مقاله علمی – پژوهشی:

تأثیر سطوح مختلف ویتامین C بر شاخص‌های رشد، برخی عوامل خونی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بچه ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*)

فرشته همت کوهسار[۱]، جواد میردار هریجانی*[۱]، احمد قرایی[۱]

*javadmirdar@uoz.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۲

چکیده

در تحقیق حاضر تأثیر سطوح مختلف ویتامین C بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بچه ماهی شیزوتراکس زارودنی بررسی شد. به همین منظور، تعداد ۱۴۴ عدد ماهی به‌صورت کاملاً تصادفی در ۱۲ وان فایبرگلاسی (۱۲ عدد ماهی در هر وان) توزیع و با ۳ تیمار غذایی حاوی ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و گروه شاهد (فاقد ویتامین C) به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. شاخص‌های رشد در انتهای دوره آزمایش اندازه‌گیری شد. همچنین جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های خونی بچه ماهی‌ها، خون‌گیری از سیاهرگ ساقه دمی ماهیان انجام شد. نتایج شاخص‌های رشد در تیمارهای مختلف با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($p>0/05$). بیشترین میانگین وزن نهایی، افزایش وزن و نرخ رشدویژه، ضریب چاقی، درصد افزایش وزن بدن و کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C مشاهده شد. میزان گلبول‌های قرمز در تمامی تیمارها با تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p<0/05$). بیشترین میزان گلبول قرمز در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C است که با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($p<0/05$). همچنین میزان گلبول سفید نیز در تمامی تیمارها افزایش داشت و با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p<0/05$). میزان فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارتات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز دارای اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد بود ($p<0/05$). میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز، گلوتاتیون رداکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و ایمنوگلوبین کل و پروتئین کل اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان داد ($p<0/05$). با توجه به تجزیه‌وتحلیل نتایج می‌توان بیان نمود که ویتامین C تأثیر مثبت بر عوامل خونی و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی *Schizothorax zarudnyi* دارد.

لغات کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، آنزیم‌های کبدی، *Schizothorax zarudnyi*، پارامترهای خونی، ویتامین C

*نویسنده مسئول

مقدمه

مزایای تغذیه از پروتئین‌های دریایی باعث شده است که آبزیان به عنوان مهم‌ترین ماده غذایی تأمین‌کننده احتیاجات غذایی جوامع بشری مورد توجه قرار گیرند (Webster and Lim, 2002). غذاهای دریایی تمام آمینواسیدهای لازم را در اختیار بدن قرار می‌دهند و در ساختمان بافت‌ها و بازسازی آنها نقش به‌سزایی دارند. به همین دلیل در برخی از رژیم‌های غذایی، مصرف گوشت ماهی توصیه می‌شود (Emadi *et al*., 2007). همگام با رشد تقاضا، افزایش روند آلودگی زیست‌بوم‌های دریایی به شکلی جدی، احتمال بروز مشکلات کیفی را در این منبع ارزشمند غذایی تشدید کرده است (Velayatzadeh *et al*., 2013).

ویتامین C (آسکوربیک اسید) که در گروه ویتامین‌های محلول در آب قرار دارد، یکی از ویتامین‌های حساس بوده که دارای نقش‌های متابولیک متعدد از جمله اثر بر رشد، افزایش بازماندگی و جلوگیری از مرگ‌ومیر، بهبود و التیام زخم‌ها، کاهش اثرات ناشی از استرس، افزایش مقاومت بدن ماهی در برابر عوامل بیماری‌زا و بهبود عملکرد تولید مثل، سنتز پروکلاژن و تبدیل غضروف به استخوان و نیز بلوغ گلبول‌های قرمز است (Li and Robinson, 1999; Dabrowski and Ciereszko, 2001). ترکیب رژیم غذایی ویتامین C به طور قابل‌توجهی وزن نهایی بدن، افزایش وزن کل، نرخ رشد ویژه و افزایش وزن روزانه را در ماهی تیلاپیای نیل افزایش داد (Ibrahim *et al*., 2020). همچنین ویتامین C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، در حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب اکسایشی و کاهش استرس ناشی از تراکم، دست‌کاری و جابه‌جایی، نقش مهمی ایفاء می‌کند (Miar *et al*., 2013). ویتامین C در آبزی‌پروری مدرن به عنوان یک تعدیل‌کننده ایمنی و یک عنصر تغذیه‌ای کلیدی در ارتقاء بقاء و عملکرد بهینه شناخته می‌شود (Trichet *et al*., 2015).

