

Effects of dietary vitamin C on the biochemical and immune parameters of goldfish (*Carassius auratus*) breeders in response to handling stress

Taheri, S.¹, Sajjadi, M.M.¹, Falahatkar, B.^{1*}, Safari, R.²

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeih Sara, Iran

2-Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 16 August 2023

Accepted: 7 November 2023

Abstract

Introduction: In aquaculture, controlled reproduction is very important, and the quality of gametes in breeders is one of the limiting factors of aquaculture. It is necessary to use high quality gametes in breeding process to improve reproductive performance and produce suitable larvae. Manipulation of aquatic organisms, especially broodstock during reproduction, often increases the biological activities of the organism and causes changes in the behavior and physiological characteristics of fish. The present study was conducted to determine the effects of dietary vitamin C on biochemical, liver plasma enzymes activity, and immune parameters in response to handling stress in goldfish (*Carassius auratus*).

Materials and Methods: A total of 120 female broodstock with an average weight of 90.00 ± 1.29 g were distributed in four treatments (with three replicate) and the feeding period lasted for eight weeks. The treatments included: non-stressed fish fed a diet without vitamin C (0 mg/kg) (S^-C^-), non-stressed fish fed a diet containing vitamin C (1000 mg/kg) (S^-C^+), fish under stress fed a diet without vitamin C (0 mg/kg) (S^+C^-) and stressed fish fed a diet containing vitamin C (1000 mg/kg) (S^+C^+). In the stress treatments, the broodstock were chased and caught by a hand net daily for one min and exposed to air for another one min. At the end of the experiments, the biochemical and immune indices were measured.

Results and Discussion: A significant difference was observed in the interaction between vitamin C and stress in biochemical and immune parameters in different treatments ($p < 0.05$). Stress caused a significant increase in some biochemical indices such as cholesterol, triglycerides, cortisol, glucose, and liver plasma enzyme levels in the S^+C^- treatment ($p < 0.05$). Disturbances in the biosynthesis and metabolism of lipids and lipoproteins in fish liver can lead to damage to the cell membrane, as well as the induction or

inhibition of enzymes involved in lipid metabolism. These changes can also affect hormone levels that impact lipid metabolism, leading to alterations in the circulating levels of triglycerides and cholesterol in fish exposed to stress. Additionally, the significant increase in triglyceride and cholesterol levels in fish plasma may be a physiological response to provide enough energy to minimize the harmful effects of stress. The reduction of cholesterol and triglyceride levels in fish supplemented with vitamin C is likely due to the high ability of this vitamin as an anti-stress factor and the lack of need for fat metabolism to combat stress. The induction of stress significantly increased the level of liver plasma enzymes in the bloodstream of goldfish broodstock. Vitamin C caused a significant decrease in biochemical parameters in the S⁻C⁺ treatment ($p<0.05$). Stress caused a significant decrease in immune parameters in the S⁺C⁻ treatment ($p<0.05$) and improved immune parameters under stress conditions in the S⁺C⁺ treatment ($p<0.05$).

Conclusion: In stress conditions, vitamin C is able to maintain the level of immune responses at a normal level by inhibiting the secretion of corticosteroids, strengthening the antioxidant power of the host, increasing the efficiency of the liver and lymph tissues involved in the production of molecules related to the immune system. In general, the results of the present study showed that dietary vitamin C can act as a strong stimulant to improve the immune system and reduce the effect of stress factors in goldfish breeders.

Keywords: Growth, Feed Conversion Ratio, Trypsin, Protein, Digestion, Gastrointestinal System

* Corresponding Author: falahatkar@guilan.ac.ir

"مقاله پژوهشی"

اثر ویتامین C جیره بر شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی مولدین ماهی طلایی (*Carassius auratus*) در مواجهه با استرس دستکاری

سمیه طاهری^۱، میر مسعود سجادی^۱، بهرام فلاحتکار^{۱*}، رقیه صفری^۲

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

۲- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۲۵

چکیده

مطالعه حاضر به منظور تعیین اثرات ویتامین C بر شاخص‌های بیوشیمیایی، فعالیت آنزیم‌های پلاسمایی کبد و ایمنی ناشی از استرس دستکاری در مولدین ماهی طلایی (*Carassius auratus*) انجام شد. تعداد ۱۲۰ عدد مولد ماده با میانگین وزنی $90/00 \pm 1/29$ g در چهار تیمار (با سه تکرار) توزیع شده و مدت زمان دوره تغذیه‌ای نیز ۸ هفته در نظر گرفته شد. تیمارها شامل ماهیان بدون استرس دستکاری و تغذیه شده با جیره بدون ویتامین C ($S^{-}C^{-}$)، ماهیان بدون استرس دستکاری و تغذیه شده با جیره حاوی ویتامین C ($S^{-}C^{+}$)، ماهیان تحت استرس تغذیه شده با جیره بدون ویتامین C (صفر میلی گرم بر کیلوگرم) ($S^{+}C^{-}$) و ماهیان تحت استرس تغذیه شده با جیره حاوی ویتامین C (۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) ($S^{+}C^{+}$) بودند. مولدین در تیمارهای تحت استرس، روزانه ۱ دقیقه به وسیله ساچوک تعقیب و صید شده و ۱ دقیقه نیز در معرض هوا قرار گرفتند. در انتهای دوره، شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی‌شناسی خون ماهیان سنجیده شد. تفاوت معنی‌داری در اثر متقابل ویتامین C و استرس بر شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی در تیمارهای مختلف مشاهده شد ($p < 0/05$)؛ به طوری که، استرس موجب افزایش معنی‌دار برخی شاخص‌های بیوشیمیایی همانند کلسترول، تری گلیسرید، کورتیزول، گلوکز و سطح آنزیم‌های پلاسمایی کبد در تیمار $S^{+}C^{-}$ شد ($p < 0/05$). ویتامین C با کاهش معنی‌دار شاخص‌های بیوشیمیایی در تیمار $S^{-}C^{+}$ همراه بود ($p < 0/05$). استرس باعث کاهش معنی‌دار شاخص‌های ایمنی در تیمار $S^{+}C^{-}$ شد ($p < 0/05$). ویتامین C، از طرف دیگر، افزایش پارامترهای ایمنی در تیمار $S^{-}C^{+}$ را به دنبال داشته ($p < 0/05$) و در تیمار $S^{+}C^{+}$ موجب بهبود پارامترهای ایمنی در شرایط استرس گردید ($p < 0/05$). به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ویتامین C جیره می‌تواند به عنوان یک محرک قوی برای بهبود سیستم ایمنی و کاهش اثر شاخص‌های استرسی در مولدین ماهی طلایی عمل کند.

کلمات کلیدی: تغذیه، تنش، مولد، آسکوربیک اسید، گلدفیش

* عهده‌دار مکاتبات: falahatkar@guilan.ac.ir

مقدمه

دستکاری موجودات آبی به عنوان یک عامل استرسزا مطرح بوده که با تغییر در واکنش‌های رفتاری و ویژگی‌های فیزیولوژیک آنها همراه است (Schreck and Tort, 2016). استرس را می‌توان منشأ اصلی بروز مشکلاتی نظیر کاهش رشد، بیماری‌ها و تلفات در روند تکثیر و پرورش مطرح کرد (Fast et al., 2008). قرارگرفتن ماهی در شرایط استرس اثر معکوسی بر وضعیت کلی سلامت و بهداشت ماهی دارد که با افزایش حساسیت به عوامل بیماری‌زا همراه است. ارزیابی پارامترهای خون در ماهیان شاخص مناسبی برای بررسی تغییرات فیزیولوژیک و پاتولوژیک می‌باشد چرا که اطلاعات اساسی از وضعیت استرس، ناهنجاری‌های متابولیک، ناکارایی تولید مثل، و بیماری‌ها فراهم می‌کند (Buscaino et al., 2010). پاسخ بدن به وقوع استرس، افزایش سطوح در گردش هورمون کورتیزول می‌باشد که به عنوان شاخص اصلی در سنجش شدت بروز استرس در آبزیان نیز شناخته شده است (Barton, 2002). این پاسخ اولیه، نوعی واکنش تطابقی است که با حفظ هومئوستازی و فراهم‌آوری انرژی، ماهی را برای تقابل با عامل استرس‌زا مهیا می‌کند (Fast et al., 2008). با این حال، ترشح کورتیزول با سرکوب سیستم ایمنی همراه است. در واقع، افزایش حاد و مزمن سطوح کورتیزول به دنبال مواجهه با عوامل استرس‌زا می‌تواند منجر به کاهش عملکرد فاکتورهای خونی دخیل در واکنش‌های التهابی و ایمنی شود (Guo and Dixon, 2021).

