

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

• 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

• امیر پرویز 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: ۱۳۹۴-۱۱-۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۳-۰۳

Email: Darabitarab@gmail.com



چکیده

ماهی قزل آلابی رنگین کمان یکی از مهم ترین گونه های آزاد ماهیان با ارزش اقتصادی بالا برای پرورش جهانی بوده و بخش بزرگی از میزان تولید آبیان را به خود اختصاص می دهد و حضور پررنگی در زنجیره غذایی دارد. لذا در این تحقیق به بررسی عملکرد فعالیت آنزیم های کبدی این ماهی در مواجهه با غلظت های مختلف ویتامین C پرداخته شد. تعداد ۷۰ قطعه ماهی قزل آلابی رنگین کمان با میانگین وزن 10 ± 170 گرم، در تانک های ۷۰ لیتری قرار گرفتند. برای این مطالعه سه تیمار در نظر گرفته شد که شامل (شاهد، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم واحد غذا) بود. پس از قرارگیری ماهیان در معرض غلظت های مختلف ویتامین C در طی روزهای پنجم و دهم به منظور تهیه سرم، نمونه های خون ماهیان استحصال گردید. در روز دهم فعالیت آنزیم ALP در گروه های تیمار ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی داری داشت ($P < 0.05$). در روزهای پنجم و دهم فعالیت آنزیم ALT در تیمار ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0.05$). روز پنجم در فعالیت آنزیم های ACP و AST در گروه های تیمار ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به هم اختلاف معناداری مشاهده شد ($P < 0.05$) و هر دو نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی داری داشتند ($P < 0.05$). در روز دهم فعالیت آنزیم AST در تیمار ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0.05$). به طور کلی می توان نتیجه گرفت که غلظت ۴۰۰ میلی گرم ویتامین C در جیره غذایی ماهی قزل آلابی رنگین کمان توانایی تاثیر بر بهبود عملکرد آنزیم ALT را دارد.

کلمات کلیدی: ویتامین C، پرورش ماهی، ماهی قزل آلابی 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: Darabitarbar, 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: Darabitarbar@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 به عنوان یکی از ضروری ترین مواد مغذی است، که در ماهیان نقش بسیار مهمی را در تشکیل کلاژن، برای بافت های پیوندی شامل غضروف، استخوان و پوست ایفا می کند و بر روی شاخص های ایمنی نقش بسیار مهمی دارد (۶). ماهی قزل آلی رنگین کمان از نوع ماهیان سردآبی است و در زیرگروه ماهیان آزاد جای می گیرد. قزل آلی رنگین-کمان متعلق به آب های سرد و شفاف، بستر سنگی، سنگلاخی و شنی است. این ماهی در شرایط طبیعی در رودخانه ها و دریاچه های سرد و خنک زیست می کند (۲۷). اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی به طور عمده در تشخیص وضعیت فیزیولوژی ماهی و تعیین حالت عمومی سلامتی ماهی استفاده می شود. از جمله فاکتورهای بیوشیمیایی مهم، آنزیم های کبدی ALT (آلانین آمینو ترانسفراز)، AST (اسپاراتات آمینو ترانسفراز)، ACP (اسید فسفاتاز) و ALP (آلکالین فسفاتاز) هستند، که از سنجش آن ها به عنوان یک شاخص آزمایشگاهی استاندارد جهت بررسی اختلالات کبدی در موجودات استفاده می شود (۲۳). دو آنزیم AST و ALP در

هنگام ضایعه از بافت های مختلف از جمله عضلات، استخوان و قلب خارج می شوند. به عبارتی افزایش معنادار این دو آنزیم ممکن است در نتیجه نشت از بافت های مختلف و جمع اثر آن ها باشد (۳۳). به علت این که آنزیم ALT در سیتوپلاسم سلول های کبدی زیاد است و هنگام آسیب از غشای سلولی عبور می کند و وارد خون می شود، این آنزیم به عنوان شناساگر اختصاصی آسیب کبدی شناخته شده است (۳۳). آلکالین فسفاتاز نیز به طور عمده از کبد سرچشمه می گیرد و مقدار آن در بیماری های مجاری کبدی، صفراوی و گسترش ضایعات کبدی افزایش می یابد (۱۲). آنزیم ALP موجود در کبد نقش مهمی در متابولیسم گلیکوژن ایفا می کند و می تواند آنزیم های 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 استرس زا در ارتباط بوده و همچنین سبب کاهش نرخ فسفوریلاسیون شده و از فسفوریلاسیون اکسیداتیو در زنجیره تنفسی جلوگیری می نماید (۲۶). مطالعات نشان می دهند که اکثر ماهیان استخوانی به دلیل عدم وجود آنزیمی تحت عنوان آل-گلونولاکتون