ماهی سفیدک (*Schizothorax zarudnyi*) جزو ماهیان با ارزش بومی منطقه سیستان محسوب می‌شود و مردم منطقه سیستان تمایل زیادی به مصرف این ماهیان دارند و به رغم وجود ماهیان پرورشی در بازار منطقه (کپور ماهیان چینی)، اولویت مصرف در بین مردم منطقه با ماهیان بومی است (Abdoli, 1999). جنس *Schizothorax* در منابع آبی از آسیای مرکزی (ترکمنستان) و شرق ایران در غرب تا مکان‌های دوری در شرق مانند رودخانه‌های مکونگ و یانگ تسه کیانگ چین یافت می‌شوند. تغذیه آن برخلاف سایر گونه‌های این جنس، آزادانه صورت گرفته است و در صورت فقدان سایر مواد غذایی، منحصراً از سایر ماهی‌های کوچک تغذیه می‌کند. با توجه به این‌که ماهی سفیدک سیستان در منطقه سیستان از ذخایر ژنتیکی محسوب می‌شود و می‌تواند به عنوان پتانسیل مهم در تولید ماهیان پرورشی باشد، اما با این‌حال اطلاعات کمی در مورد نیازهای غذایی این ماهی وجود دارد و تحقیقات قابل‌ملاحظه‌ای در زمینه فرمولاسیون غذایی این ماهی انجام نشده است. Javanmard و همکاران (۲۰۲۰) مکمل بتائین جیره غذایی را بر میزان رشد و شاخص‌های خون شناسی بچه ماهیان شیزوتراکس بررسی نمودند. همچنین Dahmardeh و همکاران (۲۰۲۲) نیز تغییرات آنزیم‌های گوارشی پانکراسی را از تخم تا لارو ماهی شیزوتراکس مورد بررسی قرار دادند. برای بازسازی ذخایر و پرورش این گونه با ارزش و بازارپسند، معین نمودن نیازهای غذایی و تنظیم جیره اختصاصی این ماهی، تضمین‌کننده استمرار تکثیر و پرورش آن است. بنابراین، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین C بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بچه ماهی سفیدک سیستان انجام شد.

مواد و روش کار

پژوهش حاضر با ماهیان سفیدک سیستان با میانگین وزن ۱۵/۳۵±۰/۷۲ گرم و طول ۱۱/۰۸±۰/۱۰ سانتی‌متر، از مهر ۱۳۹۹ به مدت ۶۰ روز در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی زهک انجام شد. پس از طی یک هفته و سازگاری کامل ماهیان با شرایط پرورشی، جهت شروع دوره‌ی آزمایش در قالب ۴ تیمار و ۳ تکرار، ماهی‌ها در ۱۲ تانک فایبر گلاس ۳۰۰ لیتری (۱۲ ماهی در هر تانک) با میانگین دمایی ۱۲/۴۰±۲/۱۱ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۷/۴±۰/۴ میلی‌گرم / میلی‌لیتر و pH برابر با ۷/۶±۰/۴ قرار گرفتند.

روزانه حدود ۵۰٪ آب وان‌ها تعویض می‌شد. همچنین وان‌ها به طور کاملاً تصادفی بر اساس تیمارها شماره‌گذاری شدند. اسکوربیک اسید مورد استفاده ساخت شرکت اوج آزماپلاست از داروخانه‌های دامپزشکی سطح شهر زابل با جرم مولکولی ۱۱۲/۱۷۶ گرم بر مول، فرمول مولکولی $C_6H_8O_6$، چگالی ۶۵ گرم بر سانتی متر مکعب، نقطه ذوب ۱۹۰ درجه سانتی گراد و نقطه جوش ۵۳۳ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. جهت ساخت جیره‌ها، میزان اسکوربیک اسید مدنظر با غذای تجاری کپور معمولی شرکت فرادانه مخلوط شد و با توجه به میانگین وزنی ماهیان به میزان ۳ درصد وزن بدن و دو وعده در روز در ساعات ۸ و ۱۴ غذادهی شدند (جدول ۱).

جدول ۱: جیره پایه استفاده شده در این تحقیق (شرکت فرادانه)

Table 1: Basic diet used in this research (Faradane Company)

Row	Compounds	Amount (%)
1	Minimal protein	40-43
2	Minimal fat	4-8
3	Minimal fibre	3-6
4	Maximum humidity	5-11
5	Maximum Ash	7-11
6	Maximum Phosphorus	1-1.5
7	Feed size (mm)	1-2