طی دوره تکامل گناداها و تکثیر، به خصوص در شرایط اسارت، ماهیان مولد همواره دستخوش طیف وسیعی از عوامل استرس‌زا هستند (Falahatkar et al.,

2020). مواردی همچون صید و جابه‌جایی، بیهوشی، جراحی، تزریق هورمون‌های تولید مثلی، و تکثیر مصنوعی همگی استرس‌زا محسوب می‌شوند که بر نتایج تولید مثلی، عملکردهای ایمنی و میزان بازماندگی مولدین و لاروها مؤثر هستند (Schreck and Tort, 2016). به عنوان مثال، نشان داده شده است که فعالیت‌های جابه‌جایی در مولدین کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بر میزان کورتیزول، هورمون‌های استروئیدی و پارامترهای خونی (مقادیر اریتروسیت‌ها و هموگلوبین) اثرات منفی داشته است (Ehsani Kenari et al., 2015). استرس دستکاری مولدین ماهی سوف سفید (*Sander lucioperca*) طی دوره زرده‌سازی منجر به تاخیر یا عدم تخم‌ریزی شده است (Pourhosein Sarameh et al., 2012). همچنین، کاهش عملکرد تولید مثلی و افزایش سطوح کورتیزول در جنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*) به دنبال القای استرس دستکاری گزارش شده است (Abdollahpour et al., 2020). از این رو، اقدامات لازم در خصوص فراهم‌آوری شرایطی برای ثبات فیزیولوژیک مولدین، حتی در دستکاری‌های جزئی، ضروری به نظر می‌رسد. ذکر شده است که استفاده از محرک‌های ایمنی در جیره غذایی ماهیان موجب افزایش تولید فاکتورهای دخیل در ایمنی و آنتی‌اکسیدانی می‌شود. محرک‌های ایمنی قادرند مقاومت تقریباً بلندمدتی را در ماهیان ایجاد کرده و موجب فعال شدن ماکروفاژها و تولید ایمونوگلوبولین‌ها، اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها و پروتئین‌های کمپلمان شوند (Herrera et al., 2019). بنابراین، نقش محرک‌های ایمنی در مدیریت پیشگیری از بیماری‌های آبزیان و بالا بردن مقاومت آن‌ها در برابر تنش‌های مختلف انکارناپذیر است.

انگشت‌قد (Falcon *et al.*, 2007)، مواجهه با غلظت زیاد آمونیاک در گربه ماهی پوزه‌دراز (*Leiocassis longirostris*) (Liu *et al.*, 2008)، و استرس تراکم و صید در شانک (*Sparus aurata*) (Dawood and Koshio, 2018) بوده است. بنابراین، با توجه به وقوع همیشگی انواع مختلف عوامل استرس‌زا، وجود مقادیر کافی از ویتامین C در جیره غذایی آبزیان برای جلوگیری از عقب‌افتادگی رشد، کاهش زنده‌مانی، کاهش راندمان تولیدمثل و افزایش حساسیت به عفونت‌ها و بیماری‌ها ضروری خواهد بود. به هر حال و با وجود تحقیقات وسیع، همچنان اثرات مفید ویتامین C بر مقاومت به عوامل استرس‌زا به وضوح مشخص نشده است (Herrera *et al.*, 2019)، اگرچه که هیچ مطالعه‌ای نیز نتایج منفی از این ماده مکمل گزارش نکرده است.

ماهی طلایی (*Carassius auratus*) از خانواده کپور ماهیان بوده و از پرطرفدارترین و جالب‌ترین گونه‌ها در بین علاقه‌مندان به ماهیان آکواریومی محسوب می‌شود که از ارزش بالایی به لحاظ اقتصادی برخوردار است (Blanco and Unniappan, 2022). با داشتن سابقه طولانی نگهداری و تعداد قابل توجه فنوتیپ‌های توسعه یافته، این گونه به عنوان معروف‌ترین ماهی آکواریومی در تمامی کشورها در آکواریوم‌های خانگی و تجاری نگهداری می‌شود (Komiyama *et al.*, 2009). ماهی طلایی همچنین به صورت قابل ملاحظه‌ای در مطالعات فیزیولوژیک، سیستم‌های درون‌ریز و عصبی، تکاملی، و بیماری‌شناسی به عنوان مدل زیستی شناخته شده است (Ota, 2021). این ماهی در مطالعات مرتبط با آبی‌پروری نیز جایگاه ویژه‌ای دارد که نتایج مطالعات آن را می‌توان به طیف

ویتامین‌ها از جمله ترکیبات آلی هستند که می‌توانند از دیگر ترکیبات ضروری سنتز شوند؛ با این حال، به مقدار بسیار ناچیزی از یک منبع خارجی برای روند طبیعی رشد، تولیدمثل، و سلامتی به آنها نیاز است (Shahkar *et al.*, 2015). ویتامین C از ریزمغذی‌های ضروری بوده که در رشد و عملکرد فیزیولوژیک طبیعی بسیاری از جانوران آبی نقش حیاتی دارد (Dawood and Koshio, 2018). در واقع، اغلب آبزیان فاقد آنزیم ال-گلونولاکتون اکسیداز، بعنوان سنتزکننده ویتامین C می‌باشند (Fracalossi *et al.*, 2001) و بنابراین همواره به منبع خارجی از این ویتامین نیاز دارند. به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، ویتامین C قادر به حذف گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر می‌باشد؛ در سنتز هورمون‌های استروئیدی و کلاژن‌ها شرکت داشته و مقاومت آبزیان را در برابر عوامل استرس‌زا افزایش می‌دهد. همچنین، این ریزمغذی در بهبود پاسخ‌های ایمنی و کاهش تخریب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو به بافت‌ها بسیار مؤثر است (Dawood and Koshio, 2018). گزارش شده است که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و لایوزیم در ماهی کاراس (*Carassius auratus gibelio*) تغذیه شده با جیره حاوی ویتامین C افزایش داشته است (Shao *et al.*, 2018). تغذیه با جیره‌های حاوی ویتامین C منجر به کاهش شدت واکنش به شرایط استرس‌زا در گونه‌های مختلف شده است که شامل تراکم بالا در ماهی تیلپیانل (*Oreochromis niloticus*) (Mustafa *et al.*, 2013)، استرس شوری در لارو توربوت (*Scophthalmus maximus*) (Merchie *et al.*, 1996) و کپور معمولی جوان (Imanpoor *et al.*, 2017)، شوک سرما در تیلپیانل

۴۰×۶۰×۱۱۴ سانتی متر با حجم آبیگری ۲۰۰ لیتر تقسیم شدند، که در هر تیمار تعداد ۳۰ مولد قرار داده شد.

آماده سازی جیره و طراحی آزمایش

اقلام تغذیه ای برای ساخت جیره های غذایی در این آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است. این اقلام از جزء به کل و بر اساس نیاز فرموله و مخلوط شدند. مخلوط تهیه شده در دستگاه خمیرگیر (گیلارپخت، رشت، ایران) ریخته شده و برای تشکیل خمیر، طی همزدن حدود ۲۵ درصد آب به آنها اضافه شد. سپس خمیر به دست آمده با دستگاه چرخ گوشت صنعتی (الکتروکار، تهران، ایران) به صورت رشته های پلت به قطر ۳ mm آماده و در دمای اتاق خشک شدند. سپس، رشته های خشک شده به اندازه دهان ماهی خرد و در فریزر (C° ۱۸-) تا پایان دوره نگهداری شدند. تیمارهای آزمایشی به صورت زیر طراحی شدند:

وسیع از ماهیان تعمیم داد (Blanco and Unniappan, 2022). بنابراین، در مطالعه حاضر، اثرات ویتامین C مکمل شده در غذا به دنبال استرس های وارده به مولدین ماهی طلایی بر واکنش های خون شناسی، دفاع آنتی اکسیدانی و شاخص های ایمنی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

محل انجام آزمایش و تهیه ماهی

این پژوهش در مزرعه سبز سفیدرود در شهرستان آستانه اشرفیه (گیلان، ایران) انجام شد. بدین منظور، تعداد ۱۲۰ عدد مولد ماده ماهی طلایی دو ساله و بالغ، با میانگین وزنی $1/29 \pm 90/00$ گرم از یک مزرعه تکثیر و پرورش ماهی طلایی در شهر سنگر (گیلان، ایران) تهیه و به محل مزرعه منتقل شدند. بعد از دو هفته سازگاری، ماهیان در چهار تیمار و سه تکرار در مخازنی با ابعاد

گروه اول: ماهیان بدون استرس دستکاری و تغذیه شده با جیره بدون ویتامین C (S^-C^-)

گروه دوم: ماهیان بدون استرس دستکاری و تغذیه شده با غذای جیره ویتامین C (1000 mg/kg) (S^-C^+)

گروه سوم: ماهیان تحت استرس دستکاری و تغذیه شده با جیره بدون ویتامین C (S^+C^-)

گروه چهارم: ماهیان تحت استرس دستکاری و تغذیه شده با جیره حاوی ویتامین C (1000 mg/kg) (S^+C^+)

جدول ۱: مقدار اقلام غذایی و آنالیز تقریبی جیره‌های آزمایشی مولدین ماهی طلایی (*Carassius auratus*)

Table 1: The amount of food ingredients and proximate composition of experimental diets for goldfish broodstock (*Carassius auratus*)

Ingredients (g/kg)	Diet without vitamin C	Diet containing vitamin C
Fish meal ¹	50	50
Corn gluten ¹	50	50
Meat poeder ¹	200	200
Soybean meal ²	350	350
Binder ³	40	40
Wheat flour ³	150	150
Oat flour ³	50	50
Corn flour ³	50	50
Mineral complex ⁴	10	10
Vitamin complex without vitamin C ⁴	10	10
Vitamin C ⁴	0	1
Dicalcium phosphate ⁴	20	20
Fish oil ¹	10	10
Soybean oil ¹	10	10
Proximate composition of the diet (percentage)		
Crude protein	41.65	41.65
Crude fat	5.64	5.64
Ash	8.16	8.16
Moisture	7.10	7.10
Vitamin C (mg/kg)	5.6	970

۱- کارخانه تولید خوراک آبی پرور دشت قزوین، قزوین، ایران.