اسپری شد. پلت‌های آغشته شده به روغن کانولا به تمام تیمارها داده شد. روش مخلوط کردن جیره با ویتامین براساس روش 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 تشتت پلاستیکی ۵ لیتری که حاوی ۲۰۰ واحد در میلیون‌بودر بیهوش کننده گل میخک بود، بیهوش شدند و سپس از ماهیان نمونه خون گرفته شد. برای تهیه سرم به‌منظور اندازه‌گیری آنزیم‌های سرمی AST، ALT، ALP، ACP، دو تا سه سی سی خون به داخل ویال‌های بدون انعقاد ریخته و در داخل سانتریفیوژ، ۴۰۰۰ دور به مدت 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 ($P>0/05$). همچنین در طی مدت زمان آزمایش (پنج و ۱۰ روز) هیچ‌گونه تلفاتی در گروه ماهیان شاهد مشاهده نشد.

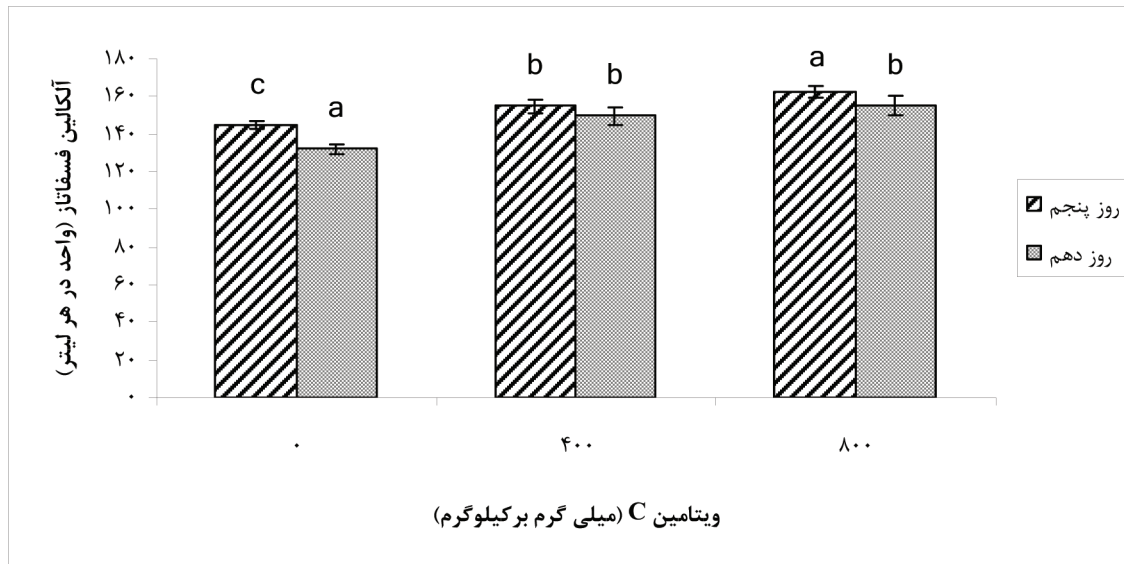
در روز پنجم فعالیت آنزیم ALP در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده شد. تفاوت در سطح احتمال ($P<0/05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد. در روز دهم فعالیت آنزیم ALP در گروه‌های تیمار ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). ولی غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به هم اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>0/05$).

