فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۳، جلد ۱۱، شماره۴، پائیز۹۷، صفحه ۷۵ تا ۸۵
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

بررسی برخی شاخص های خونی، آنزیمی و ایمنی ماهی کپور(*Cyprinus carpio*) تغذیه شده با سطوح مختلف ویتامین های C و E

مجید محمدنژاد [۱]، سهیل شاهرخی[۲]، افشین قلیچی[۳]
۱-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بندرگز، دانشیار گروه شیلات، بندرگز، ایران: **majid_m_sh@bandargaziau.ac.ir**
۲-دانش آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، گروه شیلات، آزادشهر، ایران.
۳-دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزدشهر، گروه شیلات، آزادشهر، ایران.

تاریخ دریافت:۹۶/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: ویتامین ها ترکیبات آلی هستند، که اهمیت حیاتی برای ماهیان داشته و کمبود آن ها باعث اختلالات شدیدی در بدن ماهی می گردد و از آن جا که ماهی ویتامین را فقط از طریق غذا جذب می نماید لذا در این تحقیق به بررسی اثر سطوح مختلف ویتامین های C و E بر فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی کپور انجام پذیرفت.

روش کار: تحقیق جاری با ۹ جیره غذایی شامل ترکیبی از ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C و ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم ویتامین E به مدت ٦ هفته انجام پذیرفت. در پایان بررسی خون‌گیری از ماهیان با استفاده از قطع ورید ساقه دمی انجام و اندازه گیری فاکتورهای خونی، آنزیمی و ایمنی در آزمایشگاه خون شناسی انجام پذیرفت.

یافته ها: نتایج آنالیز خون نشان داد که از نظر آماری بین گروه های مورد بررسی از نظر میزان گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، لنفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل، نوتروفیل، MCH و MCV اختلاف معنی دار آماری مشاهده می گردد(P<۰/۰۵). از لحاظ میزانMCHC بین گروه ها اختلاف معنی دارآماری مشاهده نمی گردد(P>۰/۰۵). با افزودن ویتامین های C و E از میزان شاخص های آنزیمی لاکتات دهیدروژناز، آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارات آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز کاسته و میزان فعالیت لایزوزیم، کمپلمان ۵۰(ACH50) و IGM بیشتر می گردد. نتایج بررسی نشان داد که در اکثر شاخص های مورد بررسی میزان ٤۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا ویتامینC و E باعث بهبود عملکرد می گردد.

نتیجه گیری: افزودن مقادیر مختلف ویتامین های C و E باعث افزایش فاکتورهای خونی و بهبود عملکرد سیستم ایمنی می گردد.

واژه های کلیدی: ویتامین Cو E، خون شناسی، آنزیمی، ایمنی، ماهی کپور.

مقدمه

ماهی کپور یکی از مهم ترین ماهیان پرورشی است که دارای ارزش اقتصادی بالا می باشد. استفاده از غذای مناسب و با کیفیت در پرورش آبزیان از جمله ماهی کپور بسیار مهم است. واضح است که استفاده از رژیم غذایی با کیفیت بالا، به خصوص با توجه به محتوای ویتامین برای تقویت آبزی پروری امری حیاتی می باشد. ویتامین-ها مواد آلی هستندکه برای رشد و نگهداری سلامت بسیاری از حیوانات از جمله ماهی ضروری می باشند(۲۵). ثابت شده است که ویتامین ها یکی از مهم ترین مواد مغذی هستند که از جنبه های مختلف شامل سیستم ایمنی، رشد و بقا ماهی را تحت تاثیر قرار می دهند(۲۵). اسید اسکوربیک(ویتامینC) برای همه حیوانات مهره دار مورد

نیاز است. ویتامین C نقش مهمی در رشد، تشکیل کلاژن، آهن و متابولیسم، هماتولوژی، تولید مثل، پاسخ به استرس‌ها، بهبود زخم و پاسخ ایمنی دارد(۳۲). هم چنین ویتامینC آنتی اکسیدان قوی است که از اکسیداسیون چربی های کم چرب محافظت می کند، اکسیدان های مضر در معده را کاهش می دهد و جذب آهن را افزایش می دهد(۲۰). تاثیر ویتامین C در افزایش گلبول قرمز خون می‌تواند موجب انتقال و عرضه بیشتر اکسیژن در خون ماهی و در نهایت در بافت ها شده و موجب ارائه پاسخ فیزیولوژیکی بهتر در ماهی شود(۱۶). کمبود ویتامینC سبب تغییر شکل در استخوان یا بافت سخت می‌شود(۳۵)، در نتیجه بسیاری از حیوانات آبزی وابسته به منابع ثابت ویتامینC از طریق غذا هستند(۱۸). هم چنین این ویتامین باعث افزایش مقاوت ماهی در برابر تنش های محیطی می گردد و بر روی پارامترهای خونی موثر است(۶). ویتامینE را دسته ای از ترکیبات تحت عنوان آلفا توکوفرول ها تشکیل داده اند که آلفا توکروفرول مهم ترین آن ها می باشد. ویتامین E به فرمول($C_{22}H_{50}O_2$) یک ترکیب آلی هتروسیکلیک مشتق از هسته کرومان ۲ است. به طور کلی ویتامین E به گروهی از ترکیبات فعال که به یک دیگر شباهت زیادی دارند، اطلاق می گردد(۳۱، ۷). اسید اسکوربیک(Vit C) و α-توکوفرول(Vit E) به عنوان آنتی اکسیدان بسیار ضروری برای اکثر گونه های ماهیان پرورشی می باشند. همان طور که گفته شده ویتامینC باعث تحریک پاسخ ایمنی مانند فعالیت های ماکروفاژ، تکثیر سلولی، فعالیت کمپلمان، سطح لایزوزیم، فعالیت فاگوسیتیک لوکسیت، تولید سیتوکین و سطح آنتی بادی می گردد و ثابت شده است که ویتامینE پاسخ های ایمنی را در چندین گونه ماهی کاهش می دهد و نقش کلیدی در ایمنی ماهی دارد. ضمن این که نقش آنتی اکسیدان تری ویتامینC و E در برابر اکسیداسیون توسط رادیکال های آزاد به خوبی ثابت شده است(۲۵). هماتولوژی یا خون شناسی موضوعی بالینی و بر پایه درک اصول علمی و تحقیقات آزمایشگاهی و یکی از شاخص های مهم و مدرن علوم پزشکی، دامپزشکی، شیلات و زیست شناسی می باشد. به دلیل راحتی و نمونه برداری چندباره خون از یک ماهی، بافت خون، بافت مناسبی برای مطالعات تعیین سلامت و یا بیماری ماهیان است و می تواند به عنوان یک تابلوی بهداشتی و سلامتی نیز عمل کند. لذا استفاده از شاخص های خونی به عنوان ابزاری برای پی بردن به وضعیت سلامت ماهی و آبزیان بسیار مفید خواهد بود(۱۰). در مورد اثرات ویتامین های C و E بر روی ماهیان تحقیقات زیادی صورت گرفته است که نتایج حاکی از اثرات مثبت این ویتامین ها در شاخص های رشد، بازماندگی و بهبود شاخص های خونی گردیده است. (۱۱،۱۲،۱۵،۱۹،۲۴،۲۵،۳۰،۳۳،۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹). این تحقیق به اثرات ویتامین های C و E بر شاخص های خونی، آنزیمی و ایمنی ماهی کپور با هدف بررسی اثرات مثبت این ویتامین ها بر فاکتورهای ذکر شده انجام پذیرفت.