۲- شرکت سویا بهسوی، تهران، ایران.

۳- شرکت اطهر غلات ایرانیان، تبریز، ایران.

۴- شرکت جهان‌بین مکمل، شهرکرد، ایران. (هر کیلوگرم از مکمل معدنی حاوی: ۲۶ گرم آهن، ۱۲/۵ گرم روی، ۲ گرم سلیوم، ۴۸۰ میلی گرم کبالت، ۴/۲ گرم مس، ۱ گرم D3، ویتامین IU، ۴۰۰۰۰۰ A ویتامین IU گرم ۱۲، گرم کولین کلراید و ماده حامل تا یک کیلوگرم). (هر کیلوگرم از مکمل ویتامینه حاوی: ۱۶۰۰۰۰۰ E، ۲ ویتامین B9، ۲ گرم ویتامین B6، ۴ گرم ویتامین B5، ۴۰ گرم ویتامین B3، ۱۲ گرم ویتامین B2، ۸ گرم ویتامین B1، ۶ گرم ویتامین K3، ۲ ویتامین E، ۲ ویتامین B12، ۰/۲۴ گرم ویتامین H2، ۲ گرم B.H.T. و ماده حامل تا یک کیلوگرم).

1-Aquaculture Feed Production Factory of Qazvin, Qazvin, Iran.

2-Behsoy Soybean Company, Tehran, Iran.

3-Iranian Athar Cereals, Tabriz, Iran.

4-Jahanbin Supplement Company, Shahrekord, Iran (each kilogram of mineral supplement contains: 26 g iron, 12.5 g zinc, 2 g selenium, 480 mg cobalt, 2.4 g copper, 1 g iodine, 12 g choline chloride and up to one kilogram of carrier material. Each kilogram of vitamin supplement contains: 1,600,000 IU vitamin A, 400,000 IU vitamin D3, 4 g vitamin E, 2 g vitamin K3, 6 g vitamin B1, 8 g vitamin B2, 12 g vitamin B3, 40 g vitamin B5, 4 g vitamin B6, 2 g vitamin B9, 8 g vitamin B12, 0.24 g vitamin H2, 2 g B.H.T and carrier material up to one kilogram.

آنالیز تقریبی جیره‌های آزمایشی

جهت اندازه‌گیری پروتئین موجود در جیره مورد آزمایش، از روش کلدال استفاده شد. میزان پروتئین خام به طور غیرمستقیم به وسیله آنالیز نیتروژن کل و ضرب محتوای نیتروژن نمونه در ضریب ۶/۲۵ و به روش کلدال و با دستگاه کلدال اتوماتیک (DK 20, Velp, Italy) اندازه‌گیری و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

وزن نمونه (گرم) / نرمالیت اسید × میزان اسید مصرفی برای تیتراسیون × ۰/۰۱۴ × ۱۰۰ = درصد ازت (نیتروژن)

درصد ازت × ۶/۲۵ = درصد پروتئین

برای اندازه‌گیری چربی از روش سوکسله با استفاده از حلال دی اتیل اتر و به مدت ۸ ساعت صورت گرفت. جهت تعیین میزان خاکستر، روش کار بر مبنای از بین بردن مواد آلی و باقیمانده مواد معدنی در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۹ ساعت انجام شد. تعیین درصد رطوبت، بر اساس خشک نمودن ماده غذایی در اثر حرارت ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آون و به مدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت تعیین گردید (AOAC, 2012).

تغذیه و پرورش ماهی

برای انجام این آزمایش مولدین دو وعده در روز به مدت ۸ هفته و در حد سیری در ساعات ۸:۰۰ و ۱۶:۰۰ تغذیه شدند. روزانه همه مخازن سیفون شدند و به میزان ده درصد از آب هر مخزن تعویض شد. تمامی مخازن دارای سیستم آب در گردش با دبی ۲۰ ± ۰/۲ ml/s بودند تا شرایط فیزیکی و شیمیایی آب در تمامی مخازن یکسان باشد و استرس به ماهیان وارد نشود. مولدین تیمارهای تحت استرس، روزانه و در یک ساعت مشخص

(یک ساعت بعد از آخرین وعده غذایی (ساعت ۱۷:۰۰)) به مدت ۱ دقیقه به وسیله ساچوک تعقیب و صید شده و به مدت ۱ دقیقه در معرض هوا قرار گرفتند (Atef and Falahatkar, 2014).

در طول دوره آزمایش، اکسیژن محلول ۰/۵ mg/L ± ۸/۵ pH ۷-۸، میانگین دمای آب ۲۰ ± ۲ °C، سختی کل ۱۰ ± ۲۵۰ mg/L به ترتیب به وسیله دستگاه مالتی پارامتر مدل WTW540I (WTW, Weilheim, Germany)، کیت سنجش pH (تروپیکال، لهستان)، دماسنج جیوه‌ای و کیت سنجش سختی (واهب، تهران، ایران) اندازه‌گیری شد. ماهیان در یک سالن سرپوشیده و با شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داشتند.

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی

بعد از ۸ هفته دوره پرورش و گذشت ۲۴ ساعت از زمان قطع غذا، تعداد ۳ ماهی به طور تصادفی از هر مخزن صید شده و در عصاره گل میخک با غلظت ۱۵۰ mg/L بیهوش شدند. عملیات خون‌گیری با استفاده از سرنگ ۲ mL هپارینه از سیاهرگ مولدین صورت گرفت. به این منظور از هر ماهی حدود ۱ mL خون گرفته شد. سپس، نمونه‌های خون با دور ۱۵۰۰ g و به مدت ۱۰ دقیقه به وسیله دستگاه سانتریفیوژ (Combi, Hamburg, Germany) برای حصول پلاسما سانتریفیوژ شدند (Spanò et al., 2004). پلاسمای جدا شده تا زمان اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی در ۱۸ °C - نگهداری شد.

پروتئین کل پلاسما بر مبنای روش بیوره با استفاده از کیت اختصاصی شرکت پارس آزمون (کرج، ایران)

ELISA و با Inter assays ۶/۴ درصد و Intra assays ۷/۰ درصد اندازه‌گیری گردید (Martins, et al., 2025).

اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی

فعالیت لایزوزیم (W/V) پلاسما بر اساس روش کدورت‌سنجی توصیف شده توسط Ellis (۱۹۹۰) با استفاده از باکتری *Micrococcus luteus* به عنوان هدف در بافر سدیم فسفات (pH ۶/۲) سنجش شد. میزان ایمونوگلوبولین کل پلاسما (mg/dL) بر اساس روش کدورت‌سنجی، و غلظت اجزای کمپلمان (C3 و C4) از روش ایمونوتوربیدیمتری و با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) انجام شدند. میلوپراکسیداز با استفاده از روش فتومتریک و با به کارگیری کیت تجاری میلوپراکسیداز شرکت نوند سلامت (تهران، ایران) و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۵۰ nm سنجش شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

مطالعه حاضر به صورت یک آزمایش دو عاملی و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ابتدا نرمال‌بودن داده‌ها و همچنین همگنی واریانس‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون‌های کولموگروف-اسمیرنوف و لون بررسی شد. بررسی آماری داده‌ها به کمک آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین دانکن در محیط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ (IBM SPSS Statistics, Version 20.0; IBM Corp, NY, USA) انجام شد. آنالیزها در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد و داده‌های ارائه شده به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند.

اندازه‌گیری شد. برای انجام این کار، ۲۰ میکرولیتر از نمونه به همراه ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول معرف (بعد از مخلوط نمودن محلول‌های معرف به نسبت ۴ به علاوه ۱) درون کووت حل شده و بعد از ۵ دقیقه، اندازه‌گیری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico, New Jersey, USA) در طول موج ۵۴۶ nm و در دمای ۳۷ °C انجام شد (Bradford, 1976).

