

التغيرات النسيجية المرضية الناجمة عن انخفاض مستوى فيتامين C في علائق

اسماك الكارب العشي *Ctenopharyngodon idella*

مريم جاسم محمد العلكاوي* بشرى ابراهيم القيسي** سعيد عبد السادة الشاوي***

الملخص

تم قياس مستوى تركيز فيتامين C في أعضاء أسماك الكارب العشي، اذ ازداد هذا المستوى بزيادة مستوى الفيتامين في العليقة فبلغ في نهاية مدة التجربة (24 اسبوعاً) في كل من الكبد، الكليتين، الطحال، المبايض والخصى على التوالي. أظهرت الأعراض العيانية السلوكية لدى الأسماك المغذاة بالمستويات المنخفضة من فيتامين C انخفاض الوزن وضعف الشهية مع بعض الحالات العصبية، كما تميزت التغيرات المرضية النسيجية بشدها في المستويات المنخفضة من فيتامين C والتي تميزت بفرط التنسج والالتواء للغلاصم مع الترف والنخر والارتشاح بالخلايا الالتهابية معظمها للمفيدة الوحيدة النواة والخزب في الغلاصم، الكبد، الكليتين، والعضلات.

المقدمة

ان تركيب فيتامين C يشابه السكريات الاحادية في التركيب $C_6H_8O_6$ ويدعى أيضا حامض الاسكوربيك ويكون هيئة مختزلة، يفقد زوجا من الالكترونات ويصبح مؤكسدا ويدعى حامض دي هايدرواسكوربيك وان كلا من الصورتين فعالة حيويًا، وان للفيتامين خواصاً حامضية وخواصاً اختزالية قوية ويستقر تجاه الحرارة في المحاليل الحامضية، ولكنه يتحلل بوجود القاعدة، ويتسارع تحطم هذا الفيتامين عند تعرضه للضوء (1). وأول من وصف تركيبه الكيميائي هما الباحثان **Dabrowski** و **Moreau** (11). يتأكسد الفيتامين بشكل عكسي في الجسم الى شكل يعرف **dehydroascorbic acid** والذي يمتلك فعالية الفيتامين الكاملة ويشكلان نظاماً اختزالياً - تأكسدياً عكسياً سريعاً (18).

ان المادة الاساس لتصنيع فيتامين C هي الكلوكوز التي تتحول الى **L-ascorbic acid** ($C_6H_8O_6$) بتفاعلات تأكسدية ترفع اربع ذرات هيدروجين لتشكيل جزئتي ماء (13). ان الاسماك غير قادرة على تصنيع هذا الفيتامين، في الاقل ليس بكميات كبيرة والسبب في عدم التصنيع يعود الى فقدان او عدم فاعلية انزيم **Gulonolactone Oxidase** (18.6). عندما يصل خزين الجسم من فيتامين C في الاسماك مستوى واطناً حرجاً تظهر اعراض مرضية للنقص (8) وهذه العلامات متسببة عن قلة تخليق الكولاجين (7) وهو البروتين الذي يوجد بدرجة كبيرة في الانسجة الرابطة والعظام والغضاريف والجلد والقرنية والمساحات البينية (15، 19).

في هذا البحث تمت دراسة التغيرات المرضية لأسماك الكارب العشي حيث عرضت هذه الاسماك لمستويات مختلفة من فيتامين C (0، 50، 100، 150، 200 و 250 ملغم فيتامين C / كغم علف جاف) لدراسة تراكيز فيتامين C في الكبد، الكليتين، الطحال، المبايض والخصى ودراسة التغيرات المرضية العيانية في الغلاصم، الكبد، الكليتين والعضلات.

* وزارة العلوم والتكنولوجيا - بغداد، العراق.