در روز پنجم، فعالیت آنزیم ALT در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). همچنین در تیمار ۸۰۰ نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده

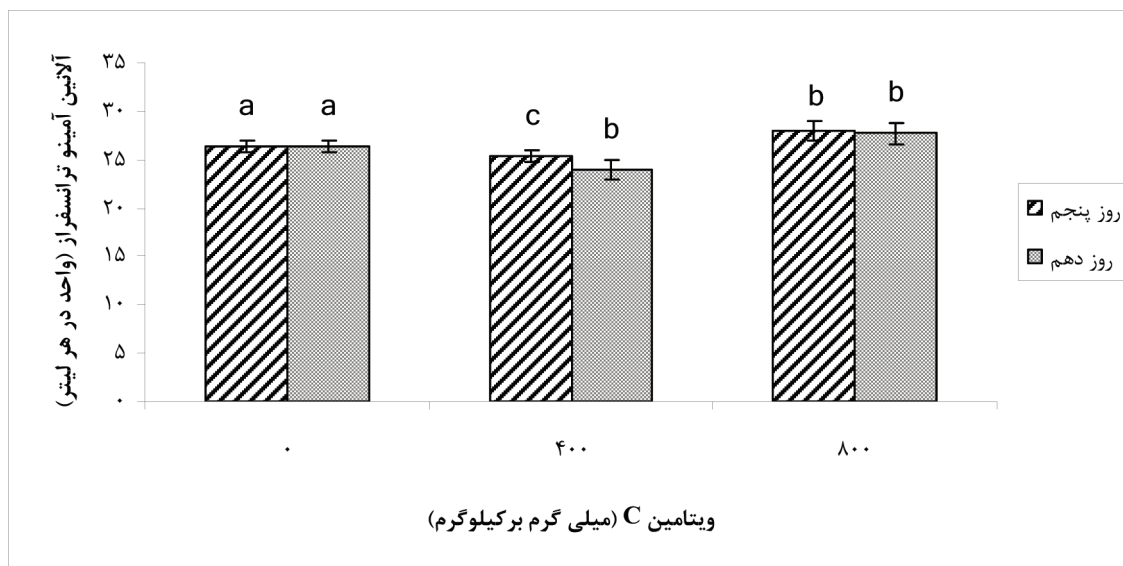
اکسیداز قادر به سنتز ویتامین C از ال-گلوکز نبوده و لذا ضروری است که مقدار مورد نیاز این ویتامین از راه تغذیه خارجی تامین شود (۲۵). ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نیز از ماهیان استخوانی است که قادر به سنتز این آنزیم نبوده و باید این ویتامین را از راه تغذیه به ماهی داده شود. لذا با توجه به یکی از ویژگی‌های ویتامین 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