برای تعیین عملکرد جیره‌های غذایی وتاثیر جیره‌ها بر رشد، در ابتدا و انتهای دوره پژوهش، تمامی ماهی‌ها مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند. وزن ماهی با ترازویی با دقت ۰/۰۱ گرم و طول ماهی‌ها با استفاده از خط کش با دقت ۱ میلی‌متر انجام شد. (در زمان زیست‌سنجی، ابتدا ماهی‌ها با اسانس گل میخک ۵۰ میکرولیتر در لیتر بی‌هوش شدند). پس از انجام زیست سنجی، شاخص‌های رشد (وزن نهایی، افزایش وزن، درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، ضریب چاقی و میزان بقاء)، با استفاده از رابطه‌های موجود اندازه‌گیری شد (Bekcan *et al*., 2006). شمارش گلبول‌های قرمز (RBC) و سفید (WBC) خون با استفاده از محلول‌های Hayem و Turk صورت گرفت. غلظت هموگلوبین (Hb) با استفاده از روش سیانومت هموگلوبین تعیین شد. درصد هماتوکریت (Ht) بوسیله لوله‌های مویرگی میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد (Blaxhall and Daisley, 1973). شاخص حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) و میانگین غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC) نیز مطابق با Blaxhall و Daisley (۱۹۷۳) تعیین شد. شمارش افتراقی لوکوسیت‌ها نیز با استفاده از روش رنگ آمیزی Wright-Giemsa گزارش شد. برای نمونه‌گیری از خون، ۵ ماهی به طور تصادفی از هر تانک، جمع آوری و در عصاره گل میخک رقیق شده (۵۰ میکرولیتر در لیتر) بیهوش شدند. نمونه‌های خون به آرامی با استفاده از یک سرنگ پلاستیکی از ساقه دمی گرفته شده و به دو قسمت تقسیم شد. اولین قسمت در ۱۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سپس سرم آن جدا و در دمای ۸۰- تا زمان استفاده نگهداری شد. بخش دوم به میکروتیوپ‌های حاوی هپارین برای اندازه‌گیری پارامترهای خون منتقل شدند. پس از جداسازی سرم خون از طریق سانتریفیوژ، اندازه‌گیری آنزیم‌های SOD (سوپراکسید دیسموتاز)، CAT (کاتالاز)، MDA (مالون دی آلدئید) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) با دستگاه الایزاریدر BioTek مدل ELX800 و آنزیم‌های AST (آسپارتات آمینو ترانسفراز)، LDH (لاکتات دهیدروژناز) ALP(آلکالین فسفاتاز) با اسپکتوفتومتر UNICO مدل UV2100 در آزمایشگاه ویرومد استان گیلان انجام شد (Saffari *et al*., 2016).

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. جهت تشخیص وجود اختلاف بین تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way Anova) استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها در صورت وجود اختلاف بین آنها با آزمون دانکن (Duncan) در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

تاثیرسطوح مختلف ویتامین C بر عوامل رشد و بقاء در ماهی سفیدک سیستان در تیمارهای مختلف در جدول ۲ ارائه شده است. با توجه به نتایج، در عوامل رشد تیمارهای مورد آزمایش با تیمار شاهد، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$).

جدول ۲: نتایج شاخص‌های رشد (میانگین±انحراف معیار) و بازماندگی ماهی سفیدک سیستان تغذیه شده با سطوح مختلف ویتامین C

Table 2: Results of growth indices (mean ± standard deviation) and survival of *Schizothorax zarudnyi* fed with different levels of vitamin C

Treatment				Parameter
1000 (mg/kg Vit. C)	500 (mg/kg Vit. C)	100 (mg/kg Vit. C)	Blank	
15.68± 0.14	15.31 ± 0.18	15.08 ± 0.68	15.28± 0.07	initial weight (gr)
10.63 ± 0.17	10.48 ± 0.21	11.11± 0.21	11.53 ± 0.26	initial length (cm)
17.96 ± 0.37	17.18 ± 0.47	16.83 ± 0.30	17.02 ±0.52	final weight (gr)
12.45 ± 0.75	12.50 ± 0.35	93.12 ± 0.44	13.06 ± 0.83	final length (cm)
2.86 ± 0.44	1.87 ± 0.38	75.10 ± 0.97	1.74 ± 0.45	Weight gain (gr)
14.61 ± 2.90	12.19± 2.45	18.12 ± 7.25	11.39 ± 2.91	Body weight gain (%)
0.61 ± 0.23	1.43± 0.16	8.10 ± 0.18	1.85 ± 0.23	Food conversion ratio
0.9. ± 0.02	0.87 ± 0.05	0.78± 0.08	0.23 ± 0.019	Condition factor
3.80 ± 0.07	3.11 ± 0.64	2.91 ± 1.62	2.89± 0.75	Specific growth rate (%)
100	100	100	100	Survival (%)

فقدان حروف در جدول نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است (p>۰/۰۵).

تاثیرسطوح مختلف ویتامین C بر عوامل خونی در ماهی سفیدک سیستان در تیمارهای مختلف مورد بررسی در جدول ۳ ارائه شده است. با توجه به نتایج، بین تمامی عوامل مورد آزمایش با تیمار شاهد، اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p<۰/۰۵).

جدول ۳: میزان فاکتورهای خونی تحت تأثیر درجیره غذایی حاوی ویتامین C در سطوح مختلف مورد آزمایش

Table 3: Amount of blood factors (mean ± standard deviation) of *Schizothorax zarudnyi* fed with different levels of vitamin C

Treatment				Parameter
1000 (mg/kg Vit. C)	500 (mg/kg Vit. C)	100 (mg/kg Vit. C)	Blank	
5866.66± 33.33^{c}	7333.33± 88.93^{d}	4320.00±75.71^{b}	3813.00± 24.03^{a}	WBC×10^6 (cells.mm^3)
20566.6±8819.17^{d}	17733.00±6663.66^{c}	134.33±21.86^{b}	123666.66±1201.50^{a}	RBC×10^3 (cells.mm^3)
14.5± 0.17^{d}	11.8± 0.30^{c}	8.86±0.88^{b}	8.36± 0.185^{a}	Hb (gr.dl)
52.33± 1.30^{d}	42.67± 1.33^{c}	36.66±0.66^{b}	32.33±1.20^{a}	Ht (%)
241.33± 2.40^{a}	248.33± 0.88^{b}	263.66±.2.33^{c}	271.66±1.66^{d}	MCV (fl)
28.33±0.21^{d}	27.30±0.30^{c}	24.03±0.30^{a}	25.43±0.17^{b}	MCHC (gr.dl)
74.66± 0.33 ^{a}	74.33± 0.33^{a}	80.66± 0.33 ^{c}	79.33±0.33^{b}	Lymphocyte (%)
20.66±0.66 ^{c}	22.33±0.66 ^{c}	15.33±0.33^{a}	17.33±0.26 $^{a\,b}$	Neutrophil (%)
3.41±0.23 ^{b}	3.33±0.21^{ab}	3.66±0.34 ^{b}	2.33±0.33^{a}	Monocyte (%)

حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵)

نتایج سنجش فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنتی اکسیدانی در ماهی سفیدک سیستان تغذیه شده با جیره‌های مختلف ویتامینC در جدول ۴ ارائه شده است. طبق نتایج، میزان فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین ترانسفراز (ALT)، میزان پروتئین کل، میزان فعالیت ایمنوگلوبین کل[1]، گلوتاتیون رداکتاز (GR)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، درتیمارهای آزمایشی با شاهد، اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).

[1] Total immunoglobulin

جدول ۴: میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنتی اکسیدانی، ایمنوگلوبین کل و پروتئین کل تحت تأثیر درجیره غذایی حاوی ویتامین C در سطوح مختلف

Table 4: Activity level of liver and antioxidant enzymes, total immunoglobulin and total protein (mean ± standard deviation) of *Schizothorax zarudnyi* fed with different levels of vitamin C

Treatment				Parameter
1000 (mg/kg Vit. C)	500 (mg/kg Vit. C)	100 (mg/kg Vit. C)	Blank	
123.66±3.48[a]	141.00±2.08[b]	195.66±2.66[c]	193.66±1.85[c]	AST (u.l)
16.33±0.88 [a]	15.00±1.00[a]	30.33±0.88 [c]	21.66±0.88 b	ALT (u.l)
1080±5.77[b]	863.66±4.17 [a]	1183.33±0.88 [c]	1176.33±3.17 [c]	LDH (u.l)
72.33±1.20[b]	64±1.52[a]	88.00±1.52 [c]	73.66±0.88[b]	ALP (u.l)
2.68±0.03[c]	2.39±0.12 [ab]	2.20±0.43[ab]	2.09±0.47[a]	TOTAL P (g.dl)
14.98±0.65 [b]	15.08±0.33[b]	13.20±0.33[a]	12.18±0.32[a]	TOTAL IM (g.dl)
53.33±0.66[b]	60.00±0.57 [c]	51.33±0.33[a]	51.66±0.88[a]	GR (nmol.mg p)
37.86±0.41[b]	42.00±0.23 [c]	36.76±0.28[b]	34.66±0.60[a]	SOD (u.ml)
88.66±0.88 [a]	93.66±0.33 [b]	91.33±0.88 [a]	105.33±1.76[c]	CAT (u.ml)
212.66±1.45[c]	198.66±0.88 [b]	202.66±1.45[b]	190.00±1.15[a]	GPx (u.ml)

حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

بحث

نتایج این تحقیق نشان‌دهنده اثر مثبت ویتامین C با توجه به افزایش غلظت و میزان ویتامین C در شاخص‌های رشد بچه ماهی سفیدک سیستان است، هر چند این تأثیر معنی‌دار نبوده است. تأثیر مثبت ویتامین C در بهبود عوامل رشد در ماهی را می‌توان به نقش کوآنزیمی این ویتامین در اکسیداسیون تیروزین و فنیل آلانین به عنوان دو اسیدآمینه مهم و ضروری جهت رشد نسبت داد (Ibrahim *et al.*, 2020).

عوامل رشد (درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و ضریب چاقی) از گروه شاهد به طرف گروه تغذیه شده با سطوح ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C جیره، افزایش یافته و ضریب تبدیل غذایی کاهش یافته است که در این زمینه می‌توان گفت که سلامتی ماهی تغذیه شده با مقادیر بیش از حد یا ناکافی مواد مغذی خاص کاهش خواهد یافت.

Zhuo و همکاران (۲۰۱۲) اثر مقادیر مختلف ویتامین C را بر عملکرد رشد و ایمنی اولیه در ماهی *Rachycentron canadum* بررسی و نشان دادند که میزان ویتامین C به طور قابل‌توجهی بر عملکرد رشد مؤثر بوده و با افزایش میزان مصرف ویتامین C، عملکرد رشد و درصد بقاء افزایش یافته است. حضور این ویتامین در جیره غذایی به منظور حفظ سلامت عملکرد فیزیولوژیک و بهبود رشد ماهی ضروری است. براین اساس این احتمال وجود دارد که افزایش غلظت ویتامین C، ROS تولیدی را در فرایند هضم که ممکن است از جذب مواد غذایی جلوگیری کند، مهار می‌کند. بنابراین، رشد را بهبود می‌بخشد (Sandnes *et al.*, 1984). عامل تنظیم کننده ویتامین C نرخ متابولیک است و این عامل در سنین پایین‌تر بیشتر است (Adewolu and Aro, 2009). عدم تأثیر ویتامین C بر شاخص‌های رشد در مطالعه Trenzado و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شده است. در بررسی تغذیه ماهیان شانک سرطلایی *Sparus aurata* نگهداری شده در شرایط تراکم بالا با جیره حاوی ویتامین C نیز مشخص گردید که افزودن ویتامین در جیره غذایی تاثیری بر رشد و ضریب تبدیل غذایی در این گونه دریایی ندارد (Ortuno *et al.*, 2019). تفاوت در نیاز ویتامین C و تفاوت در مطالعات انجام شده محققین مختلف، احتمالاً به نوع گونه، اندازه ماهی، شکل ویتامین یا شرایط آزمایش و شرایط پرورش بستگی دارد.

نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که افزایش ویتامین C در جیره غذایی ماهی سفیدک سیستان باعث بهبود شاخص‌های خونی می‌شود به‌طوری‌که با افزودن ویتامین C بسیاری از شاخص‌های خونی از جمله گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت افزایش یافت. به طور کلی، افزایش فعالیت ویتامین C بر هماتولوژی ماهی به نقش آن در آزاد شدن فریتین کبدی و استفاده از آن برای فرآیند اریتروپوئزی

(تولید گلبول‌های قرمز خون) مربوط است. همچنین ویتامین Cبه جذب آهن از دستگاه گوارش کمک می‌کند. بنابراین، در گروه‌های اضافه شده ویتامین C، افزایش در گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت ممکن است به دلیل این عمل باشد (Cox *et al*., 2017). در همسویی نتایج تحقیق جاری، جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف ویتامین C و Eدر ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) باعث افزایش گلبول‌های قرمز گردید (Tatina *et al*., 2012). همچنین تحقیقات نشان داده است که افزایش ویتامین C مو جب افزایش گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت خون ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (Miar *et al*., 2013) و گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، نوتروفیل و منوسیت در خون ماهی کپور معمولی می‌شود (Mirshahvalad and Kazemian, 2017). گلبول‌های قرمز خون در ماهی *gigas Arapaima* تغذیه شده از مکمل‌های غذایی حاوی ویتامین‌های C و E افزایش یافت (Andrade *et al*., 2007). همچنین افزایش ویتامین‌های C و E در جیره غذایی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) باعث افزایش شاخص‌های هماتولوژی (گلبول سفید، گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت) گردید (Khara *et al*., 2016).

بیشترین میزان گلبول سفید در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C است که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$). کمترین میزان گلبول سفید در تیمار شاهد، گزارش شد. همچنین میزان گلبول‌های سفید خون در تمامی تیمارها افزایش یافت و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری دارد ($p<۰/۰۵$). از آن‌جایی‌که گلبول‌های سفید خونی به‌ویژه لنفوسیت‌ها نقش عمده‌ای در سیستم دفاعی ماهی دارند، تغییر تعداد این سلول‌ها تحت تأثیر محرک‌های ایمنی، منطقی به‌نظر می‌رسد. از سویی، بسیاری از مواد هومورال غیر اختصاصی سیستم ایمنی ماهی به‌وسیله گلبول‌های سفید خونی ترشح می‌شوند که افزایش این عوامل هومورال تحت تأثیر افزایش لکوسیت های خونی بوده است (Darias *et al*., 2011).

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید یکی از با ارزش‌ترین پارامترهای خونی اندازه‌گیری شده درماهیان است که نشان‌دهنده انواع سلول‌های خونی است. ویتامین C دارای تأثیر زیادی در پارامترهای مختلف پاسخ ایمنی است و مقادیر جذب شده این ویتامین از طریق جیره غذایی می‌تواند بسیاری از عملکردهای سیستم ایمنی را در ماهی تحت تأثیر قرار دهد (Lee and Shiua, 2002). شاخص‌های خون ماهیان *Brycon amazonicus* در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید لنفوسیت بیشترین درصد را به‌خود اختصاص داده بود. کم‌ترین تعداد متعلق به منوسیت‌ها و بیشترین درصد نوتروفیل‌ها در تیمار حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین C مشاهده شد. در این مطالعه تعداد گلبول‌های سفید در تیمار تغذیه شده با ویتامین C به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد، افزایش یافت که خود بیانگر تحریک سیستم ایمنی به‌وسلیه ویتامین C است (Affonso *et al*., 2007). براساس یافته‌های این تحقیق می‌توان بیان نمود که ویتامین C در روش خوراکی ایمنی غیر اختصاصی را در ماهی سفیدک سیستان تحریک نمود که با افزایش غلظت رابطه مستقیم دارد.