اندازه‌گیری گلوکز، کلسترول، و تری‌گلیسرید در نمونه‌های پلاسما با استفاده از روش فتومتریک و با به کارگیری کیت‌های تجاری (شرکت پارس آزمون، کرج، ایران) انجام شد. در ابتدا به میزان ۱ mL از کیت گلوکز را درون کووت‌ها ریخته و بلافاصله به مقدار ۱۰ μ L از نمونه با کیت گلوکز به خوبی ترکیب شد. بعد از مدت ۲۰ دقیقه رنگ ترکیب موجود در کووت‌ها تغییر کرد. در ابتدا کووت حاوی آب مقطر و کیت گلوکز درون دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و در ادامه آن کووت‌های حاوی نمونه پلاسما و کیت گلوکز قرار گرفت. با قرارگیری کووت‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر و طول موج ۵۴۶ nm، مقدار شاخص‌های پلاسما اندازه‌گیری شد (Burtis et al., 2012).

همچنین سنجش فعالیت آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) و براساس دستورالعمل کیت‌ها انجام شد (Abdollahpour et al., 2020).

برای اندازه‌گیری فعالیت کورتیزول از کیت کورتیزول مونوباند (Acubind, Monoband, Lake Forest, USA) استفاده گردید. نمونه‌ها براساس دستورالعمل کیت آماده شده و غلظت کورتیزول با روش

نتایج

شاخص‌های بیوشیمیایی

تأثیر ویتامین C جیره بر پارامترهای بیوشیمیایی در ماهی مولد ماهی طلایی تحت استرس و بدون استرس پس از هشت هفته آزمایش در جدول ۲ ارائه شده است. اختلاف معنی‌داری در اثر متقابل استرس و ویتامین C در پارامترهای بیوشیمیایی وجود داشت ($p < 0.05$). استرس اثر معنی‌داری بر میزان کلسترول و تری‌گلیسرید داشت ($p < 0.05$) و میزان کلسترول و تری‌گلیسرید در ماهیان تحت استرس در مقایسه با تیمار S^-C^- افزایش یافت. همچنین ویتامین C باعث کاهش معنی‌دار میزان کلسترول و تری‌گلیسرید در تیمار S^-C^+ شد. نتایج نشان داد ارتباط معنی‌داری در اثر متقابل ویتامین C و استرس در میزان پروتئین کل وجود داشت ($p < 0.05$)، به طوری که در گروه S^+C^+ کاهش پروتئین کل مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با گروه S^-C^- نداشت ($p < 0.05$). بالاترین میزان پروتئین کل در تیمار S^-C^+ مشاهده شد که دارای

اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها بود ($p < 0.05$). بر اساس نتایج، ارتباط معنی‌داری در اثر متقابل ویتامین C و استرس بر میزان کورتیزول و گلوکز وجود داشت ($p < 0.05$). علاوه بر این، استرس باعث افزایش معنی‌دار میزان کورتیزول و گلوکز شد ($p < 0.05$) و بالاترین میزان کورتیزول و گلوکز در تیمار S^+C^- مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها بود. همچنین ویتامین C باعث کاهش معنی‌دار میزان کورتیزول و گلوکز در تیمار S^-C^+ در مقایسه با دیگر تیمارها شد. نتایج نشان داد اختلاف معنی‌داری در اثر متقابل ویتامین C و استرس بر میزان آنزیم‌های پلاسمایی کبد وجود داشت ($p < 0.05$). استرس به تنهایی اثر معنی‌داری بر میزان آنزیم‌های پلاسمایی کبد داشت ($p < 0.05$) و بیشترین میزان آنزیم‌های پلاسمایی کبد در تیمارهای تحت استرس مشاهده شد. از سوی دیگر، ویتامین C باعث کاهش معنی‌داری میزان برخی آنزیم‌های پلاسمایی کبد شد ($p < 0.05$).

جدول ۲: تأثیر ویتامین C جیره بر شاخص بیوشیمیایی در ماهی مولد ماهی طلایی (*Carassius auratus*) تحت استرس و بدون استرس پس از هشت هفته آزمایش (میانگین $\pm$ انحراف معیار، n=۳)

Table 2: Effect of dietary vitamin C on biochemical indices in goldfish (*Carassius auratus*) broodstock under stress and without stress after eight weeks of experiment (mean $\pm$ standard deviation, n=3)

Parameters	Treatments				Two-way ANOVA		
	(S ⁻ C ⁺)	(S ⁺ C ⁺)	(S ⁻ C ⁻)	(S ⁺ C ⁻)	vitamin C	stress	stress+ vitamin C
Cholesterol (mg/dL)	186.12 $\pm$ 33.05 ^b	249.9 $\pm$ 33.71 ^a	203.7 $\pm$ 00.54 ^b	246.7 $\pm$ 66.50 ^a	0.233	0.113	0.000
Triglyceride (mg/dL)	216.10 $\pm$ 33.05 ^c	238.6 $\pm$ 66.65 ^{bc}	231.5 $\pm$ 00.56 ^b	282.9 $\pm$ 33.07 ^a	0.000	0.014	0.001
Total Protein (g/dL)	4.0 $\pm$ 14.39 ^a	3.0 $\pm$ 33.02 ^b	3.0 $\pm$ 57.06 ^b	3.0 $\pm$ 33.90 ^b	0.042	0.042	0.002
Glucose (mg/dL)	52.4 $\pm$ 96.26 ^c	49.2 $\pm$ 06.61 ^c	61.2 $\pm$ 43.00 ^b	73.3 $\pm$ 00.05 ^a	0.064	0.003	0.000
Cortisol (ng/mL)	31.1 $\pm$ 33.38 ^d	50.3 $\pm$ 53.15 ^b	43.1 $\pm$ 50.76 ^c	56.3 $\pm$ 90.06 ^a	0.076	0.000	0.000
ALP (IU/L)	115.7 $\pm$ 00.00 ^d	165.7 $\pm$ 00.54 ^b	137.7 $\pm$ 33.09 ^c	194.9 $\pm$ 00.64 ^a	0.000	0.485	0.000
AST (IU/L)	214.19 $\pm$ 33.00 ^b	336.14 $\pm$ 33.01 ^a	236.14 $\pm$ 33.04 ^b	343.53 $\pm$ 66.81 ^a	0.420	0.682	0.000
ALT (IU/L)	17.1 $\pm$ 36.90 ^c	32.2 $\pm$ 60.62 ^a	23.3 $\pm$ 93.12 ^b	30.3 $\pm$ 16.91 ^a	0.264	0.031	0.000

حروف لاتین غیرهمسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).

S⁻C⁺: ویتامین C + بدون استرس، S⁺C⁺: ویتامین C + بدون ویتامین C + استرس، S⁻C⁻: بدون ویتامین C + بدون استرس، S⁺C⁻: بدون ویتامین C + استرس. ALP: آلکالین فسفاتاز، AST: آسپارتات آمینوترانسفراز، ALT: آلانین آمینوترانسفراز.

Non-similar letters in each row indicate significant differences ($p < 0.05$).

S⁻C⁺: Vitamin C + without stress, S⁺C⁺: Vitamin C + stress, S⁻C⁻: Without Vitamin C + without stress, S⁺C⁻: Without Vitamin C + stress. ALP: Alkaline phosphatase, AST: Aspartate aminotransferase, ALT: Alanine aminotransferase.

شاخص‌های ایمنی

تأثیر ویتامین C جیره بر شاخص ایمنی در ماهی مولد ماهی طلایی تحت استرس و بدون استرس در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد ارتباط معنی‌داری در اثر متقابل ویتامین C و استرس در میزان فعالیت لایزوزیم وجود داشت ($p < 0.05$). علاوه بر این، استرس به تنهایی باعث کاهش معنی‌دار میزان فعالیت لایزوزیم در تیمارهای تحت استرس شد و همچنین ویتامین C باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت لایزوزیم در تیمار S^+C^+ شد. طبق نتایج بدست آمده، اختلاف معنی‌داری در اثر متقابل ویتامین C و استرس در میزان میلوپراکسیداز وجود داشت ($p < 0.05$). و استرس منجر به اختلاف معنی‌داری در میزان میلوپراکسیداز شد ($p < 0.05$)، به طوری که، بیشترین میزان میلوپراکسیداز

در تیمار S^+C^+ (10.96 ± 224.66 ng/mL) و کمترین میزان در تیمار S^+C^- (6.55 ± 133.00 ng/mL) مشاهده شد. نتایج نشان داد که به طور مشابه ارتباط معنی‌داری در اثر متقابل ویتامین C و استرس در میزان ایمونوگلوبولین کل و میزان فعالیت کمپلمان‌های C3 و C4 وجود داشت ($p < 0.05$). استرس باعث کاهش معنی‌دار میزان این کمپلمان‌ها شد و کمترین میزان ایمونوگلوبولین کل و کمپلمان‌های C3 و C4 در تیمار S^+C^- مشاهده شد ($p < 0.05$). همچنین ویتامین C در تیمار S^+C^+ باعث افزایش معنی‌دار ایمونوگلوبولین کل و کمپلمان‌های C3 و C4 شد ($p < 0.05$). از سوی دیگر در تیمار S^+C^+ ویتامین C منجر به تعدیل شدن میزان ایمونوگلوبولین کل و کمپلمان‌های C3 و C4 شد.