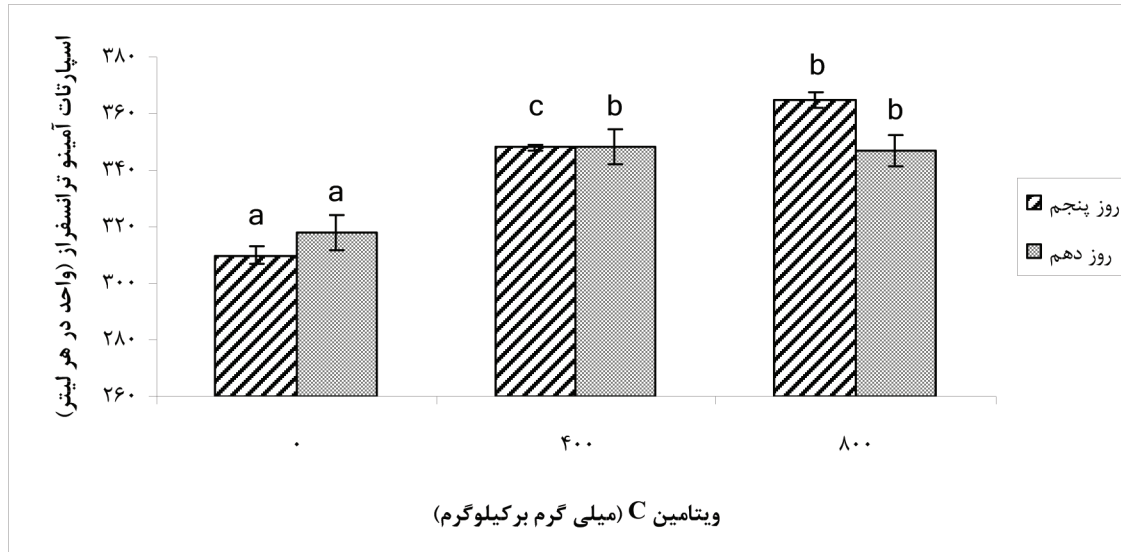
در فروردین ماه ۱۳۹۴، تعداد ۷۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزن 10 ± 170 گرم (به‌منظور ارزیابی اثر ویتامین بر روی ماهیان قبل از رسیدن به مرحله پرواری) از مرکز ماهی‌سرای کهر با نام تجاری اکسیر سلامت واقع در شهرستان کرج خریداری شد. سپس ماهیان به آزمایشگاه تکثیر و پرورش دانشگاه تهران منتقل شدند. 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 22 ± 20 درجه سانتی‌گراد بودند. که به‌صورت ۲۴ ساعته هوادهی می‌شدند. ماهیان در دوره نوری ۱۳ ساعت تاریکی و ۱۱ ساعت روشنایی به مدت 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 فیزیکیوشیمیایی آب مورد استفاده در کارگاه شامل دما 22 ± 20 درجه سانتی‌گراد، پی‌اچ با دستگاه قابل حمل سنجش پی‌اچ (مدل تی اس، ساخت کشور تایوان)، $0/4 \pm 7/2$ و اکسیژن محلول با دستگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن) مدل دی او - ۵۵۱۰، ساخت کشور تایوان)، $0/2 \pm 6/74$ و سختی آب 16 ± 185 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 آب پاش به‌روی پلت‌ها



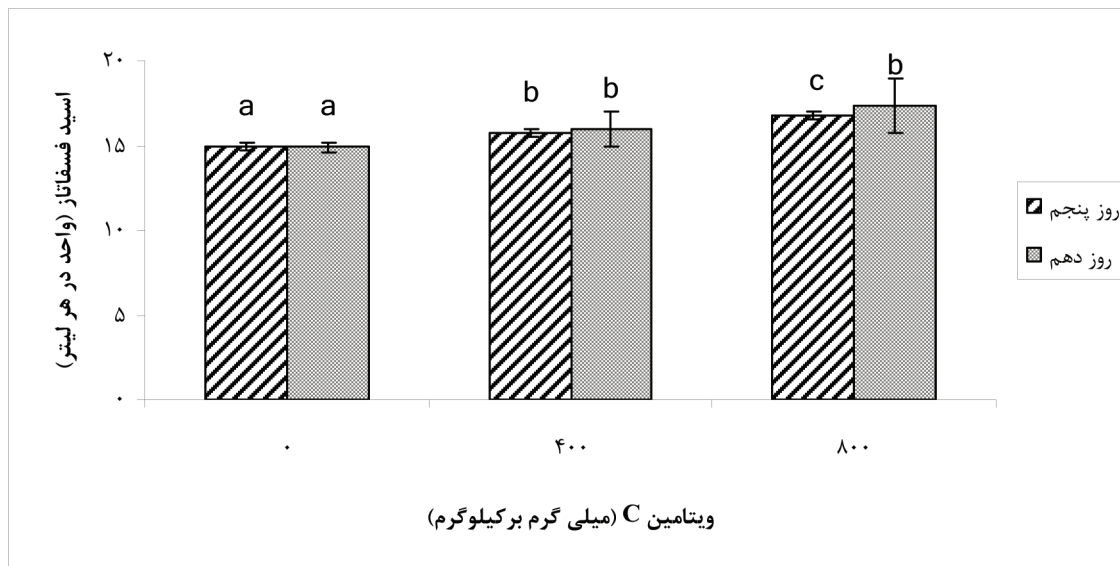
شکل ۱- بررسی تغییرات آنزیم آلکالین فسفاتاز در غلظت‌های مختلف ویتامین C در روزهای پنجم و دهم