موادو روش ها

الف-آماده سازی ماهیان و روش کار

برای انجام تحقیق جاری تعداد ۲۷۰ قطعه بچه ماهی کپور(وزن متوسط ۱۲/۲۹گرم و طول متوسط ۸/۹ سانتی متر) به مدت ۴۲ روز در ۸ گروه آزمایشی از نسبت های مختلف ویتامین C و E به همراه یک گروه شاهد که تنها از جیره تجاری تغذیه کردند در سه تکرار و با تعداد ۱۰ قطعه ماهی در هر تکرار پرورش داده شدند. گروه های آزمایشی ۸ گانه به صورت ترکیبی از مقادیر ۰، ۲۰۰ و

۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم غذا ویتامین C و ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم غذا ویتامین E بودند(۴). در طول دوره پرورش پارامترهای کیفی آب نیز بررسی و کنترل گردید و برای بهبود کیفیت آب پرورش روزانه در حدود ۲۰ درصد حجم آب تانک های پرورشی تعویض می گردید. میزان اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه هواده در حد اشباع قرار گرفت. ضمن این که میانگین دمای دوره پرورش برابر۲±۲۷ و pH برابر ۷/۹-۷/۶ بود.

ب) غذادهی و زیست سنجی ماهیان

غذادهی در طول دوره پرورش بر اساس ۱۰ درصد وزن توده زنده، دو بار در روز و در ساعت های ۸ صبح و ۴ بعد از ظهر انجام می گرفت. برای آماده سازی غذا و اضافه نمودن ویتامین ها به غذای مورد استفاده ابتدا غذا را با آب مخلوط نموده تا به حالت خمیری تبدیل شود، سپس مقادیر مورد نظر ویتامین را به غذا اضافه نموده و پس از مخلوط نمودن در چرخ گوشت قرار داده تا به صورت پلت در آید. در ادامه غذای آماده شده به دور از نور مستقیم آفتاب و در هوای آزاد خشک و تا زمان مصرف در جای خشک و خنک نگهداری گردید. به منظور تعیین درصد غذای روزانه، زیست سنجی از بچه ماهیان کپور نیز هر ۱۵ روز با استفاده از تعدادی از ماهیان هر گروه انجام می پذیرفت(۲). بدین منظور طول و وزن بچه ماهیان در هر گروه اندازه گیری و میانگین وزن هر گروه محاسبه تا مقدار درصد غذای روزانه برای هر گروه مشخص گردد.

ج- اندازه گیری شاخص های خونی، آنزیمی و ایمنی

در انتهای دوره پرورش با قطع ورید ساقه دمی عملیات خون گیری از سیاه رگ دمی بچه ماهیان کپور انجام پذیرفت. جهت انجام مطالعات خون شناسی از سرنگ هایی با حجم ۲cc استفاده گردید. بعد از گرفتن خون ، ۰/۵ cc خون(هپارین) شماره گذاری شده جهت مطالعه فاکتورهای خونی ریخته و ۱/۵ cc باقی مانده به داخل تیوب های اپندروف غیر هپارینه شماره گذاری وارد شده و جهت بررسی شاخص های آنزیمی و ایمنی به آزمایشگاه فرستاده شد. در آزمایشگاه فاکتورهای خونی از قبیل گلبول سفید، گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت، MCV، MCH، MCHC و نیز آنزیم های سرمی خون مانند لاکتات دهیدروژناز، آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارات آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز به وسیله دستگاه های اتو آنالیزور مخصوص تعیین گردید(۲). برای اندازه‌گیری فاکتورهای ایمنی شامل IgM از روش ایمونو توربی دی متری و برای اندازه گیری سطوح لایزوزیم در سرم خون ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus*(سیگما)(معادل مقدار ۰/۳۷۵ میلی گرم در میلی لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۶/۲ با ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه های سرم مخلوط و جذب نوریپ ساز ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه به روش طیف سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۷۰ نانومتر قرائت شد. برای اندازه گیری کمپلمان ۵۰(ACH50) از روش THCA Assay استفاده گردید(۲).

