تاثیرات اضافه نمودن ویتامین D در جیره غذایی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان بر روی سیستم ایمنی و فاکتورهای خونی

سجاد دهقان زاده [۱]*؛ عباسعلی زمینی [۲] ؛ حسین خارا [۲]

Sajjad_dehghanzadeh@yahoo.com

۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان ، دانشکده منابع طبیعی ، گروه شیلات،لاهیجان، ایران ، صندوق پستی : ۱۶۱۶.
۲. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان ، دانشکده منابع طبیعی ، گروه شیلات ، لاهیجان، ایران ، صندوق پستی : ۱۶۱۶.

تاریخ دریافت : شهریور۱۳۹۲ تاریخ پذیرش : آذر۱۳۹۲

چکیده

قزل آلای رنگین کمان جزو ماهیان پرورشی است که اساس یک صنعت در حال توسعه را تشکیل می دهد. به دلیل اهمیت امروزه این ماهی در صنعت آبزی پروری ، این تحقیق در ۱۲۰ عدد بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی۳ گرم به مدت ۸ هفته در ۱۲ تانک فایبرگلاس با تراکم ۱۰ عدد بچه ماهی برای بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامین D3 در فاکتورهای خونی و سیستم ایمنی ، در۳ تیمار غذایی و ۱گروه شاهد با ۳ تکرار،در غلظت های ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D3 صورت پذیرفت. تحقیق حاضر نشان داد که افزایش مقادیر ویتامین D3 به جیره غذایی بچه ماهیان ، باعث افزایش سطوح ویتامین D پلاسمای خون و افزایش سطوح گلبول های سفید خون و ایمنوگلبولین کل گردید که بیانگر افزایش سیستم ایمنی بدن می باشد و در دیگر فاکتورهای خونی مانند هموگلوبین ، هماتوکریت ، نوتروفیل ، لنفوسیت ، مونوسیت ، ائوزونوفیل ، حجم متوسط گلبولی خونMCV ، غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمزMCH ، غلظت متوسط هموگلوبین های گلبول قرمز خون MCHC اختلاف معنادار آماری نداشته است($p>0.05$).

کلمات کلیدی : قزل آلای رنگین کمان، ویتامینD ،فاکتورهای خونی، سیستم ایمنی،گلبول سفید خون،ایمنوگلبولین کل.

*نویسنده مسئول

Archive of SID

www.SID.ir

۱.مقدمه

ماهی قزل آلای رنگین کمان از خانواده سالمونیده[1]، با نام معمولی Rainbow trout و با نام علمی (*Oncorhynchus mykiss*) است(۱۱).نخستین گونه از خانواده آزاد ماهیان است که به عنوان غذای اصلی انسان اهلی شده و پرورش یافته و در حال حاضر سهم با ارزشی در تامین غذای انسان دارد(۳).افزایش جمعیت انسانی مشکلاتی را به دلیل محدودیت منابع تامین غذای انسان پدید آورده و چون بدن انسان برای زنده ماندن،رشد و فعالیت به مواد غذایی مختلف نیاز دارد، در این بین پروتئین حیوانی اهمیتی فراوان دارد.در بین پروتئین های حیوانی،گوشت ماهی به علت دارابودن اسیدهای چرب غیر اشباع توسط متخصصان تغذیه سفارش شده است(۷). مراحل ابتدایی رشد ماهی قزل آلا در طول دوره تکثیر و پرورش ممکن است شرایطی ویژه و بحرانی از نظر تغذیه ای در شرایط پرورشی را تجربه کند که برای مقابله با تلفات می توان از افزودنی هایی همچون ویتامین ها به جیره در جهت افزایش سلامتی و موفقیت در پرورش استفاده کرد(۱).ویتامین ها موجب تسریع فعالیت های زیستی می شوند که برای رشد طبیعی،تولید مثل و حفظ شرایط طبیعی و متابولیسم صحیح بدن ضروری اند(۸). فقدان هر کدام از ویتامین ها در جیره منجر به بروز بیماری خاصی می شود(۵).همچنین ویتامین ها نقش عمده ای در تقویت سیستم ایمنی ماهیان دارند(۱۰). ویتامین ها گروهی مشتق از ترکیبات آلی و اجزای ضروری جیره های غذایی اند که جهت رشد، تکثیر و تسریع فعالیت های زیستی و سلامتی ماهی ها و میگوها مورد استفاده قرار می گیرند.در این بین ویتامین D که پیش ساز هورمونی است علاوه بر نقش سرنوشت ساز و مهم در سلامت استخوان ها، بر کارکرد سیستم ایمنی تاثیر دارد(۱۰).