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

ویتامین C به راحتی از دستگاه گوارش جذب می‌شود و به طور گسترده در تمام بدن پخش می‌شود. این ویتامین به میزان زیادی در افزایش و تداوم واکنش‌های ایمنی و سازگاری نقش داشته و فعالیت‌های بیولوژیکی مانند مقاومت در برابر استرس‌ها و همچنین مسمومیت‌ها و فعالیت‌های ایمنی در لاروهای گونه‌های مختلف آبزیان توسط به‌کارگیری مکمل‌های ویتامین C بهبود می‌یابد. نقش مواد محرک عمدتاً بالا بردن ایمنی غیر اختصاصی است (۳۰). در بررسی که صیاد بورانی و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی تاثیر سطوح مختلف ویتامین C و ویتامین E در جیره بر پارامترهای رشد و سیستم ایمنی ماهی آزاد دریای خزر انجام دادند، نتایج نشان داد که در بین تیمارهای مختلف ویتامین C و E، ماهیان سه تیمار (۷، ۸ و ۹) که با غذای حاوی ویتامین C و ویتامین E به ترتیب به مقدار بالاتر ویتامین C یعنی (۳۰۰-۴۰۰)، (۳۰۰-۳۰۰)، (۲۰۰-۳۰۰) میلی 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 شدند، کمترین افزایش وزن بدن و درصد بازماندگی را داشتند (۲۹). مونتررو و همکاران در سال ۱۹۹۸ با تجویز ویتامین‌های C و E بهبود پاسخ ایمنی و افزایش مقاومت در برابر استرس‌های محیطی را در *Sparus aurata* گزارش دادند (۲۱).

طبق پژوهشی که توسط وینستون و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام گرفت مشخص شد ویتامین E، اسید آسکوربیک (ویتامین C)، یوریک اسید و گلوکاتینون، در حدود ۷۰ درصد از سهم آنتی‌اکسیدانی کل را به خود اختصاص می‌دهند. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده سهم قابل توجه ویتامین E و C در ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل می‌باشد (۳۷). Gatlin و همکاران در سال ۲۰۰۲ دریافتند که ویتامین C نقش مهمی را در فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف بدن ماهی ایفا می‌کند (۱۱). در خلال تحقیقات تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی که بر گونه‌های مختلفی از آبزیان صورت گرفت، ثابت شد که مکمل ویتامین C باعث تقویت عملکرد رشد 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 آبزیان دارای تاثیر مثبتی بر فاکتورهای ایمنی از جمله تحریک فعالیت راه میانبر کمپلمان و لیزوزیم سرم، مقدار آنتی‌بادی کل پلاسما، تشدید عمل بیگانه‌خواری گلبول‌های سفید و تکثیر لنفوسیت‌ها می‌شود (۲). مطالعه حاضر نشان داد که مکمل ویتامین C در غلظت بالای ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در جیره غذایی ماهی قزل آلا رنگین کمان باعث افزایش آنزیم‌های AST و ALP کبدی در خون پس از پنج و ۱۰ روز شد که این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده موثر نبودن ویتامین C در غلظت بالا باشد. ولی ویتامین C تاثیر چندانی بر فعالیت آنزیم‌های ACP و ALT در غلظت ۸۰۰ میلی گرم نشان نداد. همان‌گونه که در تحقیقات پیشین نیز نشان داده شده است، ویتامین‌ها تنها در غلظت‌های معینی دارای اثر مثبت هستند و بالا رفتن غلظت بیش از حد مطلوب اثر آنتاگونیستی بر سلامت ماهی دارد (۱۶). در استفاده از محرک‌های ایمنی برای تحریک و ارتقای سیستم ایمنی آبزیان باید دقت زیادی در مورد مقدار ماده مورد استفاده به عمل بیاید. گونه‌های مختلف آبزیان و نوع ماده محرک ایمنی به کار برده شده در تعیین مقدار آن بسیار حائز اهمیت هستند، به‌گونه‌ای که یک محرک ایمنی خاص ممکن است در گونه‌های مختلف آبزیان با مقادیر متفاوتی قادر به تاثیر مثبت بر سیستم ایمنی گردد و یا ممکن است که یک محرک

شد ($P < 0/05$). در روز دهم، فعالیت آنزیم ALT در تیمار ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$) و همچنین در تیمار ۸۰۰ نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). در تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ نسبت به هم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$).