د- تجزیه و تحلیل داده های آزمایشگاهی

تجزیه و تحلیل نتایج آزمایشگاهی با استفاده ازنرم افزار SPSS 17 انجام پذیرفت. از برنامه Excel 2007 نیز برای رسم نمودارها استفاده شد. جهت اطمینان از طبیعی بودن داده‌های آزمایشگاهی از آزمون Shapiro-wilk استفاده گردید که در صورت طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه(Oneway

ANOVA) اختلاف بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵٪ مشخص و در ادامه با آزمون دانکن گروه‌های آزمایشی از یک دیگر تفکیک شدند.

نتایج

نتایج بررسی شاخص های خونی ماهی کپور در اثر تغذیه به مقادیر مختلف ویتامین های E و C در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. بیشترین تعداد گلبول قرمز در گروه C200+ E200 و کم ترین تعداد در گروه شاهد، بیشترین میزان هموگلوبین خون در گروه E400 ، E200 + C200 و C400 + E400 و کم ترین میزان در گروه شاهد، بیشترین میزان هماتوکریت در گروه E200 + C200 و کم ترین میزان در گروه شاهد، بیشترین میزان MCV در گروه شاهد و کم ترین میزان در گروه C200، بیشترین میزان MCH در گروه شاهد و کم ترین میزان در گروه C200 + E200،C400 + E400 و C400 + E200 ، بیشترین میزان MCHC در گروهC200 و C200 + E400 و کم ترین میزان در گروه E200(جدول ۱)، بیشترین تعداد گلبول سفید در گروه C200 + E400 و کم ترین تعداد در گروه شاهد، بیشترین میزان نوتروفیل در گروه C200+ E400 و کم ترین میزان در گروه شاهد، بیشترین میزان لنفوسیت در گروه شاهد و کم ترین میزان در گروه C200 + E400، بیشترین میزان مونوسیت در گروه شاهد و E400 و کم ترین میزان در گروه C200 و E200 + C200 و بیشترین میزان ائوزینوفیل در گروه E200 + C400 و C200+ E200 و در سایر گروه ها میزان ائوزینوفیل به یک میزان و برابر ۱ می باشد(جدول ۲). نتایج شاخص های آنزیمی ماهی کپور در گروه های مختلف نشان داد، بیشترین میزان لاکتات دهیدروژناز در گروه شاهد و کم ترین میزان در گروه ۴۰۰C+۲۰۰E، بیشترین میزان آلانین آمینوترانسفراز در گروه ۲۰۰E و کم ترین میزان در گروه۴۰۰C+۴۰۰E، بیشترین میزان آسپارات آمینوترانسفراز در گروه شاهد و کم ترین میزان در گروه ۴۰۰C+۲۰۰E و نیز بیشترین میزان آلکالین فسفاتاز در گروه شاهد و کم ترین میزان در گروه ۴۰۰C+۴۰۰E می باشد(جدول ۳). هم چنین نتایج بررسی شاخص های ایمنی در ماهی کپور نشان داد بیشترین میزان لایزوزیم(Lysozyme Activity) در گروه۴۰۰C+۴۰۰E و کم ترین میزان در گروه شاهد، بیشترین میزان کمپلمان۵۰(ACH50) در گروه ۲۰۰C+۲۰۰E و کم ترین میزان در گروه شاهد و بیشترین میزان ایمونوگلوبین(IGM) در گروه ۴۰۰E و کم ترین میزان در گروه شاهد می باشد(جدول ۴).

بحث و نتیجه گیری

نتایج بررسی حاضر نشان می دهد که افزایش ویتامین-های C و E در جیره غذایی ماهی کپور به صورت ترکیبی باعث بهبود شاخص های خونی می شود. به طوری که با افزودن ویتامین بسیاری از شاخص های خونی از جمله گلبول های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت افزایش یافت. به طور کلی، افزایش فعالیت ویتامینC بر روی هماتولوژی ماهی به نقش آن در آزاد شدن فریتین کبدی و استفاده از آن برای فرآیند اریتروپوئزی(تولید گلبول های قرمز خون) مربوط است(۲۲،۲۳). هم چنین، ویتامینC به جذب آهن از دستگاه گوارش کمک می-کند. بنابر این، افزایش در گلبول های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در گروه های اضافه شده ویتامین ممکن است به دلیل این عمل باشد.