جدول ۳: تأثیر ویتامین C جیره بر شاخص‌های ایمنی در مولد ماهی طلایی (*Carassius auratus*) تحت استرس و بدون استرس پس از هشت هفته آزمایش (میانگین $\pm$ انحراف معیار، $n=3$)

Table 3: Effect of dietary vitamin C on immune indices in goldfish (*Carassius auratus*) broodstock under stress and without stress after eight weeks of experiment (mean $\pm$ standard deviation, $n=3$)

Parameters	Treatments				Two-way ANOVA		
	(S^+C^+)	(S^+C^+)	(S^-C^-)	(S^+C^-)	ویتامین C	stress	stress+ vitamin C
Lysozyme (IU/mL)	33.43 $\pm$ 3.51 ^a	23.20 $\pm$ 2.19 ^b	28.53 $\pm$ 2.70 ^a	22.26 $\pm$ 2.21 ^b	0.241	0.099	0.000
Myeloperoxidase (ng/mL)	224.66 $\pm$ 10.96 ^a	163.66 $\pm$ 4.16 ^c	189.33 $\pm$ 2.51 ^b	133.00 $\pm$ 6.55 ^d	0.747	0.001	0.000
Total immunoglobulin (mg/mL)	24.33 $\pm$ 0.92 ^a	19.86 $\pm$ 0.73 ^b	22.43 $\pm$ 1.59 ^a	18.30 $\pm$ 0.45 ^b	0.784	0.019	0.000
Complement C3 (g/dL)	45.53 $\pm$ 0.76 ^a	38.23 $\pm$ 2.84 ^b	44.73 $\pm$ 1.36 ^a	36.46 $\pm$ 5.10 ^b	0.789	0.483	0.002
Complement C4 (g/dL)	13.76 $\pm$ 0.90 ^a	9.50 $\pm$ 1.20 ^b	12.36 $\pm$ 1.33 ^a	9.20 $\pm$ 2.02 ^b	0.523	0.332	0.002

حروف لاتین غیرهمسان در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).

S^+C^+ : ویتامین C + بدون استرس، S^+C^- : ویتامین C + استرس، S^-C^- : بدون ویتامین C + بدون استرس، S^-C^+ : بدون ویتامین C + استرس.

Non-similar letters in each row indicate significant differences ($p < 0.05$).

S^+C^+ : Vitamin C + without stress, S^+C^- : Vitamin C + stress, S^-C^- : Without Vitamin C + without stress, S^-C^+ : Without Vitamin C + stress. ALP: Alkaline phosphatase, AST: Aspartate aminotransferase, ALT: Alanine aminotransferase

بحث

شاخص‌های بیوشیمیایی

به کارگیری استراتژی‌های تغذیه‌ای کارآمد یک راه حل مؤثر برای افزایش توان فیزیولوژیک گونه‌های آبزی در مقابل اثرات نامطلوب استرس‌های محیطی است (Yousefi *et al.*, 2023). در مطالعه حاضر، شاخص‌های وضعیت سلامت ماهی از قبیل پارامترهای بیوشیمیایی خون، فعالیت آنزیم‌های پلاسمایی کبدی و فاکتورهای ایمنی به منظور تعیین تاثیر استرس و اثرات محافظتی ویتامین C در مولدین ماده ماهی طلایی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج حاکی از افزایش سطح تری‌گلیسرید و کلسترول بعد از قرارگیری ماهیان در معرض استرس بود. اختلال در بیوسنتز و متابولیسم چربی‌ها و لیپوپروتئین‌ها در کبد ماهی در شرایط استرس ممکن است مسئول افزایش سطح کلسترول و تری‌گلیسرید باشد (Yang *et al.*, 2013). آسیب به غشای سلولی، القاء یا مهار آنزیم‌های دخیل در متابولیسم چربی، و تغییرات در سطوح هورمونی که بر متابولیسم چربی تأثیر می‌گذارد، ممکن است سطح در گردش تری‌گلیسرید و کلسترول را در ماهی‌های قرارگرفته در معرض استرس نیز تغییر دهد (Xie *et al.*, 2020). علاوه بر این، افزایش قابل توجه سطح تری‌گلیسرید و کلسترول در پلاسمای ماهی می‌تواند یک پاسخ فیزیولوژیک برای تأمین انرژی کافی برای به حداقل رساندن اثرات زیان‌بار استرس باشد (Deng *et al.*, 2017). براساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، ویتامین C منجر به کاهش قابل توجه میزان کلسترول و تری‌گلیسرید در تیمار $S^{-}C^{+}$ شد و همچنین ویتامین C

سطح تری‌گلیسرید را در نمونه‌های قرارگرفته در شرایط استرس (تیمار $S^{+}C^{+}$) کاهش داد. کاهش سطح کلسترول و تری‌گلیسرید در ماهیان مکمل شده با ویتامین C احتمالاً به دلیل قابلیت بالای این ویتامین به عنوان یک عامل ضد استرس و عدم نیاز به متابولیسم چربی برای مبارزه با استرس بوده است (Banaee *et al.*, 2019). بنابراین، می‌توان ذکر نمود که ویتامین C با کنترل متابولیسم چربی‌ها از افزایش تخریبی سطوح تری‌گلیسرید و کلسترول در مواجهه مولدین ماده ماهی طلایی با استرس دستکاری جلوگیری کرده‌است. تجویز ویتامین C به عنوان یک عامل ضد استرس در جیره ماهیان تحت استرس از آسیب وارد شده به کبد جلوگیری کرده و سطح کلسترول و تری‌گلیسرید را در خون در حد نرمال حفظ می‌کند. این موضوع توسط Sharifinasab و همکاران (۲۰۱۶) در ماهی کپور معمولی قرار گرفته در معرض استرس اکسیداتیو با سم پاراکوات و تغذیه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با ویتامین C (Javanmardi *et al.*, 2018) نیز تایید شد.

پروتئین کل یکی از شاخص‌های با ارزش خون است که سطح آن منعکس کننده وضعیت سلامت جانوران آبزی است (Rahimi *et al.*, 2022). افزایش سطح پروتئین کل می‌تواند پاسخ‌های ایمنی میزبان را تقویت کند (Wiegertjes *et al.*, 1996). در مطالعه حاضر، بیشترین سطح پروتئین کل در ماهیان مولد تغذیه شده با ویتامین C و پرورش یافته در شرایط نرمال ثبت شد. این افزایش در سطح پروتئین کل ممکن است به دلیل نقش ویتامین C به عنوان یک کوفاکتور در بیوسنتز پروتئین و سایر فرآیندهای فیزیولوژیک باشد

(Abd El-Gawad *et al.*, 2014). از سوی دیگر، کاهش پروتئین کل در شرایط استرس ممکن است مرتبط با تجزیه آنها برای تامین انرژی باشد (Svobodova *et al.*, 2003). از این رو، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گنجاندن ویتامین C در جیره غذایی مولدین ماده ماهی طلایی قادر است مانع از کاهش سطح پروتئین کل پلاسما به دنبال وقوع استرس‌های اجتناب‌ناپذیر در دوره پرورش گردد.

در مطالعه حاضر، القاء استرس سطح آنزیم‌های پلاسمایی کبد در مولدین ماده ماهی طلایی را به طور قابل توجهی افزایش داد. این افزایش در سطح آنزیم‌های کبد را می‌توان به تغییرات متنوع در بافت کبد مرتبط دانست. بر این اساس ذکر شده است که فعالیت بیشتر آنزیم‌های دخیل در واکنش‌های اکسیداتیو ناشی از استرس‌های محیطی ممکن است به دلیل یک سازگاری متابولیک جهت تامین انرژی مورد نیاز سلول‌ها برای برقراری هوموستازی باشد (Mehrpack *et al.*, 2015). موافق با مطالعه حاضر، فعالیت لایزوزیم پلاسما بعد از مواجهه مولد ماهی طلایی با استرس به شدت افزایش یافت (Ranaye *et al.*, 2011). از سوی دیگر، در این مطالعه، گنجاندن ویتامین C در جیره، سطح همه آنزیم‌های کبدی در ماهیان مولد طلایی پرورش یافته در شرایط نرمال (بدون استرس) و سطح آنزیم ALP در ماهیان تحت استرس را کاهش داد. مطالعات مختلفی نقش ویتامین C را در تنظیم آنزیم‌های کبدی گزارش کرده‌اند که حاکی از اثرات محافظتی این ویتامین بر بافت کبد است. موافق با مطالعه حاضر، سطح آنزیم ALP در زمان تغذیه فیل ماهی (*Huso huso*) (طی ۸ هفته) با ویتامین C کاهش یافته است (Falahatkar *et al.*, 2015).