در روز پنجم، فعالیت آنزیم AST در گروه‌های تیماری ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C اختلاف معناداری نشان داد ($P < 0/05$) و هر دو گروه نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشتند ($P < 0/05$). در روز پنجم در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0/05$). روز دهم فعالیت آنزیم AST در تیمار ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). ولی تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P > 0/05$).

در روز پنجم، فعالیت آنزیم ACP در گروه‌های تیمار ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). همچنین در تیمار ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به تیمار شاهد و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). در روز دهم، فعالیت آنزیم AST در تیمار ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$). ولی تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C نسبت به هم اختلاف معناداری نداشتند ($P > 0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، تغییر در سطوح آنزیم‌های ALT، AST، ACP و ALP در سرم 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 سرمی، ALT، ACP، AST و ALP گردید که شامل افزایش معنی‌داری این آنزیم‌ها در غلظت ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C در روزهای پنج و ۱۰ شد. در این مطالعه همچنین افزایش غلظت آنزیم‌های ALT و ALP مشاهده شده در غلظت ۸۰۰ میلی گرم ممکن است به دلیل افزایش آنابولیس یا کاهش کاتابولیس آن‌ها باشد (۵). غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ویتامین C باعث کاهش فعالیت آنزیم ALT پس از ۱۰ روز نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین ویتامین C بیشترین تاثیر را در فعالیت این آنزیم نشان داد. به علت این که ALT در سیتوپلاسم سلول‌های کبدی زیاد است و هنگام آسیب از غشای سلولی عبور و وارد خون می‌شود، این آنزیم به عنوان شناساگر اختصاصی آسیب کبدی شناخته شده است (۱۲).

ویتامین C، آنتی‌اکسیدانی با وزن مولکولی پائین است که گونه اکسیژن فعال (ROS) مایع را از طریق انتقال خیلی سریع الکترون هضم کرده و از پراکسیداسیون چربی جلوگیری می‌کند (۹). طی تحقیقات بسیاری که انجام شده مشخص شده است که از میان ویتامین‌ها، ویتامین C بر سیستم ایمنی و افزایش مقاومت آبزیان نقش موثرتری نسبت به بقیه ویتامین‌ها دارد. از نظر فرمول شیمیایی این ویتامین از ساده‌ترین انواع ویتامین‌هاست و شباهت ساختمانی نسبی با اسید آسکوربیک دارد (۲۵).

ویتامین E بر آنزیم پاراکسوناز انجام شد، نتایج نشان داد که دریافت خوراکی ویتامین E یک عامل پیش‌بینی‌کننده برای فعالیت آنزیم پاراکسوناز بود و افزایش دریافت این ویتامین با افزایش فعالیت آنزیم پاراکسوناز همراه بود (۳). در این مطالعه افزایش ویتامین 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 سلنیوم و به‌خصوص مصرف هم‌زمان هر دو، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی کبد تقویت شده و به‌میزان زیادی ضایعات ناشی از بالا رفتن قند خون جبران می‌شود (۱). سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن شامل عوامل آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد. از آن جمله می‌توان به ویتامین E، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز اشاره نمود (۱۴). گارسیا و همکاران بهبود برخی فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی (*Piaractus mesopotamicus*) که با جیره غذایی ویتامین E و C غذایی شده بود را گزارش نمودند و همچنین افزایش مقاومت در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا را در تیمارها مشاهده کردند (۱۰).