جدول ۱- مقدار متوسط شاخص های خونی(گلبول قرمز) ماهی کپور در گروه های مختلف

شاخص های خونی	RBC (میلی متر مکعب)	Hb (گرم در دسی لیتر)	Hct (درصد)	MCV (فمتولیتر)	MCH (پیکوگرم)	MCHC (درصد)
شاهد	۷۴۷۰۰۰±۲۸۲۸/۴[a]	۶/۹±۰[a]	۳۴±۱/۴۱[a]	۴۶۴/۵±۳/۵۴[e]	۹۲±۰[b]	۱۹/۵±۰/۷۱[a]
۲۰۰C	۸۴۵۰۰۰±۰[b]	۷/۲±۰/۱۴[a]	۳۶±۱/۴۱[a]	۴۳۶/۵±۲/۱۲[a]	۸۷±۱/۴۱[a]	۲۱±۱/۴۱[a]
۴۰۰C	۸۹۰۰۰۰±۰[c]	۷/۶±۰/۲۸[b]	۴۱±۱/۴۱[bc]	۴۴۹±۰[cd]	۸۷±۱/۴۱[a]	۱۹/۵±۰/۷۱[a]
۲۰۰E	۸۹۰۰۰۰±۰[c]	۷/۶۵±۰/۲۱[bc]	۴۰/۵±۰/۷۱[b]	۴۴۷/۵±۲/۱۲[c]	۸۷±۱/۴۱[a]	۱۸/۵±۰/۷۱[a]
۴۰۰E	۹۲۸۰۰۰±۰[d]	۸/۱±۰[d]	۴۱/۵±۰/۷۱[bc]	۴۴۱±۱/۴۱[b]	۸۷/۵±۰/۷۱[a]	۲۰±۰[a]
۲۰۰C+۲۰۰E	۹۴۹۵۰۰±۶۳۶۴[e]	۸/۲±۰/۱۴[d]	۴۴±۱/۴۱[c]	۴۵۱±۱/۴۱[cd]	۸۶/۵±۰/۷۱[a]	۱۹/۵±۰/۷۱[a]
۴۰۰C+۴۰۰E	۹۲۷۰۰۰±۰[d]	۸/۲±۰/۱۴[d]	۴۳±۱/۴۱[bc]	۴۵۳±۰[d]	۸۶/۵±۰/۷۱[a]	۱۹/۵±۰/۷۱[a]
۲۰۰C+۴۰۰E	۸۹۲۰۰۰±۰[c]	۸±۰/۱۴[cd]	۴۰/۵±۰/۷۱[b]	۴۴۷/۵±۰/۵[c]	۸۸±۰[a]	۲۱±۱/۴۱[a]
۴۰۰C+۲۰۰E	۹۲۴۰۰۰±۰[d]	۸±۰[cd]	۴۲±۱/۴۱[bc]	۴۴۳±۱/۴۱[b]	۸۶/۵±۰/۷۱[a]	۲۰±۱/۴۱[a]

جدول ۲- مقدار متوسط شاخص های خونی(گلبول سفید) ماهی کپور در گروه های مختلف

شاخص های خونی	WBC (میلی متر مکعب)	نوتروفیل (درصد)	لنفوسیت (درصد)	مونوسیت (درصد)	ائوزینوفیل (درصد)
شاهد	۴۲۵۰±۷۰/۷۱[a]	۲۴±۰[a]	۷۵±۰[d]	۴±۰[c]	۱±۰[a]
۲۰۰C	۵۲۰۰±۰[b]	۲۷±۰[b]	۶۹/۵±۰/۷۱[c]	۲±۰[a]	۱±۰[a]
۴۰۰C	۷۲۰۰±۰[c]	۳۱/۵±۰/۷۱[c]	۶۴±۰[ab]	۳±۰[b]	۱±۰[a]
۲۰۰E	۷۲۰۰±۰[c]	۳۲/۵±۰/۷۱[cde]	۶۴/۵±۰/۷۱[ab]	۳±۰[b]	۱±۰[a]
۴۰۰E	۷۴۰۰±۰[e]	۳۴±۱/۴۱[de]	۶۳/۵±۲/۱۲[ab]	۴±۰[c]	۱±۰[a]
۲۰۰C+۲۰۰E	۸۲۰۰±۰[f]	۳۲/۵±۰/۷۱[cde]	۶۴±۰[ab]	۲±۰[a]	۲±۰[b]
۴۰۰C+۴۰۰E	۷۳۰۰±۰[d]	۳۲±۰[cd]	۶۵±۱/۴۱[b]	۳±۰[b]	۱±۰[a]
۲۰۰C+۴۰۰E	۸۵۰۰±۰[g]	۳۴/۵±۰/۷۱[e]	۶۲±۰[a]	۳±۰[b]	۱±۰[a]
۴۰۰C+۲۰۰E	۷۴۵۰±۷۰/۷۱[e]	۳۱/۵±۲/۱۲[c]	۶۶±۱/۴۱[b]	۳±۰[b]	۲±۰[b]

جدول ۳- مقدار متوسط شاخص های آنزیمی سرم خون ماهی کپور گروه های مختلف(واحد بین المللی در لیتر(IU/l))

شاخص های خونی	LDH	ALT	AST	ALP
شاهد	۲۱۹۵/۵±۲/۱۲ [i]	۳۷/۵ ±۰/۷۱ [h]	۵۴۰±۱/۴۱ [i]	۱۹۳ ± ۱/۴۱ [h]
۲۰۰C	۱۴۹۶ ±۱/۴۱ [f]	۳۱/۵ ±۰/۷۱ [g]	۴۹۰/۵±۰/۷۱ [g]	۱۰۷/۵±۰/۷۱ [d]
۴۰۰C	۱۴۶۵/۵±۰/۷۱[d]	۲۲/۵ ±۰/۷۱ [d]	۴۴۳ ±۰ [d]	۱۲۷/۵±۰/۷۱ [e]
۲۰۰E	۱۵۵۳±۱/۴۱ [g]	۳۳±۰ [g]	۵۱۰/۵±۰/۷۱ [h]	۱۳۵/۵±۰/۷۱ [f]
۴۰۰E	۱۴۷۱±۱/۴۱ [e]	۲۸/۵±۰/۷۱ [f]	۴۵۲/۵±۰/۷۱ [e]	۸۶/۵±۰/۷۱ [a]
۲۰۰C + ۲۰۰E	۱۳۲۶±۰/۷۱ [c]	۲۶±۱/۴۱ [e]	۴۷۶/۵±۰/۷۱ [f]	۱۰۲/۵ ±۰/۷۱ [c]
۴۰۰C + ۴۰۰E	۱۲۷۴/۵±۰/۷۱ [b]	۱۴/۵±۰/۷۱ [a]	۳۸۶/۵±۰/۷۱ [b]	۹۸±۰ [b]
۲۰۰C + ۴۰۰E	۱۹۷۶±۱/۴۱[h]	۱۹/۵±۰/۷۱ [c]	۴۰۸/۵±۰/۷۱ [c]	۱۵۸/۵±۰/۷۱ [g]
۴۰۰C + ۲۰۰E	۱۲۶۸/۵±۰/۷۱ [a]	۱۷±۰ [b]	۳۶۰±۰ [a]	۱۰۶/۵±۰/۷۱[d]

حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار بین گروهها می باشد ($P<0.05$).

