فصلنامه علمی ـ پژوهشی دورهٔ ۵، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۵۹- ۷۲

اثر عصاره الکلی پوست انار (*Punica granatum* L.) بر فاکتورهای خون ماهی انگشت قد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

فریبا شفیعی*[۱]، نصرالله محبوبی صوفیانی [۲]، عیسی ابراهیمی [۳]، امین نعمت اللهی [٤]، عبدالناصر محبی [۵]

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان
۲- استاد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان
۳- دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان
٤- گروه بهداشت وکنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد
۵- گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

دریافت: ۹۳/۱۱/۰٤ پذیرش: ۹۵/۰۳/۲۹

*نویسنده مسئول مقاله: fr.shafiei@yahoo.com

چکیده:

تأثیر عصاره الکلی پوست انار (*Punica granatum*) بر پاره‌ای فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی سرم خون (RBC، Hb، Hct، MCV، MCH، MCHC، WBC، TP، CHO، GLU، LDL، HDL، Glb، TG، GOT، GPT، Alb، ALK، LDH) و فعالیت لیزوزیمی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انگشت قد (۱/۸± ۱۱/۷ گرم) به‌صورت تصادفی در ۵ تیمار و سه تکرار به مدت ۷۵ روز بررسی شد. تیمارها شامل غلظت‌های متفاوت از عصاره الکلی پوست انار (صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم غذا) بود . در پایان دوره آزمایش، خونگیری و زیست سنجی انجام شد. نتایج تحقیق افزایش معنی‌داری را در برخی پارامترهای خونی مانند: Hct، Hb و RBC در تیمارهای ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی گرم نشان داد. میزان پروتئین کل سرم در تیمارهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی گرم تفاوت معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد ($P<0/05$). فعالیت لیزوزیمی در تمام تیمارهای حاوی عصاره پوست انار افزایش معنی داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($P<0/05$). در کل، نتایج حاکی از بهبود پارامترهای هماتولوژیک و فعالیت لیزوزیمی ماهیان تحت تیمار با سطح ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره الکلی پوست انار بر کیلوگرم غذا می‌باشد.

کلید واژگان: عصاره پوست انار، *Punica granatum*، فاکتورهای خونی، فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون، فعالیت لیزوزیمی، کپور معمولی.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

مقدمه

آبزی‌پروری در کنار رشد قابل توجه، همواره با مشکلاتی نیز روبه‌رو بوده است. شیوع بیماری‌ها به‌عنوان مشکل عمده آبزی‌پروری، گسترش اقتصادی این بخش را در بسیاری از کشورهای جهان، تحت تأثیر قرار داده است. همواره راه‌حل‌هایی نیز برای برطرف کردن این مشکلات ارائه شده است، از جمله در بخش کنترل بیماری‌ها، استفاده از داروهای آنتی‌بیوتیک مطرح شد که این داروها مشکلات عدیده‌ای از جمله مقاوم شدن عوامل بیماری‌زا و مسائل زیست‌محیطی را به‌وجود آورده‌اند. علاوه بر آن آنتی‌بیوتیک‌ها موجب انتقال مقاومت دارویی به انسان می‌شوند که از این نظر منع قانونی و محدودیت مصرف برای این مواد وجود دارد (Aly et al., 2008). با توجه به جایگاه ویژهٔ محرک‌های ایمنی در تحریک ایمنی غیراختصاصی، استفاده از محرک‌های ایمنی در آبزیان ارجحیت بیشتری نسبت به حیوانات خون‌گرم دارد (Alishahi et al., 2012). در بین محرک‌های ایمنی انواع طبیعی آن به‌ویژه عصاره‌های گیاهی، به‌علت ایجاد آسیب کمتر به ماهی و محیط زیست به‌تازگی بیشتر مورد توجه بوده‌اند. تحقیقات پیشین نشان می‌دهد غذاهای غنی از ترکیبات فنولیک دارای مجموعه‌ای از ویژگی‌ها مانند خواص آنتی‌اکسیدانی(Shabtay et al., 2008)، تجمع پلاکت‌ها(Kay and Holub, 2002)، فعالیت ضدالتهابی (Castro et al., 2008)، تنظیم قند خون (Najafzadeh et al., 2010) و غیره هستند. از جمله منابع گیاهی حاوی ترکیبات فنولی گونهٔ انار خوراکی با نام علمی *Punica granatum* است که بومی ایران و هند می‌باشد(Anonymous, 2005). هر ساله هزاران تن پوست انار از سوی کارخانجات فراوری آب انار و کنسانتره به‌عنوان فراورده جانبی غیرقابل استفاده و ضایعات تولید می‌شود (Anonymous, 2005). عصاره تمام قسمت‌های این میوه به گواه تحقیقات انجام شده خواص درمانی دارد، برای مثال فشار سیستولیک خونی را کاهش می‌دهد (Aviram and Dornfeld, 2001) و در درمان زخم استفاده می‌شود(Batta and Rangaswami, 1973). فعالیت آنتی‌اکسیدانی انار سه برابر قوی‌تر از شراب قرمز و برابر با عصارهٔ چای سبز است (Aviram et al., 2004). ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پوست انار با ترکیبات فنولیک و آلکالوئیدی شامل پله‌تیرین[1] و تانن‌های قابل هیدرولیز از قبیل پونیکالین[2]، گالیک اسید[3]، الاژیک اسید[4] و آنتوسیانین مرتبط است (Noda et al., 2002). الاژیک اسید از مشتقات اسیدگالیک، یکی از ترکیبات موجود در پوست انار است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد (Seeram et al., 2006). ترکیبات ذکر شده، فعالیت قابل توجهٔ ضدمیکروبی نیز در برابر باکتری‌های بیماری‌زا نشان داده‌اند(Siri et al., 2008). Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۲)، اثر تغذیه با رژیم غذایی غنی از عصاره میوه کامل انار بر سفره ماهی *Paralichthys olivaceus* که به *dicentrarchi Philasterides* مبتلا شده بود، را بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که لکوسیت‌هایی مانند لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و شاخص‌های بیوشیمیایی خون مانند پروتئین کل، گلوکز و کلسیم همچنین فعالیت لیزوزیمی به‌صورت معنادار در گروه‌های تیمار، در هفته ۲ تا ٤ نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. Pai و همکاران (۲۰۱۱)، فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی و الکلی پوست انار را در برابر پاتوژن‌هایی از جمله *Vibrio*