** كلية الطب البيطري - جامعة بغداد - بغداد، العراق.

*** كلية الزراعة - جامعة بغداد - بغداد، العراق.

المواد وطرائق البحث

تم الحصول على الكارب العشي من شركة الفرات الاوسط في محافظة بابل. كان معدل وزن الاسماك 75 + 8 غم. وتمت اقلمة الاسماك في ظروف المختبر التابع الى قسم الثروة الحيوانية/كلية الزراعة/جامعة بغداد لمدة 15-20 يوماً قبل بدء التجارب عليها في احواض كبيرة نوع فايبر كلاس بسعة 2.5 م³ مجهزة بالاوكسجين بصورة مستمرة باستخدام مؤقت يعمل لمدة ثلاث ساعات ويتوقف كل 15 دقيقة وغذيت مرتين باليوم في الساعة التاسعة صباحاً والثانية ظهراً، حيث اعطيت كميات من العلف الى حد الاشباع في النصف الساعة الاولى ثم بعدها أزيل الغذاء المتبقي. استخدمت احواض زجاجية بقياس 30 × 70 × 25 سم لتربية الاسماك تحتوي على 40 لتر ماء، ومجهزة بالاوكسجين عن طريق مضخة هواء، وبمعدل 7.5 - 8 ملغم/لتر وتم تسجيل درجة الحرارة يومياً حيث تراوحت من 16 - 25 م°. كما تم قياس الاس الهيدروجيني اذ كان بمعدل 7.5 ± 0.3. تم تجهيز الماء بصورة حرة طيلة مدة الدراسة مع تبديله يومياً. وكمية العلف المعطاة كانت 1% للأسماك الكبيرة من وزن الجسم. صنعت العليقة الغذائية مختبرياً وحسب مواصفات العليقة القياسية جدول (1) وكما ذكرها New (12).

جدول 1: تركيب العليقة الغذائية (1)

النسبة المئوية (%)	المادة العلفية
35	كازين (vitamin Free) Casein
5	جيلاتين Gelatin
48	دكسترين Dextrin
3	زيت كبد الكود Cod liver oil
2	زيت فول الصويا Soybean oil
2	زيت الذرة Corn oil
-	خليط معادن Mineral mixture
-	خليط فيتامينات Vitamin mixture

الفيتامينات (A 6000 I.U ، D3 1000 I.U ، E 60 IU ، K 12 I.U ، B1 24 ملغم / كغم ، B2 24 ملغم / كغم ، B6 24 ملغم / كغم ، Panthothenic acid 60 ملغم / كغم ، Niacin 120 ملغم / كغم ، Biotin 0.24 ملغم / كغم ، Folic acid 6 ملغم / كغم ، Choline chloride 540 ملغم / كغم ، B12 0.024 ملغم / كغم. المعادن (كغم / ملغم) (Fe 50 ، Cu 3 ، Mn 20 ، Zn 50 ، I 0.1 ، Co ، Se 0.01 ، 0.1).

تم اجراء التحليل الكيميائي للعليقة (جدول 2) حيث تم تقدير نسبة البروتين بجهاز المايكروكلدال Microkjeldahl والدهون بجهاز السكسوليت Soxhlet والرماد عن طريق تجفيف العينة في فرن الترميد Muffle furnace وكذلك تقدير الرطوبة عن طريق الفرن الحراري الهوائي فضلاً عن تقدير الكربوهيدرات حسابياً ، كما تم تقدير الطاقة المثلثة في العليقة (1).

جدول 2: التحليل الكيميائي للعليقة الغذائية

النسبة المئوية (%)	التركيب الكيميائي
30.93	بروتين
3.66	دهن
1.92	رماد
4.32	رطوبة
59.17	NEF كربوهيدرات
3566 كيلو سرعة طاقة ممثلة / كغم علف	الطاقة المثلة

تم استخدام الأسماك لغرض اجراء الفحوص العيانية والنسيجية للأعضاء المختلفة للأسماك، اذ وزعت عشوائياً، حيث تم وضع خمس سمكات في كل حوض وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة من معاملات الغذاء الست التي أضيف لها فيتامين C بمستويات مختلفة وكانت:

المعاملة الاولى T1: صفر ملغم فيتامين C / كغم علف ، المعاملة الثانية T2: 50 ملغم فيتامين C / كغم علف ، المعاملة الثالثة T3: 100 ملغم فيتامين C / كغم علف ، المعاملة الرابعة T4: 150 ملغم فيتامين C / كغم علف ، المعاملة الخامسة T5: 200 ملغم فيتامين C / كغم علف ، المعاملة السادسة T6: 250 ملغم فيتامين C / كغم علف.