ویتامین D تقریبا از ۱۰ ترکیب استرولی متفاوت با فعالیت ویتامینی ساخته شده است،ولی فقط دو ترکیب آن دارای اهمیت است:ارگوکلسیفرول (D2) و کول کلسیفرول (D3)که ماهیان تنها قادر به استفاده از ویتامین D3 می باشند(۱۰).کول کلسیفرول شکلی است که به جیره غذایی ماهی ها اضافه می شود و توسط یک ناقل پروتئینی اختصاصی به کبد منتقل و در کبد به ۲۵- هیدروکسی کول کلسیفرول و نهایتا به 1, 25- OH2-D3 تبدیل می گردد(۱۰).شناخته ترین فعالیت ویتامین D نقش آن در ارتباط با تعادل کلسیم و فسفر است ولی نقش های نه چندان شناخته شده ای نیز در تمایز سلولی،تکثیر و رشد بسیاری از بافت ها مثل پوست،ماهیچه ها،پانکراس، اعصاب،غدد پاراتیروئید و سیستم ایمنی به عهده دارد(۱۰). بررسی ها نشان داده که سیستم ایمنی در ماهیان استخوانی شباهت زیادی با پستانداران دارد و از آنجا که پرورش ماهیان بصورت متراکم،منجر به افزایش احتمال ابتلا به بیماری های عفونی در تمام مراحل پرورش می شود مطالعه سیستم ایمنی به حفظ سلامت آنها در طول دوره پرورش کمک می کند(۲۲).علم خون شناسی ماهیان از دهه ۸۰ میلادی بطور جدی آغاز و تا امروز روند پیشرفت قابل توجهی را گذرانده اما چون هر گونه از ماهیان دارای الگوی خاص خونی اند و هر عامل استرس زایی بر میزان این فاکتورها تاثیر بسزا دارد،کار در این زمینه با مشکلات متعددی روبرو بوده است که از سرعت این تحقیقات می کاهد(۲). از نمونه کارهای مشابهی که در زمینه ویتامین D در ماهیان انجام شده است می توان به تحقیقات Gupta(۲۰۰۴)، Barnett و همکاران(۱۹۸۲)،Miranda de Oliveira و همکاران(۱۹۸۹)اشاره کرد که متاسفانه در زمینه سیستم ایمنی در ماهیان،تحقیقات مشابه کمتر دیده شده است(۱۸و۱۲و۱۳و۲۰). در راستای تحقیق حاضر می توان به این فرضیات اشاره کرد که آیا استفاده از مقادیر مختلف این ویتامین تاثیری بر فاکتورهای

[1] Salmonidea-

Archive of SID

خونی و گلبول های سفید خون و افزایش سیستم ایمنی بدن بچه ماهیان دارد ؟ از اهداف تحقیق ، می توان به تعیین اثرات ویتامین D بر برخی شاخص های خونی نظیر تعداد گلبول قرمز و سفید خون و سیستم ایمنی نظیر ایمنوگلبولین اشاره کرد.

۲. مواد و روش ها

این تحقیق به مدت ۸ هفته پرورشی در تابستان ۱۳۹۱ در تعداد ۱۲ تانک فایبرگلاس در سالن سرپوشیده مرکز تحقیقات شفق داروی پارسیان واقع در روستای خرف شهرستان صومعه سرا، با شرایط نوری کنترل شده و یکسان با آب ورودی از چاه انجام شد.۱۲۰ عدد بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان ۳ گرمی با تراکم ۱۰ عدد در هر تانک رها سازی شد.به منظور تغذیه لاروها یک نوع غذای خشک اکسترودر EXS4 تولیدی شرکت کیمیاگران تغذیه در طول ۸ هفته برای تغذیه روزانه ۳ بار در روز ماهیان مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱ : جدول مشخصات فیزیکی و آنالیز خوراک اکسترودر EXS4

نام محصول	پروتئین	چربی	فیبر	رطوبت	سایز خوراک	وزن ماهی
EXS4	٤٦٪	١٥٪	٢٪	١٠٪	١/٥ میلی متر	٣-٥گرم