جدول ٤- مقدار متوسط شاخص های ایمنی ماهی کپور در گروه های مختلف مورد بررسی

شاخص های ایمنی	Lysozyme(واحد در میلی لیتر)	ACH50(واحد در میلی لیتر)	IGM(میلی گرم در دسی لیتر)
شاهد	۱۹/۵ ± ۰/۷۱ ^{a}	۱۲۴/۵ ± ۰/۷۱ ^{a}	۱۲ ± ۰ ^{a}
۲۰۰C	۲۸ ± ۰ ^{b}	۱۳۸/۵ ± ۰/۷۱ ^{b}	۱۳/۵ ± ۰/۷۱ ^{bc}
٤۰۰C	۳۶/۵ ± ۰/۷۱ ^{d}	۱۷۸/۵ ± ۱/۴۱ ^{f}	۱۴/۵ ± ۰/۷۱ ^{c}
۲۰۰E	۲۸ ± ۱/۴۱ ^{b}	۱۵۷/۵ ± ۰/۷۱ ^{d}	۱۲/۵ ± ۰/۷۱ ^{ab}
٤۰۰E	۴۶ ± ۱/۴۱ ^{g}	۱۸۱/۵ ± ۰/۷۱ ^{g}	۲۳ ± ۰ ^{g}
۲۰۰C+ ۲۰۰E	۳۸/۵ ± ۰/۷۱ ^{e}	۱۸۸/۵ ± ۰/۷۱ ^{h}	۲۱/۵ ± ۰/۷۱ ^{f}
٤۰۰C+ ٤۰۰E	۴۹/۵ ± ۰/۷۱ ^{h}	۱۷۹/۵ ± ۰/۷۱ ^{f}	۱۸/۵ ± ۰/۷۱ ^{e}
۲۰۰C+٤۰۰E	۳۵/۵ ± ۰/۷۱ ^{c}	۱۶۷/۵ ± ۰/۷۱ ^{e}	۱۴/۵ ± ۰/۷۱ ^{c}
٤۰۰C+ ۲۰۰E	۴۰/۵ ± ۰/۷۱ ^{f}	۱۵۵/۵ ± ۰/۷۱ ^{c}	۱۶/۵ ± ۰/۷۱ ^{d}

حروف لاتین مشترک در هر ردیف گویای عدم وجود اختلاف معنی دار($P> ۰/۰۵$) و حروف غیر مشترک به معنای وجود اختلاف معنی دار آماری($P< ۰/۰۵$) در میانگین داده های آزمایش می باشد.

هم چنین ویتامینCیک آنتی اکسیدان قوی است که در برابر آسیب های اکسیداتیو به بافت های مختلف ماهی مانند گلبول قرمز نقش حافظتی دارد(۳۴، ۲۵) و از طرفی گزارش شده است که ویتامینE هم به عنوان آنتی-اکسیدان محافظت از غشای سلولی شامل گلبول قرمز را در برابر آسیب های اکسیداتیو انجام می دهد(۳۴). در هم‌سویی نتایج تحقیق جاری، جیره های غذایی حاوی سطوح مختلف ویتامین C و E در ماهی استرلیاد(*Acipenser ruthenus*) باعث افزایش تعداد گلبول قرمز گردید(۳). مشخص شده ویتامین E اثر معنی-داری بر روی میزان هماتوکریت، هموگلوبین، گلبول قرمز، مونوسیت و ائوزینوفیل بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) دارد(۱). ویتامین C باعث افزایش گلبول های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت خون ماهی قزل آلای رنگین کمان گردید(۶،۳۰). افزایش ویتامین C در جیره ماهی کوی(*Cyprinus carpio*) باعث افزایش گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، نوتروفیل و مونوسیت(۱۵) و در ماهی آکواریومی بارب حلب (*Barbonymus schwanenfeldii*) باعث افزایش گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و گلبول های سفید گردید(۹). گلبول های قرمز خون در ماهی(*Arapaima gigas*) تغذیه شده از مکمل های غذایی حاوی ویتامین هایC و E افزایش یافت(۲۸). هم چنین افزایش ویتامین های C و E در جیره غذایی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) باعث افزایش شاخص های هماتولوژی(خونشناسی) گردید(۲۵). نتایج بررسی حاضر نشان می دهد افزایش ویتامینC و E به جیره غذایی ماهی کپور باعث کاهش همه فاکتورهای آنزیمی مورد بررسی از قبیل لاکتات دهیدروژناز، آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز می‌گردد. آلانین آمینوترانسفراز و آسپارات آمینوترانسفراز در اکثر بافت های بدن موجود می باشند. میزان آسپارات آمینو ترانسفراز در بیماری های قلبی، عضلانی و برخی حالت دیگر در سرم خون بالا می رود. میزان آلانین آمینو ترانسفراز در قلب، کبد، کلیه، طحال، پانکراس، مغز،