ولدراسة التغيرات النسيجية والمرضية ازيلت الأعضاء المذكورة أنفاً حيث تؤخذ مقاطع من كل عضو بقياس 1سم ويوضع في الفورمالين المتعادل (10%) كمثبت للنسيج ولغرض عمل المقاطع النسيجية اتبعت طريقة Pearse (14)، اما طريقة تقدير تركيز فيتامين C في الأعضاء فقد تم استخدام الطريقة الحجمية وقدر التركيز تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل Manickam و Sadasiram (16).

اجري التحليل الاحصائي لمعرفة تأثير نوع المعاملة باستخدام التصميم العشوائي الكامل (CRD) Complete randomized design واختبار معنوية الفروق بين المعاملات فقد استعمل اختبار دنكن المتعدد الحدود Duncan's multiple range test الموضح من قبل Duncan (4) وتحت مستوى احتمال 0.05، وقد استخدم البرنامج الجاهز SAS (17).

النتائج والمناقشة

تأثير فيتامين C في مستوى تركيزه في أعضاء أسماك الكارب العشي

سجل مستوى تركيز فيتامين C ارتفاعاً معنوياً في كل من الكبد، الكليتين والطحال ليصل إلى الارتفاع الأعلى عند المعاملة السادسة (T6) مقارنة مع باقي المعاملات بما فيها معاملة السيطرة (T2، T3) بفارق معنوي ($0.05 >$) ليصل إلى 1.01 ± 72.80 و 1.60 ± 76.40 و 0.74 ± 19.60 مايكروغرام/غم على التوالي، بعد 24 أسبوعاً من تربية الأسماك جدول (1) و تتفق النتائج الحالية مع ما لوحظ في دراسة Lovell و El-Naggar (5) في ارتفاع نسبة فيتامين C في كل من الكبد والكليتين والطحال عند استعمال مستويات عالية من فيتامين C في العليقة المقدمة لاسماك جري القناة إلى ضعف مستواها في حالة استعمال مستويات منخفضة منه وكذلك مع Fracalossi وجماعته (6) عند قياس مستوى فيتامين C في الطحال وهذا يحافظ على خزين من الفيتامين يلبي الحاجات الفسلجية كافة وبشكل مثالي. اما الخزين الواطي منه فإنه سرعان ما يتعد ولا يلبي أي من الحاجات الفسلجية، ويعرض الكائن الحي إلى الإجهاد. ان الاضافات العالية من فيتامين C في العليقة لا تؤدي بالضرورة إلى زيادة تركيزه في الانسجة

والاعضاء خاصة منها الكبد والكليتين، إذ تصل في بعض الأسماك إلى درجة التشبع كاسماك التراوت القزحي واية زيادة لها سوف لا تؤثر في المخزون من الفيتامين في انسجتها (9). واما ما وضح جدول (3) في الزيادة المعنوية ($0.05 > \alpha$) لمستوى فيتامين C في مياض وخصى أسماك الكارب العشي لتصل في نهاية التجربة إلى 1.46 ± 40.60 و 0.34 ± 28.40 مايكروغرام/غم على التوالي عند المعاملة السادسة (T6) مقارنة مع باقي المعاملات بما فيها معاملتنا السيطرة فجاءت تلك النتائج متفقة مع ما أشار إليه Mahajan و Agrawal (2) حول مقارنة مستوى فيتامين C في تلك الاعضاء لأسماك التراوت القزحي إذ وجدوا بأن اعلى المستويات سجلت في فصل الصيف وفي موسم التكاثر لارتفاع درجات الحرارة وسرعة بلوغ الاعضاء التناسلية لمرحلة النضوج والتي تتطلب مستويات عالية من هذا الفيتامين اكثر مما هو الحال في فصل الشتاء وانخفاض درجات الحرارة مع انخفاض تغذيتها إلى اقل المستويات، بينما يشير Dabrowski و Moreau (11) إلى ان ترسب فيتامين C في مناسل الجلوكي البحري يأتي من تحوله من بعض الانسجة مثل العضلات والجلد.