آنزیم‌های کبدی به عنوان شاخص فعالیت کبدی محسوب می‌شوند و تغییر در میزان فعالیت و ترشح آنها می‌تواند متأثر از عوامل فیزیکی و شیمیایی آب، تراکم، شرایط پرورشی، نوع جیره مصرفی سن و جنس وضعیت سلامت ماهیان باشد Adel *et al*., (2015). باتوجه به نتایج این تحقیق، بیشترین میزان AST، ALP و ALT در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C مشاهده شده و در دو تیمار دیگر با کاهش این آنزیم‌ها همراه بوده است. به عبارتی، با افزایش غلظت ویتامین C میزان AST، ALP و ALT کاهش یافته است که این کاهش ناشی از اثرات محافظتی ویتامین C در کاهش پراکساید هیدروژن و آسیب‌های سلولی است (Hao *et al*., 2014). این نتایج هم سو با نتایج Asaikkuttia و همکاران (۲۰۱۹) است که نشان دادند، افزایش ویتامین C به جیره غذایی ماهی کپور باعث کاهش همه عوامل مورد بررسی از قبیل آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز گردید. مطالعه Darabitabar و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که مکمل ویتامین C در غلظت بالای ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم

در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های AST، ALP و ALT کبدی در خون، پس از ۱۰ روز گردید که این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده مؤثر نبودن غلظت‌های بالای ویتامین C بر فعالیت این آنزیم‌ها در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باشد.

LDH از جمله مهم‌ترین آنزیم‌هایی است که نقش بسیار مهمی در فرآیندهای متابولیک بدن و سلامت ماهیان دارد و به عنوان نشانگر زیستی مناسب در مطالعات سم‌شناسی معرفی شده است (Boge *et al*., 1992). غلظت LDH با میزان مرگ‌ومیر سلول و لیز شدن سلول‌ها رابطه مستقیم دارد. آنزیم LDH درسیتوپلاسم تمام سلول‌های بدن ماهی به‌ویژه در بافت عضله اسکلتی، قلب، کبد، کلیه یافت می‌شود و در اثر بروز هر گونه آسیب به غشاء سلولی آزاد می‌شود و سطح آن در خون افزایش می‌یابد (Velisek *et al*., 2006). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که بیشترین میزان فعالیت ایمنوگلوبین کل در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C نشان داده شد که اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد ($p<۰/۰۵$). همچنین کمترین میزان فعالیت ایمنوگلوبین کل در تیمار شاهد نمایش داده شد. سطوح مختلف ویتامین C باعث افزایش ایمونوگلوبین در بچه ماهی تاس ماهی سیبری (*Aceipenser caspius*) گردید (Pourgholam *et al*., 2014). افزودن ویتامین C به جیره غذایی ماهی آزاد دریای خزر باعث افزایش ایمنوگلوبین می‌شود (Khara *et al*., 2016). تحقیقات مختلف نشان داده است که میزان ویتامین C مورد نیاز متناسب با گونه ماهی متفاوت است و نمی‌توان به عنوان یک اصل کلی این میزان را به سایر ماهیان تعمیم داد (Lim and Lovell, 1987).

میزان پروتئین کل خون نیز در تحقیق حاضر تحت تأثیر افزودن ویتامین C به جیره غذایی قرار گرفت و با افزایش میزان ویتامین C در جیره، مقدار پروتئین کل نیز افزایش یافت. در تضاد با نتایج تحقیق حاضر، ویتامین‌های افزوده شده به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با دوزهای متفاوت تأثیری بر میزان پروتئین کل خون نداشت (Miar *et al*., 2013). تحقیقات Ramesh و همکاران (۱۹۹۳) نشان داد که کاهش اکسیژن محلول آب، تولید فضولات و مدفوع ماهیان و تولید آمونیاک، در نتیجه شرایط نامساعد محیطی، میزان پروتئین کل خون را کاهش می‌دهد.

بیشترین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز درتیمار ۱۰۰۰ میلی گرم درکیلوگرم ویتامین C به ثبت رسید که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). کمترین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در تیمار شاهد وجود داشت. گلوتاتیون پراکسیداز، سلول و غشاء آن را از آسیب‌های اکسیداتیوی که در نتیجه تخریب پراکسید هیدروژن و هیدروپراکسیدها ایجاد می‌شود، حفظ می‌کند (Wang *et al*., 2007). افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز می‌تواند سبب تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن شود (Hilton *et al*., 1980). به عبارتی، ویتامین C به عنوان یک میکرونوترنیت در تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) با آنزیم GPx همکاری می‌کند.

این تحقیق مشخص نمود که افزودن ویتامین C به جیره غذایی بچه ماهیان سفیدک سیستان باعث بهبود و ارتقاء عوامل رشد و شاخص‌های خونی، ایمنولوژیک و متابولیک گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه در تحقیق حاضر نسبت به تیمار شاهد شده است.

تشکر و قدردانی

منابع مالی این تحقیق از محل پژوهانه UOZ-GR-8746 معاونت پژوهشی دانشگاه زابل تأمین گردیده است که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Abdoli, A., 1999. Fishes of inland waters of Iran. *Naghshe Mana*, Iran. pp 206-215. (In Persian)

Adel, M., Pourgholam, R., Zorriehzahra, S. and Ghiasi, M., 2015. The effect of different levels of *Mentha piperita* on some of the hematological, biochemical and immune parameters of Oncorhynchus mykiss. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 24(1):37-46. (In Persian)

Adewolu, M.A. and Aro, O.O., 2009. Growth, feed utilization and hematology of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings fed diets containing different levels of vitamin C. *American Journal of Applied Science Publication*, 6:1675-1681.