1 Pelletierine
2 Punicalin
3 Gallic acid
4 Ellagic acid

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

Aeromonas hydrophila، *Salmonella Escherichia coli*، *cholera* و *Candida* بررسی کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که عصاره الکلی (اتانولی) تأثیر بیشتری در برابر پاتوژن‌های یاد شده دارد. Seeram و همکاران (۲۰۰۶) ترکیبات فنولیک موجود در انار را مسئول ویژگی ضدمیکروبی آن دانستند (Seeram et al., 2006).

با توجه به مطالعات انجام شده روی دیگر جانوران دربارهٔ اثرهای مثبت عصاره پوست انار بر تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی(Yamasaki et al., 2006)، مقاومت در برابر ویروس‌ها (Harikrishnan et al., 2012) و بهبود رشد(Shabtay et al ., 2008)، به نظر می‌رسد استفاده از محصولات فرعی حاصل از صنایع فراوری میوه انار در خوراک‌های آبزیان به‌دلیل غنی بودن از مواد پلی فنوله بتوانند در تولید انواع جیره‌های غذایی حاوی ترکیبات مؤثر دارویی گیاهی نقش مهمی ایفا کنند. در این صورت آبزیان تولید شده با این خوراک‌ها از نظر استانداردهای سلامت مصرف‌کننده از اهمیت بالایی برخوردار خواهند شد. بنابراین بررسی چگونگی استفاده از عصاره این گیاه در مقیاس آزمایشگاهی می‌تواند تجربه علمی و اطلاعات ارزشمندی را برای اجرای چنین برنامه غذایی، در مقیاس تجاری و در سطح کارگاه‌های پرورشی فراهم آورد. با توجه به موارد بیان شده اهداف این تحقیق عبارتند از: بررسی تأثیر استفاده از عصاره پوست انار در جیره غذایی ماهی کپور معمولی بر برخی فاکتورهای خونی، تعیین مقدار مناسب عصاره پوست انار در جیره غذایی کپور معمولی برای بهبود سلامت ماهی کپور معمولی و همچنین اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی نظیر لیزوزیم در ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با مکمل پوست انار در جیره.