الفحوص المرضية العيانية والنسجية لاسماك الكارب العشي

الغلاصم Gills

تبين بأن نقص فيتامين C (المعاملة الاولى) يؤثر في الغلاصم مظهرياً حيث أظهر المقطع النسيجي لغلاصم الكارب العشي (شكل 1) وجود مناطق نزفية واسعة الانتشار على سطح الغلاصم وتشوه Distortion للصفائح والخيوط الغلصمية لاسماك الكارب العشي فضلاً على فرط التضخم Hyperatropy للصفائح الغلصمية اما نسيجياً فقد وجد نزف منتشر في جميع طبقات الصفائح والخيوط الغلصمية وتشوه غضروف الغلاصم فضلاً عن احتقان Congestion الاوعية الدموية الشعرية مع الارتشاح بالخلايا الالتهابية معظمها الخلايا اللمفية ووحيدة النواة فضلاً عن ارتشاح نسيج الغلاصم بالخلايا الوحيدة النواة ومعظمها البلاعم الكبيرة Macrophages لوحظ هذا أيضاً في معاملي السيطرة (T2، T3). ثم تتلاشى تلك العلامات عيانياً ونسيجياً مع زيادة مستوى الفيتامين في العليقة، حيث يؤدي انعدام الفيتامين او انخفاضه إلى زيادة الاجهاد، ومن ثم يقلل من الكفاءة التنفسية حيث تنخفض نسبة الاوكسجين. ومن ثم تعاني الاسماك من زيادة في سرعة التنفس والطفو إلى السطح لسحب اكبر كمية من الاوكسجين لتلبية الحاجات التنفسية (5). اما التشوه في غضروف الغلاصم فقد يعزى أيضاً إلى النقص في هذا الفيتامين لدوره في تكوين الانسجة الرابطة والعظام والغضاريف.

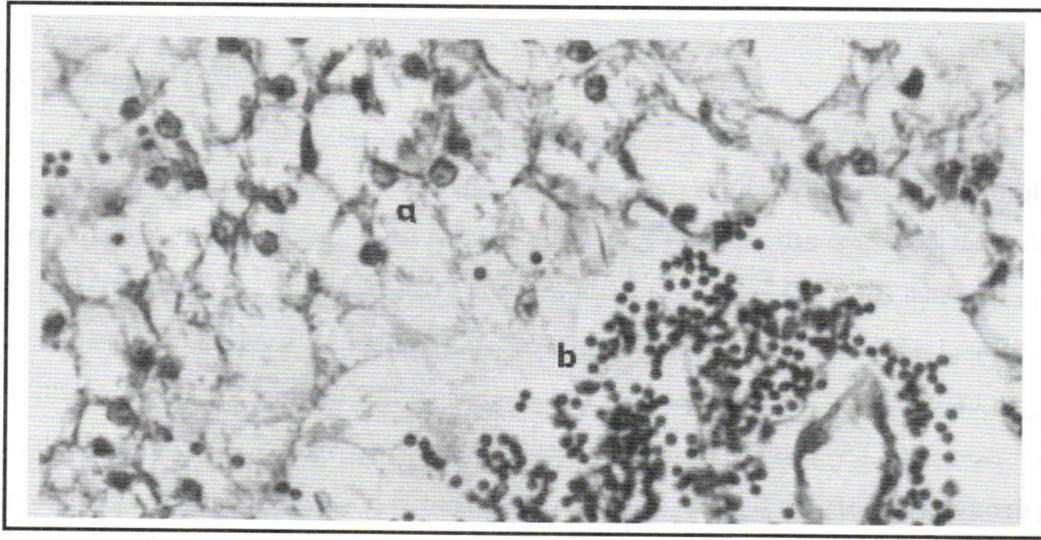


شكل 1: مقطع نسيجي لغلاصم سمكة كارب عشي للمعاملة الاولى للمدة 24 اسبوعاً.

لاحظ: a: تشوه غضروف وخيوط الغلاصم b: فرط تنسجها c: قصر طولها والتصاقها، صبغة H and E، (x40).