عضلات استخوانی و سرم زیاد می باشد و هرگاه این بافت‌ها دچار ضایعاتی شوند میزان این آنزیم افزایش می-یابد(۱۳). جیره غذایی حاوی ویتامین E۴۰۰+C۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم کم ترین میزان آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارات آمینو ترانسفراز را دارا بود که نشان دهنده اثرات مثبت ویتامین بر این دو آنزیم است. آلکالین فسفاتاز در کبد به وسیله سلول های پوششی و مجاری کوچک صفراوی تولید می گردد. آلکالین فسفاتاز آنزیمی است که در تمام بدن یافت می شود(۱۴) و در بیماری های کبدی و استخوانی در سرم خون افزایش می یابد(۱۳). گروه شاهد بیشترین میزان آلکالین فسفاتاز و جیره غذایی حاوی ویتامین E۴۰۰+C۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم کمترین میزان آلکالین فسفاتاز را داشته است که این امر می تواند ناشی از تاثیرات مثبت ویتامین های C و E بر آنزیم های بافت کبدی از جمله آلکالین فسفاتاز باشد. لاکتات دهیدروژناز آنزیمی است که لاکتات را به پیروات کاتالیز می کند و در تمام نسوج پراکنده است. در کلیه، کبد و عضلات مقدار این آنزیم بیش از میزان آن در دیگر نسوج است(۱۳). از تست لاکتات برای تعیین آسیب های بافتی و برای کمک در تشخیص کم خونی و بیماری های آبشش و کبد استفاده می شود(۱۴). هم چنین برای بررسی آسیب های کبد، انواع خاص کم خونی و تخریب مفرط سلولی به عنوان نمونه در آسیب کبد مورد استفاده قرار می گیرد(۱۴). بر اساس نتایج این بررسی گروه شاهد بیشترین میزان لاکتات دهیدروژناز را داشته و کمترین میزان در جیره غذایی حاوی E۲۰۰+C۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم می باشد. نتایج بررسی حاضر نشان دهنده اثرات مثبت افزایش ویتامین جیره بر آنزیم لاکتات دهیدروژناز است. در سیستم ایمنی، چندین نقش به ویتامینC در رژیم غذایی مربوط می شود که از آن جمله: فعالیت های ماکروفاژ، تکثیر سلولی، فعالیت کمپلمان و لایزوزیم می باشد (۲۷، ۲۵، ۲۱، ۱۷). در تحقیق جاری نیز افزایش ویتامینC و E به جیره غذایی ماهی کپور باعث افزایش فعالیت لایزوزیم، کمپلمان۵۰(ACH50) و ایمونوگلوبین می باشد. در تحقیقات صورت گرفته توسط محققین دیگر نیز نقش ویتامین ها به خصوصCو E در بهبود عملکرد سیستم ایمنی ثابت شده است. در نتایج مشابه نیز در تحقیقی مشخص گردید که افزودن ویتامین C در بچه ماهی فیل ماهی(*Huso huso*) موجب ارتقای برخی از واکنش های ایمنی غیر اختصاص(لایزوزیم، جمعیت لکوسیتی) و اختصاصی(تولید آنتی بادی) و نیز درصد بقای آن در مواجهه با سپتی سمی آئروموناس می-شود. لذا استفاده از این ویتامین در سنین پایین تر می تواند موجب تقویت واکنش های دفاعی و در نتیجه افزایش مقاومت به عفونت باکتریایی در مراحل ابتدایی رشد و نمو ماهی که از حساسیت بیشتری به عوامل بیماری زا و شرایط نامساعد زیست محیطی و پرورشی برخوردا است، شود(۱۲). سطوح مختلف ویتامین C باعث افزایش تعداد گلبول های سفید خون و میزان فعالیت لایزوزیم سرم در ماهی بنی(*Barbus sharpeyi*) گردید(۵). افزایش ویتامین E به جیره غذایی بچه ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) میزان گلبول قرمز، هماتوکریت، فعالیت لایزوزیم و ایمونوگلوبین را افزایش داد(۸). سطوح مختلف ویتامینC باعث افزایش لایزوزیم، IGM در بچه تاسماهی سیبری(*Acipenser baerii*) گردید(۲). افزایش ویتامین های C و E به جیره غذایی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) باعث افزایش فعالیت لایزوزیم و ایمونوگلوبین می شود(۲۵). تحقیقات مختلف نشان داده است که میزان ویتامین C و E مورد نیاز متناسب با هر گونه ماهی متفاوت است و نمی توان به عنوان یک اصل

کلی این میزان را به همه ماهیان دیگر تعمیم داد(۲۹، ۲۶-۲۴،۱۹، ۱۵، ۱۲، ۱۱، ۴-۱). نتایج این بررسی نشان می‌دهد اگر چه تغییرات صورت گرفته و نتایج به دست آمده در سطوح مختلف ویتامین ها بر شاخص های خونی، آنزیمی و ایمنی متفاوت و بعضاً یکسان نبوده است اما اولاً استفاده از هر دو ویتامین در جیره غذایی ماهی کپور ضروری بوده، ثانیاً در اکثر شاخص های مورد بررسی ترکیب ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا از هر دو نوع ویتامین باعث بهبود شاخص های خونی گردیده و بهترین تاثیر را داشته است.

منابع

۱-اورجی، م.، رحیمی، ح. ۱۳۹۲. اثر ویتامین E بر شاخص-های رشد میزان بقا و تغییرات هماتولوژی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان. فصلنامه علمی پژوهشی شیلات. دوره ۲. شماره ۴. ص ۱-۱۰.