Affonso, E.G., Silva, E.C., Tavares-Dias, M., Menezes, G.C., Carvalho, S.M., Nunes, E.S.S., Ituassu, D.R., Roubach, R., Ono, E.A., Fim, J.D.I. and Marcon, J.L., 2007. Effect of high level of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxa (*Brycon amazonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147:383-388. DOI:10.1016/j.cbpa.2007.01.004

Andrade, J.I.A., Ono, E.A., Menezes, G.C., Brasil, E.M., Roubach, R., Urbinati, E.C. and Tavares, M., 2007. Influence of diets supplemented with vitamins and E on Pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146:576-580. DOI:10.1016/j.cbpa.2006.03.017

Asaikkuttia, A., Bhavana, P.S., Vimalab, K., Karthika, M. and Cheruparambathca, P., 2019. 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. DOI:10.1016/j.aqrep.2016.04.002

Bekcan, S., Dogankaya, L. and Cakirogullari, G. C. 2006. Growth and body composition of European catfish (*Silurus glanis* L.) fed diets containing different percentages of protein. Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh 58(2):137-142. DOI:10.46989/001c.20430

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5:771-781. DOI:10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x

Boge, G., Leydet, M. and Houvet, D., 1992. The effects of hexavalent chromium on the activity of alkaline phosphatase in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 23:247-260. DOI:10.1016/0166-445X(92)90056-S

Cox, H. D., Miller, G. D., Lai, A., Cushman, D. and Eichner, D., 2017. Detection of autologous blood transfusions using a novel dried blood spot method. *Drug Testing and Analysis*, 9(11-12):1713-1720. DOI:10.1002/dta.2323

Dabrowski, K. and Ciereszko, A., 2001. Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. *Aquaculture research*, 32(8):623-638. DOI:10.1046/j.1365-2109.2001.00598.x

Dahmardeh, F., Gharaei, A., Mirdar Harijani, J., Jamshidian, A. and Rahdari, A., 2022. Investigation of pancreatic digestive enzymes changes from egg to larvae phase of *Schizothorax zarudnyi*, *Journal of Applied Ichthyological Research*, 8(5):140-145. (In Persian)

Darabitabar, F., Hedayati, A., Salati, A. and Hosseinifar, H., 2017. Effect of dietary supplementation vitamin C in liver tissue destruction rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the face of nano-zinc oxide, *Journal of Comparative Pathobiology*, 13(4):2021-2028. (In Persian)

Darias, M.J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Le Gall, M.M., Huelvan, C., Desbruyeres, E., Quazuguel, P., Cahu, C.L. and Zambonino Infante, J.L., 2011. Imbalanced dietary Ascorbic acid alters

molecular pathways involved in Skeletogenesis of developing European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 714-724. DOI:10.1016/j.cbpa.2011.01.013

Emadi, H., Khoshkho, Z.H. and Behzadi, D., 2007. Sea foods and health. *Aquatic Academic Press*, Iran. pp 1-85. (In Persian)

Hao, X., lin, Q. and Hong, F., 2014. Effects of dietary selenium on the pathological changes and oxidative stress in loach (*Paramisgurnus dabaryanus*). *Fish Biochemistry and Physiology*, 40(5):1323-131. DOI:10.1007/s10695-014-9926-7

Hilton, J., Hodson, P. and Slinger, S., 1980. The requirement of fingerling channel fish. *The Journal of Nutrition*, 114: 627-633.

Ibrahim, R.E., Ahmed, S.A., Amer, S.A., Al-Gabri, N. A., Ahmed, A. I., Abdel-Warith, A.W.A., Younis, E.M.I. and Metwally, A.E., 2020. Influence of vitamin C feed supplementation on the growth, antioxidant activity, immune status, tissue histomorphology, and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Reports*, 18, 100545. DOI:10.1016/j.aqrep.2020.100545

Javanmard, M., Mirdar Harijani, J., Gharaei, A. and Arshadi, A., 2020. Effect of dietary betaine supplementation on growth indices, hematology and resistance of *Schizothorax zarudnyi* to salinity stress. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 29(2):33-42. (In Persian)

Khara, H., Sayyadborani, M. and 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. DOI:10.4194/1303-2712-v16_2_18

Lee, M.H. and Shiau, S.Y., 2002. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, Penaeus monodon. *Fish and Shellfish Immunology*, 12:119-129. DOI:10.1006/fsim.2001.0357

Li, M.H. and Robinson, E.H., 1999. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. *Journal of Applied Aquaculture*, 9(2):53-80.