Liver الكبد

لوحظ من خلال الفحص العياني لكبد أسماك الكارب العشبي (شكل 2) شحوب لونه الكبد واصفراره مع تدور حافته وتضخمه نتيجة الالتهاب والتصاقه مع الخفظة Capsule عند التغذية على عليقة خالية من فيتامين C (المعاملة الاولى). أما نسيجياً فقد لوحظ تغير دهني Fatty change مع نخر الكبد Necrosis وتجمع الخلايا اللمفية حول الاوعية الدموية فضلاً عن حدوث تلك الافات في معاملي السيطرة (T2، T3) ثم انخفضت تلك الاعراض مع زيادة مستوى الفيتامين في العليقة، حيث ان النقص في مستوى الفيتامين يؤدي إلى الاخلال في الوظائف الايضية للكبد بسبب النخر المؤدي إلى موت الخلايا حيث يعمل فيتامين C على ايض الكوليسترول وان نقص الفيتامين يؤدي إلى تجمع الكوليسترول في الخلايا الكبدية وحدث التغير الدهني وشحوب لون الكبد وتدور حافته، كما اشار ايضاً إلى ان النقص في فيتامين C في العليقة يؤثر في اخلال الكبد في افراز مادة الصفراء وعدم خزن الكولاجين وهو احد البروتينات المهمة في تكوين معظم الانسجة الرابطة في الجسم (3).

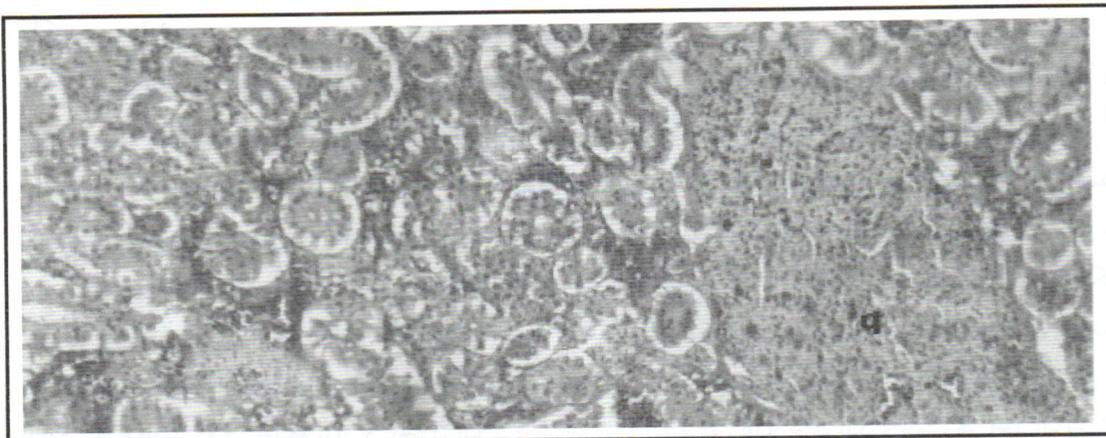


شكل 2: مقطع نسيجي لكبد سمكة كارب عشبي للمعاملة الاولى للمدة 24 اسبوعاً.

لاحظ: a التغير الدهني، b تجمع الخلايا حول الوعاء الدموي، صبغة H and E، (x40).