مواد و روش‌ها

تأمین ماهیان انگشت قد

ماهیان انگشت قد کپور معمولی از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی کرسکان در استان اصفهان تهیه شد. این ماهیان به‌مدت ۱۵ روز با شرایط پرورشی سازگار و با جیرهٔ غذایی پایه تغذیه شدند. در این آزمایش از یک سیستم مدار بسته استفاده شد. در پایان دوره سازگاری، ماهیان سالم (از نظر ظاهری) با میانگین وزنی (۱/۸۱±۱۱/۷۳) گرم برای آزمایش انتخاب شدند. توزیع بچه ماهی در بین تیمارهای آزمایشی به‌نحوی انجام شد که اختلاف معناداری از لحاظ وزن بین آنها وجود نداشت. تعداد ۱۱ عدد ماهی در هر واحد نگهداری و طول دوره آزمایش ۷۵ روز بود. در طول دوره آزمایش شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب از جمله دمای آب در دامنه ۲۴–۲۸ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول در دامنه ۵/۵–۶/۹ ppm، pH در بازه ۸/۳–۶/۷ و غلظت آمونیاک سیستم در محدوده کمتر از ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر بود. در این آزمایش تانک‌های پرورشی هر یک به حجم ۱۰۰ لیتر با ورودی و خروجی مجزا، ۱۰ درصد تعویض آب روزانه و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی بود. غذادهی به میزان ۳/۵ درصد وزن تودهٔ زندهٔ هر تانک به‌صورت دو وعدهٔ یکسان در ساعت‌های ۸ صبح و ۱۶ در بین تیمارها توزیع گردید (Biswas et al., 2006). در روزهای ۱۵ و ۳۰ و ۴۵ و ۶۰ دوره آزمایش، زیست توده کل (وزن حجمی)[5] ماهیان در هر تانک به‌دست آمد و مقدار غذای مورد نیاز هر واحد با توجه به میانگین وزنی جدید تعیین شد.

5 Bulk Weighing

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

تهیه عصاره انار

میوه انار از شهرستان شهرضا واقع در استان اصفهان تهیه شد و پس از شست‌وشو، پوست میوه جداسازی و در سایه خشک و سپس پودر شده و تا زمان استفاده در ۲۰°C- نگهداری شد. صد گرم از پودر پوست میوه در فلاسک ۲ لیتری استریل با ۱ لیتر اتانول ۹۸ درصد مخلوط و سر فلاسک با فویل آلومینیومی پوشش داده و به‌مدت ۷ روز در دمای اتاق نگهداری شد. عصاره با پارچهٔ نازک و استریل فیلتر و حلال با استفاده از یک دستگاه تبخیر در خلأ چرخشی[6] مدل No. SSI/62 تغلیظ شد. (Harikrishnan et al., 2005). اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره انار طبق روش Folin-Denis (۱۹۹۰) با معرف فولین سیوکالتو۷ و اسپکتروفوتومتر انجام شد (AOAC[8], 1990). مقدار ترکیبات فنولیک کل براساس میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم نمونه غذای خشک و با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم معادل منحنی کالیبراسیون گالیک اسید در گرم نمونه بیان گردید (Gil and Tomas, 2000). مقدار فنل کل حاصل از عصارهٔ پوسته انار ۱۰/۲۳ (میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم پوسته خشک انار) به‌دست آمد.

آماده‌سازی جیره غذایی

جیرهٔ پایه مورد استفاده بر حسب درصد شامل: آردماهی(۴۱)، آرد ذرت (۲۰)، آرد گندم (۲۰)، سبوس برنج (۷)، ملاس چغندر (۹)، مکمل ویتامینه (۱/۵)، مکمل معدنی (۱/۵) بود که پس از مخلوط و اضافه کردن عصاره پوست انار حل شده در الکل (به میزان صفر، ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم غذا) با استفاده از دستگاه پلت زن آزمایشگاهی به پلت با قطر ۲/۵ میلی‌متر تبدیل شد. پلت‌ها پس از خشک شدن، تا زمان مصرف در پوشش‌های پلاستیکی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در ابتدا و انتهای دوره آزمایش، ماهیان به‌صورت انفرادی زیست‌سنجی شدند. طول کل بدن با دقت ۰/۱ سانتی‌متر و وزن هر ماهی با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری گردید. درصد رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی خوراک با استفاده از روش استاندارد اندازه‌گیری شد (AOAC, 2002). ترکیب شیمیایی غذای مورد استفادهٔ بچه ماهی کپور معمولی (میانگین ± انحراف معیار) به‌صورت درصد وزن خشک برابر: رطوبت (۰/۲۱ ± ۱۰/۰۲)، خاکستر (۰/۹۱ ± ۹/۱ ۰)، پروتئین (۱/۰۱ ± ۳۵/۰۱)، چربی (۰/۳۱ ± ۸/۲) بود.