برای انجام این تحقیق حدود ۱۰۰ گرم ویتامین D3 پودری با درجه خلوص۱۰۰درصد با مارک DSM(رش سوئیس) از شرکت خوراک آبزیان کیمیاگران تغذیه شهرکرد تهیه شد. برای آماده سازی تیمارها پس از محاسبات انجام شده،مقدار ویتامین D برای هر تیمار توسط ترازوی A&D دیجیتال سری GH با دقت یکصد هزارم گرم اندازه گیری شد.مقادیر ویتامین D برای هر تیمار،در ۱۰۰ سی سی الکل اتیلیک طبی ۹۶ درصد(ساخت شرکت کیمیا الکل زنجان)با فرمول C2H5OH حل شد و با ۹۰۰ سی سی آب مقطر مورد رقیق سازی قرار گرفت و بر روی یک کیلوگرم غذا در فضای باز و در معرض جریان هوا و در سایه مورد اسپری قرار گرفت تا آب مخلوط شده به غذا به آرامی تبخیر گردد. این آزمایشات در تیمارهای ۳۰۰۰ ، ۴۰۰۰ ، ۵۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D3 و گروه شاهد در ۳ تکرار صورت پذیرفت.نظر به اهمیت عوامل مختلف محیطی در پرورش بچه ماهیان و وابستگی شدید آنها از نظر رشد و سلامت به برخی از عوامل محیطی مختلف، با فواصل زمانی یک هفته ای، در سه نوبت (صبح – ظهر – عصر) میانگین درجه حرارت آب و سختی آب (توسط دستگاه HM Digital)، اکسیژن محلول (توسط دستگاه AZ model 8403)، pH (توسط دستگاه AZ model 8658) اندازه گیری شد. به منظور خونگیری،۲ ماهی از هر تکرار به طور تصادفی صید گردید و پس از خشک کردن توسط پارچه تنظیف، از طریق قطع ساقه دمی، یک میلی لیتر خون از هر تیمار درون لوله ویال اپندورف آغشته به ماده ضد انعقاد خون هپارین ریخته شد.نمونه ها در یک کلمن حاوی یخ خشک به دور از تکان های شدید به آزمایشگاه هماتولوژی دکتر فدایی در رشت منتقل و بلافاصله گلبول های سفید خون،ویتامین D3خون، ایمنوگلبولین کل و سایر فاکتورهای خونی مورد اندازه گیری قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه گیری ویتامین D خون نیز توسط کیت تجاری EUROIMMINبه روش الایزا[1] (25-OH Vitamin D ELISA Test instruction) بر اساس نانو گرم ویتامین D در میلی لیتر استفاده شد (۱۵). هموگلوبین با واحد گرم در دسی لیتر به روش دستگاهی با استفاده از Sysmexlys اندازه گیری شد(۱۴). هماتوکریت با لوله های میکرو هماتوکریت و توسط میکروسانتریفوژ Hettich با دور rpm ۱۴۰۰۰ اندازه گیری شد(۱۴).شمارش گلبول قرمز به کمک محلول Lewis و با ملانژور و لام نئوبار با واحد مترمکعب انجام گرفت ، همچنین شمارش گلبول سفید به کمک محلول Lewis در ۰/۱ گرم (Brillant cresyl blue) به کمک ملانژور و لام نئوبار با واحد مترمکعب انجام پذیرفت(۱۴). محاسبه حجم متوسط گلبولی (MCV) با واحد فمتولیتر، غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) با واحد پیکوگرم، غلظت متوسط هموگلوبین های گلبول قرمز (MCHC) با واحد گرم در دسی لیتر بدست آمد(۱۴). برای انجام تشخیص افتراقی،یک قطره خون با لوله میکروهماتوکریت در ۱ سانتی متری گوشه راست لام ریخته و سپس با یک لام دیگر با زاویه ۳۰ تا ۴۵ درجه با حرکتی یکنواخت و ملایم،قطره خون را به طرف چپ انتشار و گسترش خونی ایجاد شد.گسترش به مدت ۵ دقیقه در جریان هوا خشک و سپس توسط متانول به مدت ۳ تا ۵ دقیقه تثبیت شد.سپس از محلول گیمسا جهت رنگ آمیزی و مشاهده لام ها زیر میکروسکوپ برای شناسایی انواع گلبول های سفید و تعداد و درصدشان استفاده گردید(۶). ایمنوگلبولین کل در این آزمایش بر اساس روش سیویکی و اندرسون [2] (۱۹۹۳) محاسبه شده است. ۰/۱میلی لیتر از هر سرم نمونه با ۰/۱ میلی لیتر از پلی اتیلن گلیکول ۱۲٪ ترکیب و مخلوط حاصل پس از۲ساعت انکوباسیون در دور۵۰۰۰ در۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد.ایمنوگلبولین های ته نشین شده به وسیله سانتریفوژ استخراج شدند.پروتئین کل مانده در سطح ، حجم پروتئین آن از روش Biuret بدست آمد.در نهایت مقدار ایمنوگلبولین کل از کسر پروتئین ترکیب شده با PEG سانتریفوژ شده و بر حسب (mg/ml) بدست آمد(۲۱). آلکالین فسفاتاز خون بر اساس ۳ واحد بین المللی در لیتر به روش فوتومتریک (آنزیمیت) به روش دو محلوله در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با طول موج ۴۰۵ نانومتر و بر اساس استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان (DGKC) بدست آمد(۲۵و۱۷و۲۳و۲۴). در نهایت،به منظور بررسی توزیع نرمال داده ها در گروه ها و تکرارها جهت تشکیل تیمار ها از آزمون شاپیرو ویلک[3] و رسم نمودار هیستوگرام استفاده شد.در صورت نرمال بودن داده ها به منظور مقایسه آماری بین گروه ها در تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه Oneway(ANOVA) و پس از انجام آزمون تست آزمون واریانس هموژنی[4] جهت مقایسه گروه ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد.در صورت نرمال نبودن داده ها جهت مقایسه تیمارها از آزمون کروسکال والیس[5] و به منظور مقایسه بین گروه ها از آزمون من ویتنی[6] استفاده شد.لازم به ذکر است که تمامی داده ها پارامتریک بوده اند بجز داده های ائوزونوفیل که از آزمون کروسکال والیس برای بررسی آن استفاده گردید. همچنین کلیه آنالیز های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و جهت رسم نمودار ها از نرم افزار Excel ۲۰۰۳ استفاده

۳.نتایج

مقایسه میانگین میزان ویتامین D خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروها با

[1] ELISA -
[2] Siwicki - Anderson-
[3] Shapiro-Wilk-
[4] Test of Homogeneity of Variances -
[5] Kruskal-Wallis -
[6] Mann-Whitney -

Archive of SID

یکدیگر نشان داد که ویتامین D خون بچه ماهیان در شاهد و تیمار ۳ کمتر از سایر تیمار ها بوده است و در تیمار ۱ از بیشترین مقدار برخوردار بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار بین شاهدو تیمار۳ با تیمار ۱ و ۲ مشاهده گردید ($P<0.05$).