با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر و مطالعات اخیر سایر محققان در سایر گونه‌های جانوری از جمله ماهی، به‌نظر می‌رسد که ویتامین C در روش خوراکی قادر است باعث بهبود شاخص آنزیمی ALT که شناساگر اصلی کبد می‌باشد در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C در طی روزهای پنجم و دهم شود. ولی این ویتامین بر روی سایر آنزیم‌های کبدی تاثیر قابل توجهی نشان نداد و حتی باعث افزایش آنزیم‌های AST و ALP در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ در طی روزهای پنجم و دهم شد، که با افزایش میزان غلظت ویتامین C (۸۰۰ میلی‌گرم)، میزان فعالیت آنزیم‌های مذکور در سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز افزایش پیدا کرد. تعیین مقادیر بهینه ویتامین‌ها در جیره غذایی آبزبان پرورشی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. با افزودن ویتامین C به جیره غذایی ماهیان پرورش یافته می‌توان از اثرات تخریبی بیماری‌ها و آلاینده‌ها تا حدودی کاست و باعث افزایش سیستم ایمنی بدن در پاسخ به استرس‌های محیطی که خود عاملی بر افزایش آنزیم‌های کبدی است، شد. ولی برای رسیدن به این امر باید مطالعات بیشتری 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.

ایمنی در گونه‌های آبزبان تاثیر مطلوب و در گونه دیگر بی‌تاثیر یا همراه با تاثیرات منفی باشد (۱۵). تجویز خوراکی عملی‌ترین روش برای استفاده و معرفی محرک‌های ایمنی است، اما با این حال تاثیرات و عواقب استفاده طولانی مدت محرک‌های ایمنی به‌صورت خوراکی هنوز چندان واضح و مشخص نیست (۳۸).

تاتینا و همکاران در سال ۲۰۱۰ تاثیر ویتامین C و E را بر فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی در تاس ماهی (*Acipenser 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 سال ۲۰۱۲ به بررسی بهبود شاخص‌های رشد و برخی از پارامترهای پاسخ ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده توام از ویتامین C و پرپیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* پرداختند، نتایج نشان داد که استفاده توام ویتامین C (به میزان یک گرم در کیلوگرم) و پرپیوتیک (به میزان ۷ × ۱۰ CFU) می‌تواند شاخص‌هایی نظیر وزن نهایی، درصد افزایش وزن بدن و ضریب رشد ویژه و پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای (فعالیت لیزوزیم، فعالیت راه میانبر کمپلمان سرم و مقدار آنتی‌بادی تام پلاسما) را بهبود ببخشد (۳۴)، اما برای به‌دست 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 رنگین‌کمان انجام دادند، نتایج تنش‌های دمایی نشان داده است که ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف ویتامین C بازماندگی بیشتری نسبت به ماهیان تغذیه شده بدون ویتامین C داشتند (۲۴). در مطالعه‌ای که میار و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی اثر سطوح مختلف مکمل غذایی ویتامین C و ویتامین E بر روی شاخص‌های خونی و عملکرد رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداختند، نتایج نشان داد که مکمل ویتامین C و E در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث بهبود رشد 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 کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام داد، نتایج نشان داد که در تیمارهای ویتامین C (۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ضریب رشد ویژه (SGR) و بازده تبدیل غذایی (FCE) به‌طور قابل توجهی افزایش یافت ($P < 0.05$) و بالاترین ضریب رشد ویژه در تیمار ۱۲۰۰ میلی‌گرم مشاهده شد، اما اختلاف معناداری در میزان بقای مشاهده شده در بین تیمارها وجود نداشت ($P > 0.05$).

اگرچه ارتباط اثرات نیازمند بررسی عوامل استرس اکسیداتیو و آنزیم‌های شرکت‌کننده در دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، مطالعات نشان می‌دهند که آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامین E و C، استرس اکسیداتیو را هم در حالت استراحت و هم در پاسخ به فعالیت کاهش داده‌اند (۱۸). براساس شواهد به‌دست آمده، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها روش امیدوارکننده‌ای برای درمان آسیب‌های کبدی به‌نظر می‌رسد. مصرف ویتامین E با دوز بالا می‌تواند باعث بهبود فعالیت انسولین و کاهش سطح پلاسمایی انسولین و کاهش سطح قند خون به‌وسیله کاهش استرس اکسیداتیو سلولی، تغییر خواص غشا و کاهش فعالیت‌های التهابی شود (۱۸). در مطالعه‌ای که توسط آویرام و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی اثر

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. Fakhrazadeh. 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.