۲-پورغلام، ی.، خارا، ح.، محسنی، م .۱۳۹۳. بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامینC بر فاکتورهای خونی و ایمنی بچه تاسماهی سیبری(*Acipenser baerii*). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری، شماره پیاپی۲۵، جلد۷، شماره۲، بهار، ص۷۹-۸۵.

۳-تاتینا، م.، بهمنی،م.، سلطانی، م.، ابطحی،ب.، قریب خانی، م. ۱۳۸۸. تاثیر جیره های غذایی حاوی سطوح مختلف ویتامین‌های C وE بر میزان گلبول های قرمز خون ماهی استرلیاد پرورشی. مجله علمی پژوهشی بیولوژی دریا. سال اول شماره چهارم. ص ۲۳-۳۴.

٤-تاتینا، م.، طاعتی، ر.، بهمنی، م.، سلطانی، م.، قریب خانی، م. ۱۳۹۱. اثر سطوح متفاوت ویتامین های C و E بر شاخص های رشد و بقای ماهی استرلیاد پرورشی. مجله علمی شیلات ایران. سال بیست و یکم، شماره ۱. بهار، ص ۱-۱۲.

۵-جواهرزاده دزفول، ف.، علیشاهی، م. چله مال دزفولی نژاد، م. جواهری، م. ۱۳۹۱. تأثیرسطوح مختلف ویتامین C برخی شاخص های ایمنی و خونی ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*). مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، دوره ۶، شماره۱.ص ۴۷-۵۶.

۶-رحیمی، م.، سوداگر، م.، اورجی، ح.، حسینی، س.ع.، تقی-زاده، و. ۱۳۹۱. تاثیر ویتامین C بر پارامترهای خونی، رشد و پاسخ به استرس دمایی در بچه ماهیان قزل الای رنگین کمان (*Oncorhinchus mykiss*). مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۷، شماره ۴، ص ۳۷۳-۳۸۰.

۷-شکراالهی، س.، تقی زاده، و.، ایمانپور، م.ر. ۱۳۹۳. اثر جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف ویتامین E و C بر شاخص های رشد ماهی فلاور هورن(*Cichlosoma* sp). فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری. سال ششم، شماره ۲، تابستان. ص ۷۵-۸۱.

۸-عاشوری، ع.، خارا، ح.، یزدانی ساداتی، م.ع.، کاظمی، ر. ا. ۱۳۹۳. بررسی تاثیر ویتامین های توکوفرول(E) و ریبوفلاوین(B2) برفاکتورهای خونی و ایمنی بچه ماهی شیپ(*Acipenser nudiventris*). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری. شماره پیاپی ۲۸، جلد ۸، شماره ۱، ص ۱۷-۲۷.

۹-غیاثوند، ز.، احمدی، ز.، علامه، ع.، چنگیزی، ر. ۱۳۹۵. اثر سطوح مختلف ویتامینC بر رشد، تغذیه، بازماندگی و برخی پارامترهای خونی و ایمنی ماهی آکواریومی باربحلب(*Barbonymus schwanenfeldii*). مجله پژوهش های جانوری(مجله زیست شناسی ایران)، جلد۲۹،شماره۳.ص ۳۱۸-۳۲۶.

۱۰-کاظمی، ر. ا.، پوردهقانی، م.، یوسفی جوردهی، ا.، یارمحمدی، م.، نصری تجن، م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان، رشت، چاپ اول، ص ۱۹۴.

۱۱–فلاحتکار، ب.، سلطانی، م.، ابطحی، ب.، کلباسی، م. ر.، پورکاظمی، م.، یاسمی، م. ۱۳۸۵. تاثیر ویتامین C بر برخی پارامترهای رشد، نرخ بازماندگی و شاخص های کبدی در فیل ماهیان. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. شماره ۷۲. ص۹۸–۱۰۳.

۱۲– فلاحتکار، ب.، سلطانی، م.، علیشاهی، م.، زرگر، ا. ۱۳۸۷. تاثیر سطوح مختلف اسید اسکوربیک بر برخی از شاخص های ایمنی فیل ماهیان جوان. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۳، شماره ۵، ص ۳۳۷–۳۴۳.

۱۳–محمدی ها، ح. ۱۳۷۷. بیوشیمی بالینی. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ دوم. ۸۲۶ ص.

۱٤–محمدنژادشموشکی، م.، سلطانی، م.، شریف پور، ع.، ایمانپور، م.ر. ۱۳۹۱. بررسی اثر غلظت های تحت کشنده سم دیازینون برفعالیت برخی آنزیم های سرمی مولدین نر ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* (Kamensky, 1901). مجله دامپزشکی ایران، دانشگاه شهید چمران اهواز، دوره هشتم، شماره چهارم، زمستان، ص ۹۴–۱۰۱.

۱۵– میرشاه ولد، ف.، کاظمیان، م. ۱۳۹۵. تاثیر سطوح مختلف ویتامین C بر برخی پارامترهای رشد و تعدادی از شاخص های هماتولوژی سرم خون ماهی کوی (*Cyprinus carpio*). مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، سال یازدهم، شماره دوم، تابستان. ص ۵۸–۶۸.

16. Affonso, E. G., Polez, V. L. P., Mazon, A. F., Araújo, M. R. R., Moraes, G., Rantin F. T. (2004). Physiological responses to sulfide toxicity by the air-breathing catfish, *Hoplosternum littorale*(Siluriformes, Callichthyidae). Comparative Biochemistry and Physiology, 139; 251–257.

17. Anbarasu, K., Chandran, M. R. (2001). Effects of ascorbic acid on the immune responses of the cat fish *Mystus gulio* (Hamilton), to different bacterions of *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology, 11; 347–355.