الكلية Kidney

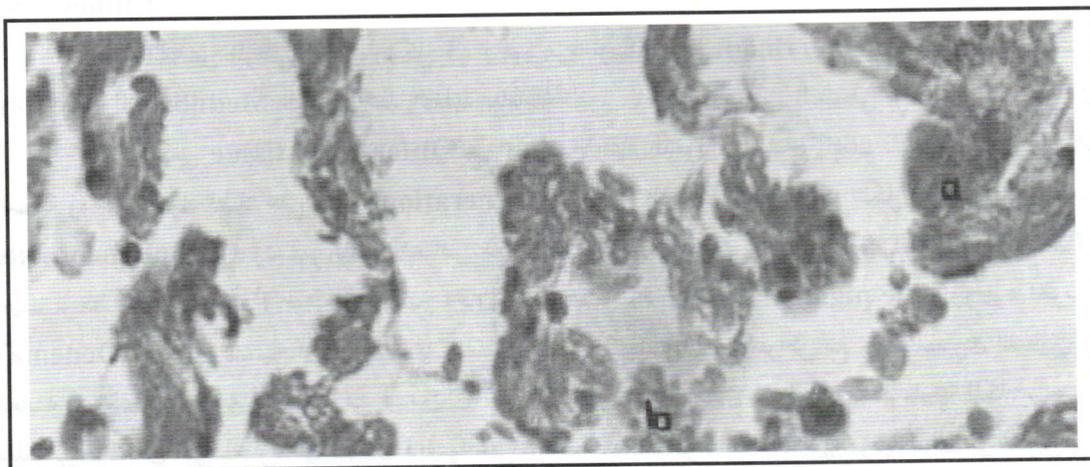
اظهر الفحص المرضي العياني (شكل 3) وجود بؤر نزفية Haemorrhagic foci منتشرة على قشرة Cortex ولب Medulla الكليتين عند التغذية بالمعاملة الاولى، وعند الفحص النسيجي لوحظ نزف منتشر في النسيج الخلالي للكلية Interstitial tissue مع احتقان الاوعية الدموية وارتشاح كثيف للنسيج الخلالي بالخلايا اللمفية ووحيدة النواة فضلاً على تنكس Degeneration ظاهرة النيبات الكلوية على شكل التهاب كلوي مزمن Chronic nephritis وتستمر تلك الاعراض مع زيادة مستوى الفيتامين بما فيها معاملتنا السيطرة (T2، T3) حيث لوحظ عند المعاملة T3 نزف في النسيج الخلالي مع ترسب المادة الصفراء bile pigment ووجود الخبز Oedema وارتشاح النسيج الخلالي بالخلايا اللمفية للأسماك. ثم قلت تلك الاعراض مع زيادة مستوى الفيتامين في العليقة ثم أختفت. ان التغذية الخالية من فيتامين C في العليقة تقود إلى الاخلال في الوظائف الفسلجية للكليتين حيث تقلل من اداءها في الترشيح وبذلك تضعف قابليتها على ترشيح وتصفية المواد الداخلة إليها مؤدية بذلك إلى تكوين بؤر نزفية في قشرة ولب الكلى مع ارتشاح في النسيج الخلالي للخلايا الكبدية، وحيث ان فيتامين C يدخل في تكوين كريات الدم الحمر فإن نقصه يؤدي إلى عدم تكوين هذه الكريات. او يؤثر في اغلفتها. فيكون الغلاف ضعيفاً ومن ثم يؤدي إلى تلفها وحدوث النزف (10).



شكل 3: مقطع نسجي لكلية سمكة كارب عشبي للمعاملة الثالثة للمدة 24 اسبوعاً. لاحظ: a نرف النسيج الخلالي، صبغة H and E، (x40).

العضلات Muscles

لوحظ احمرار العضلات مع ملمس هلامي ونزف منتشر في سطح العضلات (شكل 4)، كما لوحظ عند الفحص النسيجي نخر العضلات المتميز باحمرار الالياف العضلية مع اختفاء التخطيط والانوية المتغلظة **Pyknotic nuclei** وارتشاحها بالخلايا اللمفية عند المعاملة الخالية من فيتامين C (T1) وتستمر تلك الاعراض مع المعاملة الثانية (T2) وهي معاملة سيطرة، حيث لوحظ تجمعات كثيفة للخلايا اللمفية في حين لوحظ عند المعاملة الثالثة (T3) وهي معاملة سيطرة ايضاً نخر العضلات المتميز بحامضية السايوبلازم **Cytoplasm** مع تورم الالياف العضلية والارتشاح بالخلايا اللمفية والبلاعم الكبيرة لاسماك الكارب العشبي، ويستمر نخر العضلات وارتشاح الخلايا اللمفية حتى مع المعاملة الرابعة (T4) ثم تنخفض تلك الاعراض المرصية مع زيادة مستوى الفيتامين في العليقة (T5، T6). حيث اشار **Moreau** و **Dabrowski** (10) إلى ان لفيتامين C دور رئيس في هدر كسلة البرولين **Hydroxylation of proline** والمهم في تكوين الكولاجين وان نقصه او انعدامه يمنع تكوين الكولاجين الذي هو احد البروتينات المهمة في الجسم والمسؤولة عن تكوين الانسجة الرابطة والعظام والعضلات والغضاريف. وان قلة هذا الفيتامين تؤدي الى قلة انتاج الكولاجين ومن ثم الاخلال في وظيفة العضلات مما يعطيها مظهراً هلامياً محل محله النخر.



شكل 4: مقطع نسجي في عضلة سمكة كارب عشبي للمعاملة الثالثة للمدة 24 اسبوعاً. لاحظ: a نخر العضلات المتميز بزيادة حامضية السايوبلازم وتورم الالياف العضلية، b الارتشاح بالبلاعم الكبيرة والخلايا اللمفية، صبغة H and E، (x40).