(*al.*, 2015). علاوه بر این، استفاده از ویتامین C جیره سطح ALP را در ماهی کپور قرار گرفته در معرض نانوذره تیتانیوم کاهش داده است (Hajirezaee *et al.*, 2020). جیره حاوی ویتامین C توانسته است سطح AST و ALT در ماهی تیلپای قرار گرفته در معرض یک باکتری عفونی (به عنوان یک استرس بیولوژیک) را به طور قابل توجهی کاهش دهد (Ibrahim *et al.*, 2020). این کاهش در فعالیت آنزیم‌های کبدی در تیمارهای مکمل شده احتمالاً به دلیل قابلیت ویتامین C در کاهش تولید ترکیبات سمی همانند مالون دی‌آلدئید و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کبد است (Mozhdeganloo *et al.*, 2015). از سوی دیگر، ویتامین C قادر است به عنوان یک عامل دهنده الکترون عمل کرده و رادیکال‌های آزاد تولید شده را غیر فعال نماید (Hoseinifar *et al.*, 2020). بنابراین، مطالعه حاضر نشان داد که مکمل‌سازی جیره غذایی با ویتامین C از افزایش سطوح آنزیم‌های دخیل در استرس اکسیداتیو ناشی از استرس دستکاری در ماهی طلایی ماده جلوگیری می‌کند. این نتایج به وضوح نشان می‌دهند که ویتامین C در نقش یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند.

سطح گلوکز و کورتیزول در مطالعه حاضر در مولدین ماده ماهی طلایی تحت استرس تغذیه شده با جیره بدون ویتامین C به طور قابل توجهی افزایش یافت. به دنبال بروز استرس، محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-بافت اینترنال فعال شده که در نهایت سطوح کورتیزول به سرعت افزایش می‌یابد (Moritz *et al.*, 2020). با افزایش سطح کورتیزول، نرخ تجزیه گلیکوژن ذخیره شده در کبد و عضلات بیشتر شده و

شده با غذای حاوی ویتامین C توانایی بالاتری در مقابله با شرایط استرسی داشته و غلظت‌های نرمال از کورتیزول و گلوکز نشان دادند.

شاخص‌های ایمنی

براساس نتایج، استرس دستکاری سطح شاخص‌های ایمنی را در ماهیان تحت استرس و تغذیه شده با جیره بدون ویتامین C را به طور قابل توجهی در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با ویتامین C کاهش داد. در این راستا، مطالعات گذشته نیز سرکوب سیستم ایمنی را به دنبال مواجهه ماهی‌ها با شرایط استرسی گزارش کرده‌اند (Chekani *et al.*, 2021). موافق با مطالعه حاضر، استرس تراکم منجر به کاهش پاسخ‌های ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شد (Yousefi *et al.*, 2023). همچنین پاسخ‌های ایمنی در ماهی کپور قرار گرفته در معرض استرس تراکم تضعیف شد (Yousefi *et al.*, 2019). کاهش پاسخ‌های ایمنی در مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل ترشح هورمون‌های کورتیکواستروئیدی و سرکوب سیستم ایمنی باشد. علاوه بر این، یافته‌های دیگر نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو از طریق آسیب به سلول‌های غشایی روده، سلول‌های کبدی و سلول‌های فاگوسیتوز بر فعالیت کمپلمان‌ها، لایزوزیم و دیگر عناصر دفاعی تأثیر می‌گذارد (Moro-García *et al.*, 2018). در مطالعه حاضر، تمامی شاخص‌های ایمنی اندازه‌گیری شده در ماهیان قرار گرفته در معرض استرس دستکاری به طور معناداری کمتر از تیمارهای دیگر بود. کاهش سطوح لایزوزیم و میلوپراکسیداز به کاهش منابع تولیدکننده آن‌ها (نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها) در شرایط استرس مرتبط است (Kaya *et al.*, 2015). از سوی دیگر، کاهش فعالیت اجزای

نهایتاً سطوح گلوکز خون جهت مقابله با استرس در ماهی زیاد می‌گردد (Faught and Vijayan, 2016). در واقع، افزایش سطح گلوکز پلاسما نشان‌دهنده تلاش سیستم فیزیولوژیک جانور برای تأمین انرژی برای غلبه بر شرایط استرس‌زا است (Yousefi *et al.*, 2023). در این مطالعه، افزودن ویتامین C به جیره غلظت گلوکز و کورتیزول را به طور قابل توجهی در ماهی مولد طلایی کاهش داد. به نظر می‌رسد که بین غلظت ویتامین C و سطح کورتیزول ارتباط معکوسی وجود داشته باشد؛ موضوعی که توسط Barros و همکاران (۲۰۱۴) در ماهی تیلاپای نیل تغذیه شده با ویتامین C و قرار گرفته در معرض استرس سرما تایید شد. همچنین موافق با مطالعه حاضر، براساس مطالعه Tatina و همکاران (۲۰۱۲)، جیره حاوی ویتامین C به طور قابل توجهی سطح هورمون کورتیزول و مقدار گلوکز را در ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) قرار گرفته در شرایط استرس کاهش داد. علاوه بر این، افزایش سطح ویتامین C در جریان خون منجر به کاهش واکنش هیدروکسیلاسیون درگیر در بیوستز هورمون‌های استروئیدی مانند گلوکوکورتیکوئید می‌شود که کاهش سطح کورتیزول و گلوکز خون را در پی دارد (Moritz *et al.*, 2020). موافق با مطالعه حاضر، اثر متقابل سطوح ویتامین C و تغییرات اکسیژنی و دمایی روی کورتیزول و گلوکز خون تاسماهی سبیری (*Acipenser baerii*) مشاهده شد که مقادیر بالای ویتامین C می‌تواند در کاهش اثرات سوء استرس نقش مثبتی را ایفا کند (Pourgholam *et al.*, 2018). با توجه به نتایج حاصل، مطالعه حاضر نشان داد که دستکاری ماهیان ماده طلایی موجب افزایش سطوح در گردش کورتیزول و گلوکز می‌شود؛ با این حال، ماهیان تغذیه

سیستم کمپلمان احتمالاً به دلیل کاهش کارایی کبد در شرایط استرس است (Ni et al., 2014). همچنین کاهش محتوای ایمونوگلوبولین در این شرایط ممکن است نتیجه کاهش تعداد لنفوسیت‌ها و ناتوانی آن‌ها در بیوسنتز زیر واحدهای ایمونوگلوبولین باشد (Ercal et al., 2000). بر اساس شواهد موجود، محرک‌های ایمنی از جمله ویتامین C قادرند نرخ بیوسنتز پروتئین‌های ایمنی را تغییر داده و ترشح آن‌ها را در خون افزایش دهند. از سوی دیگر، نتایج مطالعه حاضر حاکی از بهبود پاسخ‌های ایمنی به دنبال استفاده از ویتامین C در جیره غذایی بود؛ با این حال، این ریز مغذی نتوانست مقادیر شاخص‌های ایمنی در تیمار S^+C^+ را در سطح تیمارهای بدون استرس حفظ نماید. این امر نشان می‌دهد که استرس دستکاری در طول هشت هفته به شکل مزمن تأثیری مستقیم بر ایمنی مولدین ماده داشته است. بر اساس شواهد موجود، محرک‌های ایمنی از جمله ویتامین C قادرند نرخ بیوسنتز پروتئین‌های ایمنی را تغییر داده و ترشح آن‌ها را در خون افزایش دهند (Dawood et al., 2016). همچنین، ویتامین C نرخ سنتز پاسخ‌های ایمنی شامل لایزوزیم، ایمونوگلوبولین و مسیر جایگزین کمپلمان را در تیمار S^-C^+ در مقایسه با تیمار S^-C^- افزایش داد. براساس یافته‌های به دست آمده در مطالعات مشابه، ویتامین C از طریق حفظ یکپارچگی غشای سلول‌های طحال، کبد و کلیه در شرایط استرس به کارکرد این سه اندام در شرایط استرس کمک کرده و ایمنی آبی را در شرایط بهینه حفظ می‌کند (Xu et al., 2016). از سوی دیگر، ویتامین C قادر است از طریق تکثیر لنفوسیت‌ها در بافت‌های لنفاوی ترشح ترکیبات خونی همانند لایزوزیم و کمپلمان را افزایش دهد (Xu et al.,

2016). موافق با مطالعه حاضر، ویتامین C در ماهی بارب حلب (*Barbonymus schwanenfeldii*) موجب افزایش ایمنی شد (Ghiasvand et al., 2013). بنابراین، با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان ذکر نمود که قرار گرفتن ماهی طلایی مولد در معرض استرس با کاهش شاخص‌های ایمنی همراه است. ویتامین C، از طرف دیگر، موجب بهبود شاخص‌های ایمنی شد و به نظر می‌رسد که این ویتامین قادر است پاسخ‌های ایمنی را در شرایط استرس در حد مطلوب حفظ نماید.