اندازه‌گیری شاخص‌های خونی

در انتهای دوره آزمایش تعداد ۵ عدد ماهی به‌صورت تصادفی از هر واحد آزمایشی برداشت و خون‌گیری به‌عمل آمد (یک روز پیش از خون‌گیری غذادهی قطع شد). خون‌گیری پس از بیهوشی ماهی با محلول صد میلی‌گرم بر لیتر پودر گل میخک (Alishahi et al., 2013)، از سیاهرگ ساقهٔ دمی (Caudal vein) انجام شد (Hrubec and Smith, 2010). حدود ۰/۵ میلی‌لیتر خون از ساقه دمی با سرنگ ۲ سی‌سی گرفته شد. مقداری از خون در لوله‌های بدون هپارین و مقداری مشابه در لوله‌های حاوی هپارین ریخته و در دمای ۴°c نگهداری شد. برای اندازه‌گیری هماتوکریت (درصد) و غلظت هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر یا g/dl) نمونه‌های خون در تیوب‌های حاوی EDTA[9] (به‌عنوان مادهٔ ضد انعقاد ۵ درصد) جمع‌آوری و آنالیزها به‌سرعت انجام شد. Hct با استفاده از لوله‌های موئینه میکروهماتوکریت[10]،

6 Rotary vacuum evaporator
7 Folin-Ciocalteu
8 Association of Analytical chemists

9 Ethylene Diamine Tetra acetic Acid
10 Microhematocrits

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

جداسازی سرم با دستگاه سانتریفیوژ مدل Hettich 210 (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت پنج دقیقه) و خط‌کش مخصوص هماتوکریت تعیین گردید (Ameri Mahabadi, 2009). اندازه‌گیری غلظت Hb با استفاده از روش سیانومت هموگلوبین[11] در طول موج ۵۴۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Ameri Mahabadi, 2009)، برای شمارش گلبول‌های قرمز خون (RBC) با استفاده از لام نئوبار هموسایتومتر[12] و شاخص‌های گلبولی شامل حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین (MCH) و غلظت هموگلوبین گلبولی(MCHC) با استفاده از روابط استاندارد محاسبه شد (Rodak et al., 2007). برای شمارش گلبول‌های سفید (WBCs) با استفاده از روش توصیه شدهٔ Blaxhall و Daisley و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید[13](Diff) پس از تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی آنها با گیمسا انجام گردید و درصد هر یک از انواع گلبول‌های سفید به تفکیک ارائه شد (Blaxhall and Daisley, 1973).

آنالیزهای بیوشیمیایی سرم خون

نمونه‌های خون پس از جمع‌آوری در میکروتیوپ فاقد ماده ضد انعقاد به‌مدت ۲ ساعت در یخچال نگهداری (Ghiasi et al., 2015) و سپس با استفاده از سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه)، سرم جدا شد. شاخص‌های بیوشیمیایی سرم شامل: گلوتامیک پیرورویک ترانس آمیناز(GPT)، گلوتامیک اگزالواستیک ترانس آمیناز(GOT)، گلوکز(Glu)، آلبومین(Alb)، گلوبولین(Glb)، آلکالین فسفاتاز(ALK)، لاکتات دهیدروژناز(LDH) (Thomas, 1998)، کلسترول(CHOL)، تری‌گلیسرید(TG)، لیپوپروتئین چگالی بالا(HDL) و لیپوپروتئین چگالی پایین(LDL)(Rifai et al., 1999) و پروتئین تام TP (Koller, 1984) بودند که به روش‌های استاندارد و با دستگاه اتوآنالیزر مدل Hitachi 911 انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت لیزوزیمی در سرم خون

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیزوزیم به‌عنوان یکی از شاخص‌های ایمنی ذاتی با استفاده از سرم خون طبق روش Parry و همکاران ۱۹۶۵ و با روش کدورت‌سنجی اندازه‌گیری گردید. بدین منظور ۲۵ µl از نمونه سرم به هر یک از خانه‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای انتقال داده شد. ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزوداکتیلوس *Micrococcus lysodiekticus* (mg/ml) (Sigma)۰/۷۵) در بافر سیترات-فسفات (۰/۱ مولار، pH=۵/۸) به خانه‌ها اضافه گردید. میزان کاهش جذب نوری نمونه‌ها تا زمان ۱۵ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. میزان لیزوزیم موجود در هر نمونه سرم با استفاده از منحنی استاندارد لیزوزیم سفیده تخم سیگما محاسبه گردید.