جدول ۲ : جدول میانگین ویتامین D خون در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
ویتامین D خون	تیمار ۱ :۵۰۰۰ IU	۹/۱۳ ± ۰ /۷۵ [c]
	تیمار ۲ :۴۰۰۰ IU	۴/۲۷ ±۰/۹۹ [b]
	تیمار ۳ :۳۰۰۰ IU	۲/۶ ±۰/۱۵ [a]
	شاهد	۲ ± ۰/۲ [a]

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می باشد

مقایسه میانگین میزان آلکالین فسفاتاز خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروها با یکدیگر نشان داد که آلکالین فسفاتاز خون بچه ماهیان در تیمار ۱ بیشتر از سایر تیمار ها بوده و تیمار ۲ و ۳ در رتبه های بعدی قرار داشته اند و کمترین میزان ALP در خون بچه ماهیان در قرار داشته اند و کمترین میزان ALP در خون بچه ماهیان در تیمار شاهد مشاهده شده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار بین تیمار ۱ با شاهد ، و سایر تیمار ها مشاهده گردید ($P<0.05$).

جدول۲: جدول میانگین آلکالین فسفاتازخون در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
آلکالین فسفاتاز	تیمار ۱ :۵۰۰۰ IU	۹۰۵ ± ۳۲ /۵۳ [c]
خون	تیمار ۲ :٤۰۰۰ IU	٦٦٢ ±۳۳/۳۰ [b]
ALP	تیمار ۳ :۳۰۰۰ IU	٦۳۰/٦۷ ±۳۳/۰٤ [b]
	شاهد	۳۵۷/۵ ±۲/۵ [a]

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می باشد

۱- Shapiro-Wilk
۱- Test of Homogeneity of Variances
۱- Kruskal-Wallis
۱- Mann-Whitney

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه میانگین میزان گلبول سفید خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروها با یکدیگر نشان داد که میزان گلبول های سفید خون بچه ماهیان در تیمار ۲ و ۳ بیش از سایر تیمار ها و شاهد بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار با تیمار ۱ (که از کمترین مقدار برخوردار بوده است) و شاهد مشاهده گردید ($P<0.05$).

جدول۳:جدول میانگین گلبول های سفید خون در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
گلبول های سفید	تیمار ۱ :IU ۵۰۰۰	٦٥٠٠ ± ٢٨٨ /٦٧ [a]
WBC	تیمار ۲ :IU ٤٠٠٠	٩٣٣٣/٣٣ ±٧١٢ /٥٨ [b]
	تیمار ۳ :IU ۳۰۰۰	٩٥٦٦/٦٧ ±٧٥٣/٥١ [b]
	شاهد	**٨١٥٠ ±٥٠ [ab]**

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می باشد

مقایسه میانگین میزان گلبول قرمز خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروها با یکدیگر نشان داد که میزان گلبول های قرمز در خون ماهیان مورد بررسی بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$).

جدول٤:جدول میانگین گلبول قرمز خون در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
گلبول قرمز	تیمار ۱ :IU ۵۰۰۰	٦٤٨٦٦٦/٦٧ ±٨٠٨٩/٧٧
RBC	تیمار ۲ :IU ٤٠٠٠	٧٢٣٠٠٠ ±٥١١٥٩/٨٨
	تیمار ۳ :IU ۳۰۰۰	٦٥٧٦٦٦/٦٧ ±٢٣٧٢٩/٩٦٢
	شاهد	**٦٩٧٥٠٠ ±٦٥٠٠**

مقایسه میانگین ایمنوگلبولین کل خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروها با یکدیگر نشان داد که میزان ایمنوگلبولین کل خون بچه ماهیان به ترتیب در تیمار ۱ ،تیمار ۲ و تیمار ۳ بیشتر از شاهد بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید ($P<0.05$).

جدول۵: جدول میانگین ایمنوگلبولین کل خون در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
ایمنوگلبولین کل	تیمار ۱ :IU ۵۰۰۰	٢٥ ± ٠ /٥٧ [b]
	تیمار ۲ :IU ٤٠٠٠	٢٢/٣٣ ±٠/٨٨ [b]
	تیمار ۳ :IU ۳۰۰۰	٢٢/٣٣ ±٠/٨٨ [b]
	شاهد	**١٧ ± ١ [a]**

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می باشد

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه میانگین میزان هموگلوبین و هماتوکریت خون،حجم متوسط گلبولی خون MCV،غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول های قرمز خونMCH، غلظت متوسط هموگلوبین های گلبول قرمز خونMCHC در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروها با یکدیگر نشان داد که در بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشده است (P>0.05).

جدول۶:جدول میانگین هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH، MCHC در شاهد و تیمار های مختلف

تیمار	هموگلوبین	هماتوکریت	MCV	MCH	MCHC
۵۰۰۰IU	۵/۴ ±۰/۰۵۷	۲۶/۳۳ ±۰/۳۳	۴۰۵/۶۷ ± ۲ /۴۰	۸۲/۶۶ ± ۰ /۳۳	۲۰/۴۳ ± ۰ /۱۳
۴۰۰۰IU	۶ ±۰/۳۷	۲۹/۶۷ ±۱/۴۵	۴۱۱± ۱۰	۸۳ ± ۰/۵۸	۲۰/۱۷ ±۰/۳۸
۳۰۰۰IU	۵/۵ ±۰/۱۵	۲۷/۳۳ ±۱/۲۰	۴۱۵/۳۳ ± ۱۲/۶۰	۸۳/۳۳ ± ۰/۶۷	۲۰/۱۳ ± ۰/۵۸
شاهد	۵/۸ ±۰/۱	۲۸ ± ۱	۴۰۸/۵ ± ۳/۵	۸۱/۵ ±۱/۵	۱۹/۹ ± ۰/۴

مقایسه میانگین میزان نوتروفیل،لنفوسیت،مونوسیت،ائوزونوفیل خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروها با یکدیگر نشان داد که بین تیمار ها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد(P>0.05).

