

## تأثیرات اضافه نمودن ویتامین D در جیره غذایی بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان بر روی سیستم ایمنی و فاکتورهای خونی

سجاد دهقان زاده<sup>(۱)\*</sup>؛ عباسعلی زمینی<sup>(۲)</sup>؛ حسین خارا<sup>(۳)</sup>

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 پذیرش: آذر ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۲

### چکیده

قزل آلاهی 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 آبی پروری، این تحقیق در ۱۲۰ عدد بچه ماهی قزل آلاهی رنگین کمان با میانگین وزنی ۳ 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، در ۳ تیمار غذایی و ۱ گروه 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 ایمنوگلوبولین 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 خون MCV، غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز MCH، غلظت متوسط هموگلوبین های گلبول قرمز خون MCHC اختلاف معنادار آماری نداشته است ( $p > 0.05$ ).

**کلمات کلیدی:** قزل آلاهی رنگین کمان، ویتامین D، فاکتورهای خونی، سیستم ایمنی، گلبول سفید خون، ایمنوگلوبولین کل.

## ۱. مقدمه

ماهی قزل آلابی رنگین کمان از خانواده سالمونیده<sup>۱</sup>، 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 دارا بودن اسیدهای چرب غیر اشباع توسط متخصصان تغذیه سفارش شده است (۷). مراحل ابتدایی رشد ماهی قزل آلابی 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 تقریباً از ۱۰ ترکیب استروئیدی متفاوت با فعالیت ویتامینی ساخته شده است، ولی فقط دو ترکیب آن دارای اهمیت است: آرگوکلسیفرول (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 نهایتاً 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 متأسفانه در زمینه سیستم ایمنی در ماهیان، تحقیقات مشابه کمتر دیده شده است (۱۸ و ۱۲ و ۱۳ و ۲۰). در راستای تحقیق حاضر می توان به این فرضیات اشاره کرد که آیا استفاده از مقادیر مختلف این ویتامین تأثیری بر فاکتورهای

D بر برخی شاخص های خونی نظیر تعداد گلبول قرمز و سفید خون و سیستم ایمنی نظیر ایمنوگلوبولین اشاره کرد.

خونی و گلبول های سفید خون و افزایش سیستم ایمنی بدن بچه ماهیان دارد؟ از اهداف تحقیق، می توان به تعیین اثرات ویتامین

## ۲. مواد و روش ها

شد. ۱۲۰ عدد بچه ماهی قزل آلاهی 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.

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

### جدول ۱: جدول مشخصات فیزیکی و آنالیز خوراک اکسترودر EXS4

نام محصول	پروتئین	چربی	فیبر	رطوبت	سایز خوراک	وزن ماهی
EXS4	۴۶٪	۱۵٪	۲٪	۱۰٪	۱/۵ میلی متر	۳-۵ گرم

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 نظیف، از طریق قطع ساقه دم، 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 D3 خون، ایمنوگلوبولین کل و سایر فاکتورهای خونی مورد اندازه گیری قرار گرفت.

برای انجام این تحقیق حدود ۱۰۰ گرم ویتامین D3 پودری با درجه خلوص ۱۰۰ درصد با مارک DSM (رشد 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

شد. ایمنوگلوبولین 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 ایمنوگلوبولین 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 فوتومتريک (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 (۲۵ و ۱۷ و ۲۳ و ۲۴). در نهایت، به منظور بررسی توزیع نرمال داده ها در گروه ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون شاپیرو ویلک<sup>۳</sup> 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 هموزنی<sup>۴</sup> جهت مقایسه گروه ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. در صورت نرمال نبودن داده ها جهت مقایسه تیمارها از آزمون کروسکال والیس<sup>۵</sup> و به منظور مقایسه بین گروه ها از آزمون من ویتنی<sup>۶</sup> 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 آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و جهت رسم نمودارها 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 گروهها با

اندازه گیری ویتامین D خون نیز توسط کیت تجاری EUROIMMIN به روش الایزا<sup>۱</sup> (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 دستگامی با استفاده از Sysmex Ilys اندازه گیری شد (۱۴). هماتوکریت با لوله های میکروهماتوکریت و توسط میکروسانتریفوژ Hettich با دور ۱۴۰۰۰ rpm اندازه گیری شد (۱۴). شمارش گلبول قرمز به کمک محلول Lewis و با ملانزور و لام نتوبار با واحد مترمکعب انجام گرفت، همچنین شمارش گلبول سفید به کمک محلول Lewis در ۰/۱ گرم (Brillant cresyl blue) به کمک ملانزور و لام نتوبار با واحد مترمکعب انجام پذیرفت (۱۴). محاسبه حجم متوسط گلبولی (MCV) با واحد فمتولیترا، 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). ایمنوگلوبولین کل در این آزمایش بر اساس روش سیویکی و اندرسون<sup>۲</sup> (۱۹۹۳) محاسبه شده است. ۰/۱ میلی لیتر از هر سرم نمونه با ۰/۱ میلی لیتر از پلی اتیلن گلیکول ۱۲٪ ترکیب و مخلوط حاصل پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دور ۵۰۰۰ در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ

۳ - Shapiro-Wilk-  
 ۴ - Test of Homogeneity of Variances -  
 ۵ - Kruskal-Wallis -  
 ۶ - Mann-Whitney -

۱ - ELISA -  
 ۲ - Siwicki - Anderson -

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

جدول ۲: جدول میانگین ویتامین D خون در شاهد و تیمارهای مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد $\pm$ میانگین
ویتامین D خون	تیمار ۱: ۵۰۰۰ IU	$9/13 \pm 0/75^c$
	تیمار ۲: ۴۰۰۰ IU	$4/27 \pm 0/99^b$
	تیمار ۳: ۳۰۰۰ IU	$2/6 \pm 0/15^a$
	شاهد	$2 \pm 0/2^a$

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

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 تیمارها مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).

مقایسه میانگین میزان آلکالین فسفاتاز خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر نشان داد که آلکالین فسفاتاز خون بچه ماهیان در تیمار ۱ بیشتر از سایر تیمارها بوده و تیمار ۲ و ۳ در رتبه های بعدی قرار داشته اند و کمترین میزان ALP در خون بچه ماهیان در

جدول ۲: جدول میانگین آلکالین فسفاتاز خون در شاهد و تیمارهای مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد $\pm$ میانگین
آلکالین فسفاتاز خون	تیمار ۱: ۵۰۰۰ IU	$905 \pm 32/53^c$
	تیمار ۲: ۴۰۰۰ IU	$662 \pm 33/30^b$
ALP	تیمار ۳: ۳۰۰۰ IU	$630/67 \pm 33/04^b$
	شاهد	$357/5 \pm 2/5^a$

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

Shapiro-Wilk -<sup>۱</sup>  
 Test of Homogeneity of Variances -<sup>۱</sup>  
 Kruskal-Wallis -<sup>۱</sup>  
 Mann-Whitney -<sup>۱</sup>

در تیمار ۲ و ۳ بیش از سایر تیمارها 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 ( $P < 0.05$ ).

مقایسه میانگین میزان گلبول سفید خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر نشان داد که میزان گلبول های سفید خون بچه ماهیان

جدول ۳: جدول میانگین گلبول های سفید خون در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد $\pm$ میانگین
گلبول های سفید	تیمار ۱: ۵۰۰۰ IU	$6500 \pm 288/67^a$
WBC	تیمار ۲: ۴۰۰۰ IU	$9333/33 \pm 712/58^b$
	تیمار ۳: ۳۰۰۰ IU	$9566/67 \pm 753/51^b$
	شاهد	$8150 \pm 50^{ab}$

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

یکدیگر نشان داد که میزان گلبول های قرمز در خون ماهیان مورد بررسی بین تیمارها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).

مقایسه میانگین میزان گلبول قرمز خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروهها با

جدول ۴: جدول میانگین گلبول قرمز خون در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد $\pm$ میانگین
گلبول قرمز	تیمار ۱: ۵۰۰۰ IU	$648666/67 \pm 8089/77$
RBC	تیمار ۲: ۴۰۰۰ IU	$723000 \pm 51159/88$
	تیمار ۳: ۳۰۰۰ IU	$657666/67 \pm 23729/962$
	شاهد	$697500 \pm 6500$

ترتیب در تیمار ۱، تیمار ۲ و تیمار ۳ بیشتر از شاهد بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).

مقایسه میانگین ایمنوگلوبولین کل خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر نشان داد که میزان ایمنوگلوبولین کل خون بچه ماهیان به

جدول ۵: جدول میانگین ایمنوگلوبولین کل خون در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد $\pm$ میانگین
ایمنوگلوبولین کل	تیمار ۱: ۵۰۰۰ IU	$25 \pm 0/57^b$
	تیمار ۲: ۴۰۰۰ IU	$22/33 \pm 0/88^b$
	تیمار ۳: ۳۰۰۰ IU	$22/33 \pm 0/88^b$
	شاهد	$17 \pm 1^a$

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

پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر نشان داد که در بین تیمارها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشده است ( $P > 0.05$ ).