آنالیزهای آماری

هر تانک به‌عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و داده‌های آماری به‌صورت میانگین± خطای استاندارد گزارش شد. در این مطالعه تمام محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 15 و Microsoft Office Excel انجام گرفت. طبیعی بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnove بررسی شد. برای مقایسه بین تیمارها و نیز وجود اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح احتمال ۹۵ درصد ($p<0/05$) از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه بین میانگین تیمارها استفاده شد.

11 Cyanmethemoglobin
12 Neubauer hemocytometer
13 White Blood Cell Differential

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

نتایج

شاخص‌های خونی

شاخص‌های Hb، RBC و Hct پس از ده هفته در تیمارهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم عصاره به‌صورت معناداری در مقایسه با گروه شاهد و تیمار ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم افزایش نشان داد ($p<0/05$). بالاترین مقادیر Hb، RBC و Hct در تیمار ۶۰۰ میلی‌گرم عصاره به‌ترتیب ۰/۹۵±۷/۷۰، ۰/۰۲±۱/۷۹ و ۳/۲۱±۲۳/۰۰ بود. در حالی‌که دیگر شاخص‌های خونی شامل MCV، MCHC، MCH و WBC نسبت به گروه شاهد تفاوت معناداری نشان نداد (جدول ۱). با توجه به داده‌های جدول ۲، در شمارش افتراقی گلبول سفید، تعداد لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و نوتروفیل تفاوت معناداری وجود نداشت و با افزایش میزان عصاره پوست انار، میزان مونوسیت‌ها به استثنای تیمار ۶۰۰ میلی‌گرم روند افزایشی نشان داد.

جدول ۱ شاخص‌های خونی بچه ماهیان کپور معمولی (خطای استاندارد± میانگین).

شاخص‌ها / تیمار	شاهد(صفر)	(mg/Kg) ۵۰	(mg/Kg) ۱۵۰	(mg/Kg) ۳۰۰	(mg/Kg) ۶۰۰
Hb(g/dl)	۳/۸۳±۱/۰۹ b	۳/۰۶±۰/۳۱ b	۳/۱۳±۰/۴۳ b	۷/۴۳±۰/۴۴ a	۷/۷۰±۰/۹۵ a
HCT%	۱۳±۳/۲۱ b	۱۰±۱/۰۰ b	۱۰±۲/۰۸ b	۲۲/۳۳±۱/۳۳ a	۲۳/۰۰±۳/۲۱ a
RBC($\times 10^6$ /µ L)	۱/۰۰±۰/۰۲ b	۱/۱۱±۰/۱۰ b	۱/۱۳±۰/۰۷ b	۱/۵۳±۰/۱۸ a	۱/۷۹±۰/۰۲ a
WBC (/ µ L)	۲۲۸۴۱/۶۶±۲۶۳/۸۳ a	۲۳۲۹۵ /۶۶±۴۰۳/۱۸ a	۲۳۳۰۳/۶۶±۳۳۵/۳۲ a	۲۳۶۴۸±۴۱۸/۹۸ a	۲۳۷۵۷±۶۱۹/۰۸ a
MCHC(g dl^{-1})	۲۹/۲۷±۲/۱۳ a	۳۰/۶۴±۰/۳۳ a	۳۲/۲۷±۲/۵۴ a	۳۳/۲۸±۰/۵۵ a	۳۳/۶۱±۰/۶۲ a
MCH (pg)	۳۷/۶۳±۱۱/۶۱ a	۲۸/۴۲±۵/۷۲ a	۲۸/۱۸±۵/۶۸ a	۴۹/۱۱±۳/۵۱ a	۴۲/۶۸±۴/۶۵ a
MCV (fl)	۱۲۸/۰۱±۳۵/۰۵ a	۹۲/۵۹±۱۸/۲۳ a	۹۰/۳۲±۲۴/۱۱ a	۱۴۳/۴۷±۸/۲۴ a	۱۲۷/۴۷±۱۵/۹۶ a

حروف مشابه در هر ردیف نشان‌دهندهٔ نبود اختلاف معنادار است ($p>0/05$).