18. Asaikkuttia, A., Bhavana, P. S., Vimalab, K., Karthika, M., Cheruparambathca, P. (2016). Effect of different levels dietary vitamin C on growth performance, muscle composition, antioxidant and enzyme activity of freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. Aquaculture Reports, 3; 229–236.

19. Arab, N., Rajabi Islami, H. (2015). Effects of dietary ascorbic acid on growth performance, body composition, and some immunological parameters of caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*. Journal of the World Aquaculture Society; 46; 505–518.

20. Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A. (1995). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combi-nations to avoid. Radiat. Res. 145; 532–541.

21. Chen, R., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K., Lee, K. (2003). Alternative complement activity and resistance to heat stress in golden shiners(*Notemigonus crysoleucas*) are increased by dietary Vitamin C levels in excess of requirements for prevention of deficiency signs. Journal of Nutrition, 133; 2281–2286.

22. Cox, V.E. (1968). The anemia of scurvy. In: Harris, R.S., Wool, I.G., Loraine, J.A. Eds., Vitamins and Ž . Hormones 26 Academic Press, New York, pp. 635–651.

23. Dinning, J. S. (1962). Nutritional requirements for blood cell formation in experimental animals. Physiological Reviews, 42; 169–180

24. 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; 507-510.

25. Khara, H., Sayyadborani, M., SayyadBorani, M. (2016). Effects of α-Tocopherol(vitamin E) and ascorbic acid(vitamin c) and their combination on growth, survival and some haematological and immunological parameters of caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* juveniles. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 16; 385-393.

26. Lim, C., Lovell, R. T.(1978). Patology of vitamin C deficien cysyndrome in chanel catfish, *Ictalurus punctatus*. Nutrition, 108; 1137-1146.

27. Lin, M. F., Shiau, S. Y. (2004). Requirements of vitamin C(L-ascorbyl-2-

monphosphate-Ma and L-ascorbyl-2-monophosphate-Na) and its effects on immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture Nutrition, 10; 327–333.

28. Menezes, G. C., Tavares-Dias, M., Ono, E. A., Andrade, J. I. A., Brasil, E. M., Roubach, R., et al. (2006). The influence of dietary vitamin C and E supplementation onthe physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. Comp. Biochem. Physiol. A, 145; 274-279.

29. Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Dehasque, M., Nelis, H., De-Leenheer, A. (1996). Dietary ascorbic acid requirements during the hatchery production of turbot larvae. J. FishBiol., 49; 573–583.

30. Miar, A., Matinfar, A., Shamsae, M., Soltani, M. (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.

31. Nakagawa, H., Sato, M., Gatlin, D.M. (2007). Dietary supplements for the health and quality of cultured fish. CRC press. USA. 220p.

32. National Research Council, (2011). nutrient requirements of fish and shrimp. National Academy Press, Washington, DC.

33. Safarpour Amlashi, A., Falahatkar, B., Sattari, M., Tolouei Gilani, M. H. (2011). Effect of dietary vitamin E on growth, muscle composition, hematological and immunological parameters of sub-yearling beluga *Huso huso* L. Fish & Shellfish Immunology, 30; 807-814.

34. Sahoo, P. K., Mukherjee, S. C. (2002). Influence of high dietary atocopherol acetate intakes on specific immune response, nonspecific resistance factors and disease resistance of healthy and Aflatoxin B1-induced immunocompromised Indian major Carp, *Labeo rohita* (Hamilton). Aquaculture Nutrition, 8; 159-67.

35. Wang, C., Huang, C. (2015). Effects of dietary vitamin C on growth, lipid oxidation,and carapace strength of soft-shelled turtle, Pelodiscus sinensis. Aquaculture, 445;1–4.

Evaluation of Some Haematological, Enzymes and Immunological Blood Indices of Carp (*Cyprinus carpio*) Fed with Different Levels of Vitamins C and E

M. Mohammad Nejad [1], S. Shahrokhi[2], A. Ghelichi[3]

1. Associate Professor of Department of Fishery, Bandar GazBranch, Islamic Azad University, Bandar Gaz, Iran. **majid_m_sh@bandargaziau.ac.ir**

2. Graduated of fishery (MSc), Department of Fishery, AzadshahrBranch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

3.Associate Professor of Department of Fishery, Azadshahr Branch, Islamic Azad University Azadshahr, Iran.

Received:2018.19.2 **Accepted: 2018.27.10**

Abstract

Inroduction & Objective: Vitamins are organic compounds, which are vital for fish, and their shortages lead to severe disorders in the body of the fish, and since fish only absorb vitamins through food, this study examines the effects of different levels of vitamins C and E on blood and immunity factors of common carp (*Cyprinus carpio*).

Materials and Methods: The present study was carried out with 9 diets containing 0, 200 and 400 mg / kg of vitamin C and 0, 200 and 400 mg / kg of vitamin E for 6 weeks. At the end of the blood sampling from fish blood stem vein removal was performed and blood, enzyme and immune factors were measured in a hematologic laboratory.

Results: Blood analysis showed that there was a statistically significant difference between the groups in terms of RBC, hemoglobin, hematocrit, lymphocyte, monocyte, eosinophil, neutrophil, MCH and MCV (P <0.05). There was no significant difference in MCHC between the groups (P> 0.05). By adding vitamins C and E, the levels of lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase decreased, and the activity of lysozyme, ACH50, and IGM increased. The results of this study showed that in most of the indices, 400 mg / kg of vitamin C and E supplementation improves performance.

Conclusion: Adding different amounts of vitamins C and E will increase blood factors and improve immune function.

Keywords: Vitamins C and E, Hematology, Enzyme, Immunity,*Common carp*.