مقایسه میانگین میزان هموگلوبین و هماتوکریت خون، حجم متوسط گلبولی خون MCV، غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول های قرمز خون MCH، غلظت متوسط هموگلوبین های گلبول قرمز خون MCHC در شاهد و تیمارهای مختلف در

جدول ۶: جدول میانگین هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH، MCHC در شاهد و تیمارهای مختلف

تیمار	هموگلوبین	هماتوکریت	MCV	MCH	MCHC
۵۰۰ IU	۵/۴ ± ۰/۰۵۷	۲۶/۳۳ ± ۰/۳۳	۴۰/۶۷ ± ۲/۴۰	۸۲/۶۶ ± ۰/۳۳	۲۰/۴۳ ± ۰/۱۳
۴۰۰ IU	۶ ± ۰/۳۷	۲۹/۶۷ ± ۱/۴۵	۴۱ ± ۱۰	۸۳ ± ۰/۵۸	۲۰/۱۷ ± ۰/۳۸
۳۰۰ IU	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	۴۰/۸/۵ ± ۳/۵	۸۱/۵ ± ۱/۵	۱۹/۹ ± ۰/۴

مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).

مقایسه میانگین میزان نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت، ائوزونوفیل خون در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور

جدول ۷: جدول میانگین نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت، ائوزونوفیل خون در شاهد و تیمارهای مختلف

تیمار	نوتروفیل	لنفوسیت	مونوسیت	ائوزونوفیل
۵۰۰ IU	۲۰/۳۳ ± ۱/۲۰	۷۶/۳۳ ± ۰/۸۸	۲ ± ۰/۵۷	۱/۳۳ ± ۰/۳۳
۴۰۰ IU	۲۳/۳۳ ± ۲/۶۰	۷۴/۶۳۳ ± ۲/۶۰	۱/۶۷ ± ۰/۳۳	۰/۶۶ ± ۰/۳۳
۳۰۰ IU	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

مقایسه میانگین درصد بقا در شاهد و تیمارهای مختلف در پایان دوره به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر نشان داد که میزان زنده مانده بچه ماهیان در تیمار ۲ بیش از شاهد و سایر تیمارهاست و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).

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 آنها بیشتر از گروه شاهد بوده که بیانگر افزایش ایمنی غیر اختصاصی در قیاس با تیمار شاهد می باشد.

جدول ۸: جدول میانگین میزان درصد زنده مانده تیمارها در پایان دوره

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد ± میانگین
درصد زنده مانده	تیمار ۱: ۵۰۰ IU	۸۰ ± ۵/۷۷ <sup>a</sup>
	تیمار ۲: ۴۰۰ IU	۹۶/۶۶ ± ۳/۳۳ <sup>b</sup>
	تیمار ۳: ۳۰۰ IU	۸۶/۶۶ ± ۳/۳۳ <sup>ab</sup>
	شاهد	۸۵ ± ۵ <sup>ab</sup>

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

## ۴. 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 آلاهی رنگین کمان به ویتامین E مطالعات زیادی صورت پذیرفته است احتیاجات ویتامین D صرفاً بر مبنای مطالعات مربوط به اضافه وزن و نبود علائم کمبود در پاسخ به متغیرها 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 حاضر که بر روی بچه ماهیان قزل آلا انجام 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 آلاهی رنگین کمان در سال ۱۹۸۲ توسط Barnett و همکاران انجام شد سطوح آلکالین فسفاتاز پلاسما 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 D<sub>3</sub>، ۲۵۰ و ۱۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D<sub>3</sub> 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 پلاسما خون مواجه خواهیم شد که با نتایج Barnett و همکاران در سال ۱۹۸۲ که بر روی قزل آلاهی رنگین کمان انجام شد مطابقت دارد (۱۳ و ۱۲). 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 مقادیر گلبول 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 تامباکوبی (*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 آلاهی 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 نتایج 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 D<sub>3</sub> و همچنین افزایش ایمنوگلوبولین کل خون در سایر تیمارها در قیاس با شاهد، می توان گفت