المصادر

- 1- دلالي، باسل وصادق حسن الحكيم (1987). تحليل الاغذية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل،العراق.
- 2- Agrawal, N. K. and C. L. Mahajan (1980). Comparative tissue Ascorbic acid studies in Fishes. *J. Fish. Biol.*, 17:135-141.
- 3- Blom, J. H. and K. Dabrowski (2000). Vitamin C requirement of the Angle fish *Pterophylum scalare*. *J. World Aquac. Soc.*, 31(1):115-118.
- 4- Duncan, D. B. (1955). Multiple ranges and multiple F-tests. *Biometrics*, 11: 1-42.
- 5- El-Naggar, G. O. and R.T. Lovell (1991). Effect of source and dietary concentration of ascorbic acid on tissue concentrations of ascorbic acid in channel catfish. *J. World Aquacult. Soc.*, 22: 201-206.
- 6- Fracalossi, D. M., M. E. Allen and O. T. Oftdal (1998). Oscars *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamic C. *J. Nutr.*,128(10): 1745-1751.
- 7- Halver, J.E. (1989). Fishes nutrition, 2nd ed. Acad. Press.
- 8- Hilton, J. W. (1978). Efect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 35:431-436.
- 9- Malgorzata, M., K. Dabrowski and L. Volker (1995). Ascorbate polyphosphate is a bioavailable vitamin C source in juvenile rainbow trout. Tissue Saturation. *J. Nutr.*, 125:3055-3061.
- 10- Moreau, R. and K. Dabrowski (2000). Biosynthesis of ascorbic acid by extent action pterygins, *J. Fish Biology*, 57:733-745.
- 11- Moreau, R. and K. Dabrowski (1998). Body pool and synthesis of ascorbic acid in adult sea lamprey: An agnathan fish with gulonolactone oxidase activity. *Proc. Acad. Sci. USA*, 95:10279-10282.
- 12- New, M.B, (1987). Feed and feeding of fish and shrimp aquaculture development and coordination programme. ADCP/REP/87/26.
- 13- Pauling, L. (1976). Vitamin C and the common cold and flu. W.H. Freeman and Company.
- 14- Pearse, D. C. (1964). Histological techniques for electron microscopy. 2nd ed. Acad. press, Newyork.
- 15- Potter, J. D. (1997). Food, Nutrition and the prevention of cancer: A global prespective. BANTA, Book Group. Memaska.
- 16- Sadasiram, S. and A. Manickam (1997). Biochemical methods, 2nd ed. Newage international (p). Ltd. Pub.
- 17- SAS. (2001). SAS. STAT Users guide for personal computers. Release b.12. SAS Institute, Inc, Cary, NC.
- 18- Wildman, E. E .C. and D. M. Medeiros (2000). Advanced human nutrition. CRC Press, Boca Raton.
- 19- Williams, S. R. (1994). Essentials of nutritions and diet therapy, 6th ed. Mosby - Year Book.

HISTOPATHOLOGICAL CHANGES DUE TO LOW LEVELS OF VITAMIN C IN GRASS CARP FISH *Ctenopharyngodon* *idella* RATION

M. J. M. Al-Kawy* B. A. Al-Kasiy** S. A. Al-Shawy***

ABSTRACT

The concentration of vitamin C in the organs of grass carp was measured, It increased with increased vitamin concentration in rations, as experiments terminated after 24 weeks, values of vitamin C in liver, kidney, spleen, ovaries and testes reached 72.80 ± 1.01 , 76.40 ± 1.60 , 19.60 ± 0.74 , 40.60 ± 1.46 and 28.40 ± 0.34 $\mu\text{g} / \text{gm}$, respectively.

Clinical symptoms showed gross and behavioural changes for grass carp in vitamin concentration reduction in weight gain, appetite with some nervous states. Histopathological changes with low concentration of vitamin showed hyperplasia of gills filaments with distorted, heamorrhage, necrosis gills, liver, kidney and muscles showed areas of heamorrhage, necrosis, edema, infiltration with inflammatory cells, mostly lymphocytes and mononuclear cells.

* Ministry of Sci. and Tech. - Baghdad, Iraq.

** College of Veterinary Medicine- Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq..

***College of Agric- Baghdad Univ- Baghdad, Iraq.