نتیجه‌گیری

به کارگیری افزودنی‌های غذایی از راهکارهای مؤثر در بهبود کیفی جیره آبزیان است که همزمان با افزایش ایمنی و رشد می‌تواند اثرات مثبتی بر تولید مثل به همراه داشته باشد. در مطالعه حاضر استفاده از ویتامین C در جیره ماهی طلایی مولد در شرایط بدون استرس اثرات مثبتی بر پاسخ‌های ایمنی ایفا کرد. علاوه بر این، این ویتامین به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد استرس توانست سطح آنزیم‌های پلاسمایی کبد و فاکتورهای استرسی را در شرایط نرمال نسبت به گروه کنترل کاهش دهد. از سوی دیگر، به کارگیری ویتامین C به عنوان یک عامل محافظتی در برابر استرس به طور قابل توجهی سطح کورتیزول، گلوکز، آلکالین فسفاتاز، تری‌گلیسرید و میزان میلوپراکسیداز پلاسما را کاهش داد. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که ویتامین C یک محرک قوی برای بهبود پاسخ‌های ایمنی و کاهش فاکتورهای استرسی در مولدین ماده ماهی طلایی به شمار می‌رود.

DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.07.066

7. Barros, M.M., Falcon, D.R., de Oliveira Orsi, R., Pezzato, L.E., Fernandes Jr, A.C., Guimarães, I.G., Fernandes Jr., A., Padovani, C.R. and Sartori, M.M.P., 2014. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 39(2), pp.188-195. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.05.004
8. Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), pp.517-525. DOI: 10.1093/icb/42.3.517
9. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp.248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
10. Burtis C.A., Ashwood E.R. and Bruns D.E., 2012. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book. Elsevier Health Sciences. 100 p.
11. Buscaino, G., Filiciotto, F., Buffa, G., Bellante, A., Di Stefano, V., Assenza, A. and Mazzola, S., 2010. Impact of an acoustic stimulus on the motility and blood parameters of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Marine Environmental Research*, 69(3), pp.136-142. DOI: 10.1016/j.marenvres.2009.09.004
12. Chekani, R., Akrami, R., Ghiasvand, Z., Chitsaz, H. and Jorjani, S., 2021. Effect of dietary dehydrated lemon peel (*Citrus limon*) supplementation on growth, hemato-immunological and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under exposure to crowding stress.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم مزرعه سبز سفیدرود شهرستان آستانه اشرفیه، که طی اجرای این تحقیق، صمیمانه همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Abd El-Gawad, E.A. and Abdel Hamid, O.M., 2014. Effect of vitamin C dietary supplementation in reducing the alterations induced by fenitrothion in *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(3), pp.787-796. DOI: 10.1007/s10695-013-9885-4
2. Abdollahpour, H., Falahatkar, B., Jafari, N. and Lawrence, C., 2020. Effect of stress severity on zebrafish (*Danio rerio*) growth, gonadal development and reproductive performance: Do females and males respond differently?. *Aquaculture*, 522, pp.293-300. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735099
3. Angelo, L.D. and Girolamo, P., 2020. Goldfish (*Carassius auratus*). In: Blanco, A.M., Unniappan, S. (Eds), 2022. Biology, husbandry, and research applications. Academic Press, pp.373-408. DOI: 10.1016/b978-0-12-821099-4.00012-2
4. AOAC, 2012. Official methods of analysis. Association of Analytical Chemists. 19th Edition, Washington DC, USA.
5. Atef, M. and Falahatkar, B., 2014. Effects of stress on body cortisol and reproduction of guppy (*Poecilia reticulata*). *Fisheries Science and Technology*, 3(4), pp.57-67.
6. Banaee, M., Soltanian, S., Suredda, A., Gholamhosseini, A., Haghi, B.N., Akhlaghi, M. and Derikvandy, A., 2019. Evaluation of single and combined effects of cadmium and micro-plastic particles on biochemical and immunological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 236(2), pp.1-28.

- physiological functions of beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, 46(12), pp.3056-3069. DOI: 10.1111/are.12468
20. Falahatkar, B., Gholami, Sh., Rasouli Kargar, A. and Effatpanah, I., 2020. Effect of different feeding rates on feed intake, growth and nutritional performance in juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) at high temperature. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 31(6), pp.39-50. DOI: 10.22092/ISFJ.2023.128619
 21. Falcon, D.R., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Sampaio, F.G. and Hisano, H., 2007. Physiological responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed vitamin C and lipid supplemented diets and submitted to low temperature stress. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2), pp.287-295. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2007.00098.x
 22. Fast, M.D., Hosoya, S., Johnson, S.C. and Afonso, L.O., 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short-and long-term stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(2), pp.194-204. DOI: 10.1016/j.fsi.2007.10.009
 23. Faught, E. and Vijayan, M.M., 2016. Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 199, pp.136-145. DOI: 10.1016/j.cbpb.2016.06.012
 24. Fracalossi, D.M., Allen, M.E., Yuyama, L.K. and Oftedal, O.T., 2001. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. *Aquaculture*, 192(2-4), pp.321-332. DOI: 10.1016/S0044-8486(00)00455-5
 25. Ghiasvand, Z., Ahmadi, Z., Allameh, M. and Changizi, R., 2013. Effect of different levels of dietary vitamin C (Ascorbic acid) on growth, nutrition, survival and some immunological and *Aquaculture*, 539(6), pp.736597. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.736597
 13. Dawood, M.A., Koshio, S., Ishikawa, M. and Yokoyama, S., 2016. Immune responses and stress resistance in red sea bream, *Pagrus major*, after oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and vitamin C. *Fish and Shellfish Immunology*, 54(2), pp.266-275. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.04.017
 14. Dawood, M.A. and Koshio, S., 2018. Vitamin C supplementation to optimize growth, health and stress resistance in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 10(2), pp.334-350. DOI: 10.1111/raq.12163
 15. Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B. and Ren, H., 2017. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific Reports*, 7(1), pp.1-10. DOI: 10.1038/srep46687
 16. Ehsani Kenari, J., Esmaeili fereidouni, A. and Farrokhrouz lashidani, M., 2015. Effects of transportation on stress indicators, steroids hormones and hematological parameters of the broodstocks of common carp (*Cyprinus carpio*). *Experimental Animal Biology*, 4(1), pp.53-65. [In Persian]
 17. Ellis, A.I., 1990. Lysozyme assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Van Muiswinkel, W.B. (Eds.), *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, pp.101-103.
 18. Ercal, N., Neal, R., Treeratphan, P., Lutz, P.M., Hammond, T.C., Dennery, P.A. and Spitz, D.R., 2000. A role for oxidative stress in suppressing serum immunoglobulin levels in lead-exposed Fisher 344 rats. *Environmental Contamination and Toxicology*, 39(2), pp.251-256.
 19. Falahatkar, B., Soltani, M., Abtahi, B., Kalbassi, M.R. and Pourkazemi, M., 2015. The role of dietary L-ascorbyl-2-polyphosphate on the growth and