خون ماهیان نظیر خون انسان و بسیاری از مهره داران دیگر، شامل مایعی بنام پلاسماست که در داخل آن سلول های کربوسکول 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 D<sub>3</sub> در قیاس با سایر تیمارها دارد که به طبع در تیمار ۴۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D<sub>3</sub>، مقادیر ایمنوگلوبولین و گلبول سفید نیز بالا بوده است. بنابراین می تواند استدلالی بر نقش این ویتامین در جیره غذایی بر سلامت موجود زنده باشد. ایمنوگلوبولین ماهیان یک ماکروگلوبولین می باشد و شباهت بسیار زیادی به IgM انسانی دارد که در تحقیقات فیلوژنیک از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا اولین ایمنوگلوبولین تکامل یافته بوده و معمولا این کلاس ایمنوگلوبولین در ماهی بررسی می شود (۱۹). بررسی سطوح ایمنوگلوبولین ماهیان در تحقیق انجام شده در بچه ماهیان قزل آلا نشان داد که با افزایش مقادیر ویتامین D جیره غذایی با افزایش ایمنوگلوبولین 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 سال های اخیر، موضوع داغ محافل تحقیقاتی بوده و مطالعات حاکی است

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 تصویری 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).

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 ایمنوگلوبولین 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 آلا 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. شفر، ج.، برومیچ، ن.، ۱۳۸۱. پرورش متراکم ماهی - جلد اول. ترجمه ستاری و معتمد. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه

علاوه بر بیماری های عفونی می تواند نقش حفاظتی در برابر بیماری های خودایمنی (تولید پادتن های مضر در بدن) داشته باشد. آبرزی 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 آبرزی 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، آبرزی 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 ب ماهی ماده غذایی مفیدی است که در مناطق شمالی و جنوبی کشورمان جزو مواد اصلی برنامه غذایی محسوب می گردد. 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 میکروب ها و پیشگیری از کم خونی ناشی از فقر آهن مهم است. بنابراین حیاتی است که در سایت های آبرزی 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

- T(Hrsg.)Springer Lexikon Klinische Chemie.Medizinische Labordiagnostik von A-Z.Springer Medizin Verlag,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 immunoglobulin(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 Haematological Parameters and Weight Gain of TAMBAQUI(*Colossoma macropomum*).j.Instituto Nacinal de Pesquisas da Amazonia.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., Abeli,L.,1999.Monoclonal antibodies in fish immunology ;identification , ontogeny and activity of T-and B-lymphocytes.Aquaculture.172. PP: 3-28.
- 23.Sanchez,C.,Dominguez,J.,Coll,J.,1989.Immunoglobulin heterogeneity in the rainbow trout ,salmo gairdneri Richardson.Journal of Fish Diseases.12:PP: 459-465.
- گیلان.۱۹۴ص.
- ۶.عبد... مشائی، م. ۱۳۸۶.کاربردهای فیزیولوژی در پرورش ماهی.چاپ اول. انتشارات دریا سر. 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. ویتامین D و سیستم ایمنی . مجموعه مقالات پیرامون اختلالات ویتامین D. مرکز تحقیقات غددرودن ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۶ص.
- ۱۰.ویستر، ک.د.، لیم، ک.، ۱۳۸۵. تغذیه و نیازهای غذایی ماهیان در آبی 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. مستحیر، 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

24.Thomas L.Clinical Laboratory  
Diagnostice,1989.TH-Books  
Verlagsgesellschaft. First edition.PP:136-46.  
25.Z.Klin.Chem.Klin.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.

## Effects of vitamin D Diets in the fingerling Rainbow trout on Blood parameters and immune system

Dehghanzadeh S.<sup>(1)\*</sup>; Zamini A.A.<sup>(1)</sup>; Khara H.<sup>(1)</sup>

Sajjad\_dehghanzadeh@yahoo.com

1- Islamic Azad University- Lahijan Branch, Faculty of Natural Resource, Department of Aquaculture, Lahijan,Iran, P.O.Box:1616

Received:September 2013

Accepted: November 2013

### Abstract

Rainbow trout was a kind of fish which formed the basis of developing industry. This Study was very important in aquaculture industry there were 120 fry of rainbow trout with on average weight 3 gr at 8 weeks in 12 tank fiberglass with a density of 10 fish. They were determined the effect of different levels of vitamin D3 in Blood factor and immune system in 3 dietary treatments with 3 replicates and 1 control group did at concentrations of 3000, 4000 and 5000 International Units of vitamin D3. The study showed that the increasing amounts of the vitamin D3 in the diet of fish caused to increase plasma levels of vitamin D and increased levels of white blood cells and immunoglobulins. They Showed the increase of immune system and other factors blood such as : Hemoglobin , hematocrit , neutrophils , lymphocytes , monocytes , eosinophils, MCV, MCH, MCHC did not influence differences statistically significant( $p>0.05$ ).

**Keywords:** *Oncorhynchus mykiss*, Vitamin D3, Blood factor, Immune system, White Blood cell.

---

\*Corresponding author