جدول۷:جدول میانگین نوتروفیل،لنفوسیت،مونوسیت،ائوزونوفیل خون در شاهد و تیمار های مختلف

تیمار	نوتروفیل	لنفوسیت	مونوسیت	ائوزونوفیل
۵۰۰۰IU	۲۰/۳۳ ± ۱ /۲۰	۷۶/۳۳ ± ۰ /۸۸	۲ ± ۰ /۵۷	**۱/۳۳ ± ۰ /۳۳**
٤۰۰۰IU	۲۳/۳۳ ± ۲ /۶۰	۷۴/۶۳۳ ±۲/۶۰	۱/۶۷ ±۰/۳۳	**۰/٦٦ ±۰/۳۳**
۳۰۰۰IU	۲۴/۶۷ ± ۲/۷۳	۷۲/۳۳ ±۳/۸۴	۲ ±۰/۵۸	**۱ ±۰/۵۸**
شاهد	۲۱ ±۱	۷۸ ± ۱	۱/۵ ± ۰/۵	**۰/۵ ±۰/۵**

لازم به ذکر است که اگر چه اختلاف آماری معناداری در انواع گلبول های سفید خون در بین تیمارهای آزمایشی در پایان دوره دیده نشد ولی سطوح برخی از آن ها بیشتر از گروه شاهد بوده که بیانگر افزایش ایمنی غیر اختصاصی در قیاس با تیمار شاهد می باشد.

مقایسه میانگین درصد بقا در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروها با یکدیگر نشان داد که میزان زنده مانی بچه ماهیان در تیمار۲ بیش از شاهد و سایر تیمارهاست و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید(P<0.05).

جدول۸: جدول میانگین میزان درصد زنده مانی تیمار ها در پایان دوره

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
درصد زنده مانی	تیمار ۱ :۵۰۰۰ IU	۸۰ ±۵/۷۷ [a]
	تیمار ۲ :۴۰۰۰ IU	۹۶/۶۶ ±۳/۳۳ [b]
	تیمار ۳ :۳۰۰۰ IU	۸۶/۶۶ ±۳/۳۳ [ab]
	شاهد	۸۵ ± ۵ [ab]

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می باشد

Archive of SID

www.SID.ir

٤. بحث

با توجه به محدودیت های پژوهش های انجام گرفته در خصوص ویتامین D و با توجه به اینکه از ویتامین های محلول در چربی (A-D-E-K)،تنها در مورد نیاز قزل آلای رنگین کمان به ویتامین E مطالعات زیادی صورت پذیرفته است احتیاجات ویتامین D صرفا بر مبنای مطالعات مربوط به اضافه وزن و نبود علایم کمبود در پاسخ به متغیر ها تعیین شده است(۱۰)لذا مقایسه نتایج تحقیق حاضر با نتایج سایر پژوهش ها تا حد امکان و بر اساس منابع موجود صورت پذیرفته است. بررسی آلکالین فسفاتاز پلاسما خون در بچه ماهیان مورد آزمایش در تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش ویتامین D جیره،آلکالین فسفاتاز از کمترین غلظت (۳۰۰۰ IU) به بیشترین غلظت (۵۰۰۰ IU) افزایش یافته است. تحقیق حاضرکه بر روی بچه ماهیان قزل آلاانجام شد با نتایج Gupta در سال ۲۰۰۴ که بر روی بچه ماهی انگشت قد کپور هندی انجام شد اختلاف داشته است که با افزایش غلظت ویتامین D با کاهش این آنزیم مواجه شده بود که پیشنهاد داد افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز به جذب بهتر کلسیم کمک می نماید(۱۸).شاید یکی از دلایل کاهش این آنزیم در تحقیق گوپتا را بتوان کمبود ویتامین D جیره غذایی یا تفاوت در نوع گونه دانست و حتی درصد خلوص ماده غذایی و دقت ابزارها و روش های اندازه گیری در زمان حال دانست . در بررسی دیگری که بر روی قزل آلای رنگین کمان در سال ۱۹۸۲ توسط Barnett و همکاران انجام شد سطوح آلکالین فسفاتاز پلاسمای خون در قیاس با تیمار شاهد اختلاف معناداری نداشت که شاید دلیل این اختلاف با تحقیق حاضر را بتوان در غلظت های آن آزمایش دانست که سطوح ویتامین D3 ، ۲۵۰ و ۱۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D3 طراحی شده بود که حتی از غلظت استاندارد ۱۶۰۰ تا ۲۴۰۰ واحد بین المللی برای ماهی قزل آلا کمتر بوده است(۱۳).