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

Miar, A., Matinfar, A., Shamsaei, M. and 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 Science*, 5(2):220-226. DOI:10.5829/idosi.wjfms.2013.05.02.726

Mirshahvalad, F. and Kazemian, M., 2017. The effect of vitamin C on some growth parameters and a number of hematological indices of blood serum of Koi fish (*Cyprinus carpio*), *Journal of marine science and technology research*, 11(2): 58-68. (In Persian)

Ortuno, J., Cuesta, A., Esteban, M.A. and Meseguer, J., 2019. Effect of oral administration of high dietary vitamin C and E dosages on *Sparus aurata* innate immune system. *Aquaculture*, 79:167-180. DOI:10.1016/S0165-2427(01)00264-1

Pourgholam, Y., Khara, H. and Mohseni, M., 2014. Effects of different levels of vitamin C on Blood parameters and immune system of Siberian Sturgeon fingerlings (*Acipen serbaerii*), *Journal of Plasma and Biomarkers*, 7(2):79-85. (In Persian)

Ramesh, K., Sivakumari, M.K., Kanagaraj, K. and Manavalaramanu, J., 1993. Toxicity of dye eZuent in lactate dehydrogenase activity in *Labeo rohita*. *Journal Environment Protal*, 13:124-127.

Saffari, S., kyvanshokooh, S., zaker, M. and phsha-zanoosi, H., 2016. Effect of different dietary selenium sources (sodium selenit, selenomethionine and nanoselenium) on growth performance, muscle composition,blood enzymes and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture nutrition*, 12428:1-7. DOI:10.1111/anu.12428

Sandnes, K., Ulgenes, Y., Braekkan, O. and Utne, F., 1984. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trouth (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 43(30):167 -177. DOI:10.1016/0044-8486(84)90019-X

Tatina, M., Bahmani, M., Soltani, M. and Gharibhani, M., 2012. The Effect of diets supplemented with vitamins C and E on WBC fluctuations of Acipenser ruthenus. *New Technologies in Aquaculture Development (Journal of Fisheries*), 6(21):19-30. (In Persian)

Trenzado, C. E., De la Higuera, M. and Morales, A.E., 2007. Influence of dietary vitamins E and C and HUFA on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance under crowding conditions. *Aquaculture*, 263:249-258. DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.11.007

Trichet, V.V., Santigosa, E., Cochin, E. and Gabaudan, J., 2015. Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health, *Wiley-Blackwell*. Hoboken, New Jersey, USA, pp. 151-171. DOI:10.1002/9781119005568.ch7

Velayatzadeh, M., AskarySary, A., Beheshti, M., Mahjob, S. and Hoseini, M., 2013. Measurement of Heavy metals (Hg, Cd, Sn, Zn, Ni, Fe) in canned tuna fish product in central cities, Iran. *Journal of Iran Biology*, 26(4):498-499. (In Persian)

Velisek, J., Dobsikova, Z., Modra, H. and Luskova, V., 2006. Effect of deltamethrin on the biochemical profile of common carp (*Cyprinus carpio*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*,76:992-998. DOI:10.1007/s00128-006-1016-9

Wang, H., Zhang, S. and Yu, H., 2007. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 42:1524–1533. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.013

Webster, C. D., and Lim, C., 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. *CABI Press, Boca Raton, USA*, pp. 105-121.

Zhou, Q., Wang, L., Wang, H., Xie, F., Wang, T., 2012. Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Fish and Shellfish Immunology*, 32:969. DOI:10.1016/j.fsi.2012.01.024

Effect of different levels of Vitamin C on growth indices, some blood parameters, and antioxidant enzymes activity of *Schizothorax zarudnyi*

Hemmat Koohsar F.[1]; Mirdar Harijani J.[1*]; Gharaei A.[1]

*javadmirdar@uoz.ac.ir

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran

Abstract

In this study, the effect of different levels of vitamin C on growth indices, hematology, and antioxidant enzymes activity was studied in *Schizothorax zarudnyi*. For this purpose, a total of 144 fish was randomly distributed in 12 fiberglass tanks (12 fish per tanks) and fed with 3 dietary treatments containing 100, 500 and 1000 mg/kg of vitamin C and a control group without vitamin C for 60 days. The biological parameters of juveniles were measured at the end of the experimental period. To measure liver enzymes, antioxidant enzymes and also blood parameters, blood sampling from the tail vein of fish were performed. The results of growth indices in different treatments did not show a significant difference with the control group (p<0.05). The highest mean final weight, weight gain and specific growth rate, condition factor, body weight gain percentage and lowest feed conversion ratio were observed in 1000 mg/kg vitamin C treatment. The amount of red blood cells in all treatments was significantly different from the control treatment (p<0.05). The highest amount of red blood cells was in the treatment of 1000 mg/kg of vitamin C, which was significantly different from the control group (p <0.05). Also, white blood cell count increased in all treatments and there was a significant difference with the control group (p<0.05). The highest amount of white blood cells was recorded in the treatment of 500 mg/kg of vitamin C. Which had a significant difference with the control group (p<0.05). The alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and lactate dehydrogenase had a significant difference with the control group (p<0.05). The antioxidant enzymes catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, total immunoglobulin, and total protein are significantly different from the control group (p<0.05). According to the analysis of the results, it can be acknowledged that vitamin C has a positive effect on blood factors and antioxidant enzymes in *Schizothorax zarudnyi.*

Keywords: Antioxidant enzymes, Liver enzymes, *Schizothorax zarudnyi*, Blood parameters, Vitamin C

*Corresponding author