- pp.793-803. DOI:10.1007/s10499-016-0080-3
32. Javanmardi, S., Rezaei Tavabe, K., Moradi, S. and Bayat Ghiyasi, L.S., 2018. Effects of different levels of vitamin C in the diet on growth performance, digestive enzyme activity and some blood stress factors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sublethal toxicity of malathion. *Aquaculture Science*, 5(2), pp.40-49. [In Persian]
 33. Kaya, H., Çelik, E.Ş., Yılmaz, S., Tulgar, A., Akbulut, M. and Demir, N., 2015. Hematological, serum biochemical, and immunological responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to phosalone. *Comparative Clinical Pathology*, 24(3), pp.497-507. DOI: 10.1007/s00580-014-1930-x
 34. Komiyama, T., Kobayashi, H., Tateno, Y., Inoko, H., Gojobori, T. and Ikeo, K., 2009. An evolutionary origin and selection process of goldfish. *Gene*, 430(1-2), pp.5-11. DOI: 10.1016/j.gene.2008.10.019
 35. Liu, H., Xie, S., Zhu, X., Lei, W., Han, D. and Yang, Y., 2008. Effects of dietary ascorbic acid supplementation on the growth performance, immune and stress response in juvenile *Leiocassis longirostris* Günther exposed to ammonia. *Aquaculture Research*, 39(15), pp.1628-1638. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2008.02036.x
 36. Martins-Silva, T., Martins, R.C., Murray, J., Carvalho, A.M., Rickes, L.N., Corrêa, B.F., Fraga, B.B., Brum, C.B., Freitas, D.F., Meyer, F.D.T., Carpena MX, Goularte LM, Gonzalez A., Oliveira, I.O. and Tovo-Rodrigues, L., 2025. Hair cortisol measurement: A systematic review of current practices and a proposed checklist for reporting standards. *Psychoneuroendocrinology*, 171, pp.107185. DOI:10.1016/j.psyneuen.2024.107185
 37. Mehrpak, M., Banaee, M., hematological parameters of Tinfoil Barb (*Barbonymus schwanefeldii*). *Animal Research (Iranian Biology)*, 29(3), pp.318-326. [In Persian]
 26. Guo, H. and Dixon, B., 2021. Understanding acute stress-mediated immunity in teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2, pp.100010. DOI: 10.1016/j.fsirep.2021.100010
 27. Hajirezaee, S., Mohammadi, G. and Naserabad, S.S., 2020. The protective effects of vitamin C on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to titanium oxide nanoparticles (TiO₂-NPs). *Aquaculture*, 518, pp.734734. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734734
 28. Herrera, M., Mancera, J.M. and Costas, B., 2019. The use of dietary additives in fish stress mitigation: comparative endocrine and physiological responses. *Frontiers in Endocrinology*, 10, pp.1-22. DOI: 10.3389/fendo.2019.00447
 29. Hoseinifar, S.H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F. and Carnevali, O., 2020. Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. *Fisheries Science and Aquaculture*, 29(2), pp.198-217. DOI: 10.1080/23308249.2020.1795616
 30. Ibrahim, R.E., Ahmed, S.A., Amer, S.A., Al-Gabri, N.A., Ahmed, A.I., Abdel-Warith, A.W.A. 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, pp.100545. DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100545
 31. Imanpoor, M., Imanpoor, M.R. and Roohi, Z., 2017. Effects of dietary vitamin C on skeleton abnormalities, blood biochemical factors, haematocrit, growth, survival and stress response of *Cyprinus carpio* fry. *Aquaculture International*, 25(2),

- performance and immune responses of juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) to stocking density and hypoxia stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 36(2), pp.325-335. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.12.002
44. Ota, K.G., 2021. Goldfish as an Experimental Model. In: Ota, K.G. (Ed.), *Goldfish Development and Evolution*, Springer, Singapore, pp.17-44. DOI: 10.1007/978-981-16-0850-6_2
45. Rahimi, R., Mirahmadi, S.A., Hajirezaee, S. and Fallah, A.A., 2022. How probiotics impact on immunological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)? A systematic review and meta-analysis. *Reviews in Aquaculture*, 14(1), pp.27-53. DOI:10.1111/raq.12582
46. Pourgholam, Y., Khara, H. and Mohseni, M., 2018. The interaction between vitamin C levels and oxygen and temperature changes on cortisol and blood glucose in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Jornal of Aquaculture Development*, 13(2), pp.1-13. [In Persian]
47. Pourhosein Saramah, S., Falahatkar, B., Azari Takami, G. and Efatpanah, I., 2012. Effects of different photoperiods and handling stress on spawning and reproductive performance of pikeperch *Sander lucioperca*. *Animal Reproduction Science*, 132(3-4), pp.213-222. DOI:10.1016/j.anireprosci.2012.05.011
48. Ranaye Akhavan, S., Eslsmloo, Kh. and Jamalzade Fallah, F., 2012. The effect of acute stress on changes in cortisol, antiprotease and blood parameters of goldfish (*Carassius auratus*). *Jornal of Aquaculture Development*, 6(2), pp.23-35. [In Persian]
49. Schreck, C.B. and Tort, L., 2016. The concept of stress in fish. In: Schreck, C.B., Tort, L., Farrell, A., Brauner, C. (Eds.), *Biology of Stress in Fish*. Academic Press, 602 p.
- Nematdoost, H.B. and Noori, A., 2015. Protective effects of vitamin C and chitosan against cadmium-induced oxidative stress in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*). *Iranian Journal of Toxicology*, 9(30), pp.1360-1367.
38. Merchie, G., Lavens, P., Storch, V., Übel, U., Nelis, H., De Leenheer, A. and Sorgeloos, P., 1996. Influence of dietary vitamin C dosage on turbot (*Scophthalmus maximus*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nursery stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 114(2), pp.123-133. DOI: 10.1016/0300-9629(95)02104-3
39. Moritz, B., Schmitz, A.E., Rodrigues, A.L.S., Dafre, A.L., Cunha, M.P. and 2020. The role of vitamin C in stress-related disorders. *Nutritional Biochemistry*, 85(1), pp.1-70. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2020.108459
40. Moro-García, M.A., Mayo, J.C., Sainz, R.M. and Alonso-Arias, R., 2018. Influence of inflammation in the process of T lymphocyte differentiation: proliferative, metabolic, and oxidative changes. *Frontiers in Immunology*, 9(1), pp.1-18. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00339
41. Mozhdeganloo, Z., Jafari, A.M., Koohi, M.K. and Heidarpour, M., 2015. Methylmercury-induced oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: ameliorating effect of vitamin C. *Biological Trace Element Research*, 165(1), pp.103-109. DOI: 10.1007/s12011-015-0241-7
42. Mustafa, A., Hayat, S.A., Quarrar, P. and 2013. Stress modulated physiological responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, treated with non-ascorbic acid supplemented feed. *Advances in Zoology and Botany*, 1(2), pp.39-45. DOI:10.13189/azb.2013.010204
43. Ni, M., Wen, H., Li, J., Chi, M., Bu, Y., Ren, Y., Zhang, M., Song, Z. and Ding, H., 2014. The physiological

- different levels of vitamins C and E. *Aquatic and Fisheries*, 2(8), pp.9-19. [In Persian]
56. Wiegertjes, G.F., Stet, R.M., Parmentier, H.K. and Van Muiswinkel, W.B., 1996. Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparative approach. *Developmental and Comparative Immunology*, 20(6), pp.365-381. DOI: 10.1016/s0145-305x(96)00032-8
 57. Xie, S., Yin, P., Tian, L., Liu, Y. and Niu, J., 2020. Lipid metabolism and plasma metabolomics of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides* were affected by dietary oxidized fish oil. *Aquaculture*, 18(12), pp.735158. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735158
 58. Xu, H.J., Jiang, W.D., Feng, L., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Tang, W.N., Zhang, Y.A. and Zhou, X.Q., 2016. Dietary vitamin C deficiency depresses the growth, head kidney and spleen immunity and structural integrity by regulating NF- κ B, TOR, Nrf2, apoptosis and MLCK signaling in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish and Shellfish Immunology*, 52(2), pp.111-138. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.02.033
 59. Yang, J., Liu, D., Jing, W., Dahms, H.U. and Wang, L., 2013. Effects of cadmium on lipid storage and metabolism in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *PLoS One*, 8(10), pp.1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0077569
 60. Yousefi, M., Farsani, M.N., Afzali-Kordmahalleh, A. and Ghafarifarsani, H., 2023. Effects of dietary synbiotic supplementation on growth performance, digestive enzyme activities, and physiological resistance against high stocking density in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 32(3), pp.1-21. DOI: 10.1007/s10499-023-01323-0
 50. Shahkar, E., Yun, H., Kim, D.J., Kim, S.K., Lee, B.I. and Bai, S.C., 2015. Effects of dietary vitamin C levels on tissue ascorbic acid concentration, hematology, non-specific immune response and gonad histology in broodstock Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 438, pp.115-121. DOI:10.1016/j.aquaculture.2015.01.001
 51. Shao, L., Han, D., Yang, Y., Jin, J., Liu, H., Zhu, X. and Xie, S., 2018. Effects of dietary vitamin C on growth, gonad development and antioxidant ability of on-growing gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). *Aquaculture Research*, 49(3), pp.1242-1249. DOI: 10.1111/are.13578
 52. Sharifinasab, Z., Banaee, M., Nematdoost Haghi, B. and Noori, A., 2016. Protective effect of vitamin C and chitosan on blood biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to paraquat. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 25(3), pp.181-199. [In Persian]
 53. Spanò, L., Tyler, C.R., van Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Thomé, J.P. and Kestemont, P., 2004. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*, 66(4), pp.369-379. DOI: 10.1016/j.aquatox.2003.10.009
 54. Svobodova, Z., Luskova, V., Drastichova, J., Svoboda, M. and Žlábek, V., 2003. Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 72(1), pp.79-85. DOI: 10.2754/avb200372010079
 55. Tatina, M., Taati, R., Bahmani, M., Soltani, M. and Gharibkhani, M., 2012. Effect of acute stress on fluctuations of cortisol and glucose of sterlet (*Acipenser ruthenus*) fed with