در بررسی سطوح ویتامین D خون در تحقیق انجام شده در بچه ماهیان قزل آلا نشان داد که با افزایش مقادیر ویتامین D جیره غذایی با افزایش آن در پلاسمای خون مواجه خواهیم شد که با نتایج Barnett و همکاران در سال ۱۹۸۲ که بر روی قزل آلای رنگین کمان انجام شد مطابقت دارد(۱۲و۱۳). لازم به ذکر است که بین آلکالین فسفاتاز و کلسیم و فسفر و ویتامین D خون یک ارتباط مستقیم برقرار است که افزایش ویتامین D خون تمامی این موارد را افزایش خواهد داد. بررسی پارامترهای هماتولوژی در تحقیق حاضر نشان داد که مقادیرگلبول قرمز ، هموگلوبین ، هماتوکریت ، حجم متوسط گلبولی (MCV) ، غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) ، غلظت متوسط هموگلوبین های گلبول قرمز (MCHC) ، اختلاف معناداری با تیمار شاهد مشاهده نشد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج Miranda de Oliveira و همکاران که بر روی یک گونه ماهی منطقه آمازون در جنوب آمریکا به نام تامباکویی (*Colossoma macropomum*) انجام دادند تطابق داشته است که در آن تحقیق گلبول های قرمز خون از روز ۳۰ به بعد با روند کاهشی مواجه و تا پایان روز ۶۰ آزمایش در یک محدوده ثابت باقی ماند و مقادیر MCV و MCH و MCHC هیچ اختلاف معناداری نداشت(۲۰). در بررسی فاکتورهای خونی که توسط Barnett و همکاران در سال ۱۹۸۲ بر روی قزل آلای رنگین کمان صورت گرفت نشان داد که هیچ گونه تغییری در مقادیر هماتوکریت و هموگلوبین در پایان دوره از لحاظ آماری مشاهده نشد (۱۳) که با نتیاج این تحقیق انجام گرفته مطابقت داشته است . در تحقیق حاضر،افزودن سطوح مختلف ویتامین D به جیره غذایی تیمارهای آزمایشی بچه ماهیان قزل آلا، گلبول سفید خون را در پایان دوره با اختلاف معنادار با روند افزایشی مثبت مواجه ساخت که با توجه به درصد بازماندگی بالاتر در تیمار ۴۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D3 و همچنین افزایش ایمنوگلوبولین کل خون در سایر تیمارها در قیاس با شاهد،می توان گفت

Archive of SID

www.SID.ir

ویتامین D در بهبود سیستم ایمنی نقشی موثر داشته است که دلیل آن را می توان اینگونه توجیه کرد : زمانی که بدن هر موجود زنده ای با کمبود ویتامین D مواجه شود معمولا ضعیف شده و بدنشان قدرت کافی برای دفاع در مقابل باکتری ها و ویروس ها را نخواهد داشت.در واقع لنفوسیت های T سربازان بدن اند و اگر نتوانند به اندازه کافی ویتامین D در خون بیابند نمی توانند بسیج شده و در مقابل عفونت ها از بدن دفاع کنند.تا دو دهه پیش تصوری از ارتباط ویتامین D و سیستم ایمنی وجود نداشت اما بررسی های رو به افزایش سال های اخیر،نشان از گستردگی نقش این ویتامین در سیستم ایمنی دارد.گیرنده های ویتامین D به تعداد فراوان در لنفوسیت های T و ماکروفاژها وجود دارند(۹). مطالعات اپیدمیولوژیک و مطالعات ژنتیکی و همچنین با استفاده از مدل های حیوانی نقش حیاتی و پیچیده ویتامین D در عملکرد سیستم ایمنی بدن به اثبات رسیده است.شواهد زیادی مبنی بر نقش پیچیده این ویتامین در تنظیم پاسخ های ایمنی بدست آمده است.انواع مختلفی از سلول های ایمنی شامل سلول های فعال T و B و ماکروفاژها که به صورت شاخکدار می باشند.ویتامین D مانع عملکرد مستقیم لنفوسیت های T شده و بر روی سلول های آنتی ژن حاضر اثر گذاشته و این کار اثرات ضد تکثیری قوی روی سلول های CD4+T دارد.اخیرا در بحث ویتامین D گزارش داده اند که منجر به مهار تولید IL-17 که یک سایتوکین التهابی مهم برای دفاع در برابر باکتری های خارج سلولی است می شوند و در بیماری های خودایمنی و آلرژیک موثر هستند. سیستم ایمنی در ماهی ها تشابه اساسی با پستانداران و پرندگان دارند اما به دلیل خونسرد بودن مانند سایر واکنش های حیاتی آنها ایمنی شان نیز با توجه به گونه ماهی در دامنه حرارتی محدودی فعال می گردد و بدیهی است در این دامنه حرارتی حیاتی در محدوده کوچکتر فعالیت های ایمنی به حد اکثر خود می رسد(۱۶).

