ascorbic acid in freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *Chemosphere* 74(9): 9-1254.
27. Satari, M., D. Shahsavani and S. Shafiee. 2005. Ichthyology and systematic. Haghshenas Press. Tehran, Iran.
28. Sato, M., T. Kondo. R. Yoshinaka and S. Ikeda. 1982. Effect of dietary ascorbic acid levels on collagen formation in rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 48(4): 553-556.
29. Sayad Burani, M., H. Khara. M. Sayad Buran and S. E. Fakharzadeh. 2015. The effect of vitamin C and E supplement in diet on the growth and immunological parameters of Caspian salmon (Salmo trutta caspius). *Iranian Scientific fisheries Journal* 23(4): 85-95.
30. Secombes, C.J. 1997. The Nonspecific Immune System: Cel-

lular Defenses. *Fish Physiology* 15: 63-103.
31. Shahsavani, D., M. Mohri and A. Jamialahmadi. 2013. Effect of Thiamin (Vit B1) on serum activities of some enzymes following lead exposure in common carp (*Cyprinus carpio*). *Iranian Journal of Veterinary Clinical Sciences* 6(2): 37-44.
32. Tatina, M., M. Bahmani. M. Soltani. B. Abtahi and M. Gharibkhani. 2010. Effects of Different Levels of Dietary Vitamins C and E on Some of Hematological and Biochemical Parameters of Sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Journal of fisheries and aquatic Science* 5(1): 1-11.
33. Tohidi, M., H. Harati. F. Hadaegh. Y. Mehrabi and F. Azizi. 2008. Association of liver enzymes with incident type 2 diabetes: A nested case control study in an Iranian population. *BMC Endocrine Disorders* 8: 5-9.
34. Tookmehchi, A., H. Shamsi. S. Meshkini R. Delshad. R and A. Ghasemi Moghanjoei. 2012. Dietary administration of vitamin C and *Lactobacillus rhamnosus* in combination enhanced the growth and innate immune response of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Iranian Scientific Fisheries Journal 21(3): 13-22.
35. Treves-Brown, K., 2000. Applied Fish Pharmacology. Master of Arts, Cambridge. UK.
36. Vesely, T., S. Reschova. D. Pokorova. J. Hulova and Z. Nevorankova. 2006. Production of monoclonal antibodies against immunoglobulin heavy chain in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinarni Medicina* 51 (5): 296–302
37. Winston, G. W., F. Regoli. A. J. Dugas. J. H. Fong and K. A. Blanchard. 1998. A rapid G.C. assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids, Free Radical. *Free Radical Biology and Medicine* 24(3): 93-480.
38. Yoshida, M., K. Ishigaki. T. Nagai. M. Chikyu and V. G. Pursel. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biology of Reproduction* 49(1): 89-94.