خون ماهیان نظیرخون انسان و بسیاری از مهره داران دیگر،شامل مایعی بنام پلاسماست که در داخل آن سلول های کرپوسکول های قرمز و سفید وجود دارد.گلبول های قرمز خون انتقال گاز اکسیژن در داخل خون را بر عهده داشته(۵) که تعداد گلبول های قرمز در آزاد ماهیان ۱ تا ۲ میلیون در میلی متر مکعب خون و تعداد گلبول های سفید خون در آزاد ماهیان ۱۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ سلول در هر میلی متر مکعب خون می باشد. گلبول های سفید در سیستم دفاعی و ایمنی بدن دخالت داشته و در برابر عوامل گوناگون بیماریزا در بدن ماهی مقاومت می کنند و پاسخ ایمنی مختلفی بوجود می آورند.وظیفه اصلی این سلول ها تولید پادتن بوده و تمامی گرانولوسیت ها و مونوسیت ها با بیگانه خواری ذرات خارجی به مبارزه با عوامل بیماریزا می پردازند(۶) که به طبع افزایش این سلول ها اثرات مثبت در فاکتورهای رشد خواهد گذاشت. بررسی درصد بازماندگی در بچه ماهیان در این تحقیق،حکایت از وجود درصد زنده مانی بالاتری در تیمار ۴۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D3 در قیاس با سایر تیمارها دارد که به طبع در تیمار۴۰۰۰ واحد بین المللی ویتامینD3 ،مقادیر ایمنوگلبولین و گلبول سفید نیز بالا بوده است.بنابراین می تواند استدلالی بر نقش این ویتامین در جیره غذایی بر سلامت موجود زنده باشد. ایمنوگلبولین ماهیان یک ماکروگلبولین می باشد و شباهت بسیار زیادی به IgM انسانی دارد که در تحقیقات فیلوژنیک از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا اولین ایمنوگلبولین تکامل یافته بوده و معمولا این کلاس ایمنوگلبولین در ماهی بررسی می شود(۱۹).بررسی سطوح ایمنوگلبولین ماهیان در تحقیق انجام شده در بچه ماهیان قزل آلا نشان داد که با افزایش مقادیر ویتامین D جیره غذایی با افزایش ایمنوگلبولین خون بچه ماهیان مواجه شدیم که بیانگر افزایش سیستم ایمنی است که به طبع افزایش گلبول های سفید خون که در ایمنی زایی نیز نقش دارند شاهد این مطلب می باشد.ویتامین D در سال‌های اخیر،موضوع داغ محافل تحقیقاتی بوده و مطالعات حاکی است

Archive of SID

www.SID.ir

علاوه بر بیماری‌های عفونی می‌تواند نقش حفاظتی در برابر بیماری‌های خودایمنی (تولید پادتن‌های مضر در بدن) داشته باشد. آبزی پروری بخش اساسی و در حال رشد از کشاورزی را در سراسر دنیا به خود اختصاص داده است که غذا و عملیات غذادهی و تامین عناصر اساسی،در پایداری ،سودآوری و مناسب بودن آبزی پروری مدرن،تعیین کننده است. علاوه بر این، تغذیه نقش اساسی را در عملکرد سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری ها ایفا می کند که در آن کیفیت غذا و مدیریت تغذیه امری حیاتی می نماید.از آنجا که برای تولید کالاهای مناسب برای مصرف انسانی،آبزی پروری صنعتی جوان است که در آن استفاده از روش های مدرن و پیشرفته به عنوان صنعتی سودآور عمری کمتر از دو دهه دارد بایستی برای تولیدی با بازدهی مناسب و با کیفیت،یافته هایی وسیع در زمینه هر گونه از آن ها داشته باشیم(۴). رشد و سلامت انسان با تغذیه سالم ارتباط دارد و در این ب‌ماهی ماده غذایی مفیدی است که در مناطق شمالی و جنوبی کشورمان جزو مواد اصلی برنامه غذایی محسوب می‌گردد.ماهی دارای ارزش تغذیه ای بسیار بالایی است که اکثر مواد مغذی مفید و ضروری برای انسان را به تنهایی داراست.ماهی یکی از منابع خوب آهن است که در خون سازی و همچنین حفظ مقاومت بدن در برابر میکروب‌ها و پیشگیری از کم خونی ناشی از فقر آهن مهم است. بنابراین حیاتی است که در سایت های آبزی پروری به جیره های غذایی موجود زنده توجه کافی شود تا به تولید یک ماده غذایی در جهت تامین سلامت جامعه بینجامد. لازمه این کار،پیشرفت تکنیک های تولید غذا،دستیابی به مقادیر مناسب در جیره غذایی ماهی در هر گونه با توجه با شرایط آب و هوایی کشورمان است. در مجموع اختلافات موجود در نتایج این تحقیق با یافته های دیگر محققان را شاید بتوان به گونه، جنس،اندازه، سن، شرایط کارگاهی، طول دوره، پارامترهای کیفی آب، رفتارهای تغذیه ای،درجه خلوص ویتامین،اختلاف در شرکت های سازنده ویتامین،فرمولاسیون جیره غذایی بکار رفته و نحوه اضافه کردن ویتامین به غذا دانست. نتایج این تحقیق اثبات کرده است که اضافه کردن ویتامین D در جیره غذایی ، با افزایش سطوح گلبول های سفید خون و ایمنوگلبولین خون که می تواند با افزایش سیستم ایمنی و مقابله با عوامل بیماری زا نقش داشته باشد ارتباط دارد.

سپاسگزاری

از دکتر گلپایگانی به دلیل در اختیار قرار دادن محل اجرای آزمایشات و مزرعه تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا و همچنین دکتر جوادی به دلیل تامین بچه ماهی قزل آلای این پروژه و در اختیار قرار دادن تجربیات چندین ساله خود سپاسگزاری می نمایم .

منابع

۱. مازندران،ا. ن.، ۱۳۸۱. راهنمای علمی تغذیه و نهاده های غذایی و دارویی آبزیان در ایران. چاپ اول. انتشارات نوربخش.۲۱۶ص.

۲.جمالزاده، ح.ر.، کیوان، الف.، جمیلی،ش.، عریان،ش.، سعیدی،ع. الف.، ۱۳۸۰. بررسی فاکتورهای خونی آزاد ماهی دریای خزر. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.دانشکده علوم و فنون دریایی. گروه بیولوژی دریا.

۳.دروموند سدویک ،ا.، ۱۳۸۶.راهنمای پرورش و تکثیر ماهی قزل آلا. ترجمه عبدا... مشائی. چاپ سوم. انتشارات دریاسر .۲۰۸ص.

۴.رجب بیگی، م.، یاسمی، م.،۱۳۸۹. مدیریت شیلاتی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه جامع علمی کاربردی جهاد کشاورزی.۲۲۶ص.

۵.شفرد، ج.، برومیج،ن.،۱۳۸۱. پرورش متراکم ماهی-جلد اول. ترجمه ستاری و معتمد. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه

Archive of SID

www.SID.ir

گیلان.۱۹۴ص.

۶.عبدا... مشائی، م. ۱۳۸۶.کاربردهای فیزیولوژی در پرورش ماهی.چاپ اول. انتشارات دریاسر .۱۲۸ص.

۷.علویون،س.، سیدی،ا. ۱۳۸۲. پرورش توام ماهی با کشاورزی. چاپ اول. موسسه فرهنگی و هنری شقایق روستا.۶۴ص.

۸.فروزانفر،ع. ۱۳۸۴ .تکثیر و پرورش آزاد ماهیان .چاپ اول. موسسه تحقیقات شیلات ایران.۱۷۵ص.

۹.نیکنام ،م. ۱۳۸۱. ویتامینD وسیستم ایمنی . مجموعه مقالات پیرامون اختلالات ویتامین D . مرکز تحقیقات غدددرون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران. ص۶.

۱۰.وبستر،ک.د.، لیم،ک.، ۱۳۸۵. تغذیه و نیازهای غذایی ماهیان در آبزی پروری (با تاکید بر گونه های قابل پرورش در ایران). ترجمه ابراهیمی،ع.، بیرقدار،ا. چاپ اول. مرکز انتشارات جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان.۲۹۲ص.

۱۱.وثوقی،غ. مستجیر،ب.، ۱۳۷۳. ماهیان آب شیرین. چاپ ششم. انتشارات دانشگاه تهران.۳۱۷ص

12.Barnett,B.J.,Jones,G.,YoungCho,C.,Slinger,S.J.,1982.The Biological activity of 25-Hydroxycholecalciferol and 1,25-Dihydroxycholecalciferol for Rainbow Trout. Department of Nutrition.College of biological Science.112.PP:2020-2026.

13.Barnett,B.J.,Young Cho,C.,Slinger,S.J.,1982.Relative Biopotency of Dietary Ergocalciferol and Cholecalciferol and the Role of and Requirement for Vitamin D in Rainbow Trout.Department of Nutrition.College of biological Science.112.PP.2011-2019.

14.Dacie,S.J.V.,Lewis,S.M.,1984.Practical haematology.Sixth editon.British Library Cataloguing in Publication Data.PP:451.

15.EUROIMMUN,AG.,Stocker,W.,Schlumberger,W.,2007.Alle Beitrang zum Thema Autoimmundiagnostik.In:Gressner A,Arndt T(Hrsg.)Springer Lexikon Klinische Chemie.Medizinische Lbordiagnostik von A-Z.Springer Medizin Verlang,Heidelberg 1.

16.ELange,N.,Litonjua,A.,MHawrylowicz,C., Weiss,S.,2009.Vitamin D the immune system and asthma.Expert Rev Clin Immunol.5(6).PP:693–702.

17.Fischbach,F.,Zawta,B.,1992.Age-dependent reference limits of several enzymes in plasma at different measuring temperatures.Klim Lab.38.PP:61-555.

18.Gupta,A.K.,2004 Effect of vitamin D Diets on certain biological and biochemical profiles in the fingerling of catla catla.Department of Limnology and Fisheries.38(2).PP:97-100.

19.Magnadottir,B.,1998.Comparison of immunoglobin(IgM)from four Fish species.Icelandic Agricultural Sciences.12:PP:47-59.

20.Miranda de Oliveira,A.,De Assis Mendes,F.,Leite Menezes,A.C.,Luis Val, A., 1989.Effect of Vitamin D Supplementation on Haematoligical Parameters and Weight Gain of TAMBAQUI*(Colossoma macropomum)*.j.Instituto Nacinal de Pesquisas daAmazonia.PP:113-118.

21.Siwicki, A. K.,Anderson,D.P.,Rumsey,G. K.,1993. Nonspecific defense mechanisms and disease resistance are enhanced in rainbow trout fed immunostimulants. In: Modulators of Fish Immune Responses.Models for Environmental Toxicology, Biomarkers, Immunostimulators.1.PP:93-113.

22.Scapigliati,G.,Romano,N., Abelii,L.,1999.Monoclonal antibodies in fish immunology ;identification , ontogeny and activity of T-and B-lymophocytes.Aquaculture.172. PP: 3-28.

23.Sanchez,C.,Dominguez,J.,Coll,J.,1989.Im munoglobulin heterogeneity in the rainbow trout ,salmo gairdneri Richardson.Journal of Fish Diseases.12:PP: 459-465.

Archive of SID

www.SID.ir

24.Thomas L.Clinical Laboratory Diagnostice,1989.TH-Books Verlagsgesellschaft. First edition.PP:136-46.
25.Z.Klin.Chem.Klim.Biochem(Zeitschrift klinische Chemie and klinische Biochemie).,1972. Standarddization ofmethods for measurement of enzymatic activities in biological fluids. Recommendation of the German Society of Clinical Chemistry.10.PP:92-182.

Archive of SID

www.SID.ir