جدول ۲ شمارش افتراقی گلبول‌های سفید ماهی کپور معمولی(خطای استاندارد±میانگین).

میلی‌گرم عصاره بر هرکیلوگرم جیره	درصد لنفوسیت	درصد نوتروفیل (هتروفیل)	درصد مونوسیت
شاهد (صفر)	۷۸/۲۲± ۲/۶۹	۱۶/۹۳± ۱/۴۵	۴/۵۱± ۰/۹۴
تیمار ۵۰	۷۳/۲۹± ۱/۷۶	۲۱/۷۳± ۱/۶۱	۵/۲۷± ۰/۹۵
تیمار ۱۵۰	۷۲/۷۱± ۱/۸۹	۲۱/۲۸ ±۱/۰۷	۶/۳۱± ۰/۳۴
تیمار ۳۰۰	۷۲/۰۷± ۱/۵۶	۲۱/۱۴ ±۱/۳۹	۶/۵۴± ۰/۱۷
تیمار ۶۰۰	۷۴/۴۷± ۳/۰۸	۲۰/۴۴ ±۱/۳۳	۵/۵۴±۱/۴۸

شاخص‌های بیوشیمیایی سرم

نتایج به‌دست آمده برای شاخص‌های بیوشیمیایی خون (CHO، HDL، GLU، LDL، LDH، SGOT، SGPT، ALK و TG) در پایان دوره آزمایش تفاوت معناداری را بین تیمارهای آزمایشی نشان نداد (جدول ۳). اما در میزان پروتئین کل در تیمارهای حاوی ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست انار نسبت به تیمار شاهد تفاوت معناداری مشاهده شد ($p<0/05$).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

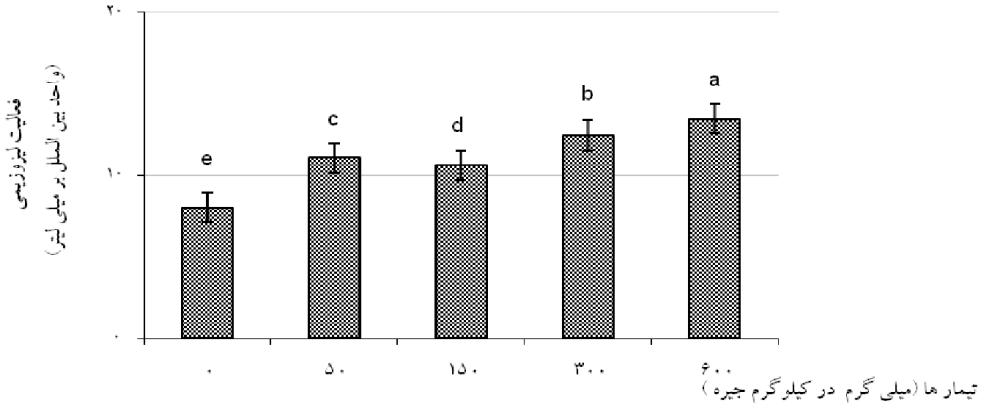
جدول ۳ شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون بچه ماهیان کپور معمولی (خطای استاندارد±میانگین).

تیمار / شاخص‌ها	شاهد(صفر)	۵۰ (mg/Kg)	۱۵۰ (mg/Kg)	۳۰۰ (mg/Kg)	۶۰۰ (mg/Kg)
Glu (mg/dl)	۷۱/ ۵۹±۱۴/۳۶ a	۶۹/۲۵±۷/۲۸ a	۷۲/۵۰±۶/۰۸ a	۹۱/۵۰±۶/۶۷ a	۱۰۴/۲۵±۱۲/۸۱ a
TG (mg/dl)	۱۸۲/۶۶±۳۶/۳۷ a	۱۵۴±۳۰/۰۲ a	۱۸۵/۰ ±۱۲/۴۸ a	۱۸۹±۳/۵۱ a	۱۶۲/۶۶±۸/۵۶ a
CHOL (mg/dl)	۱۲۱/۶۶±۱۶/۱۷ a	۱۱۲/۶۶±۲۲/۰۷ a	۱۳۰/۳۳±۹/۳۳ a	۱۲۱±۱۳/۸۹ a	۱۳۰±۱۷/۲۴ a
HDL (mg/dl)	۶۷/۶۶±۴/۴۰ a	۶۷/۶۶±۷/۲۱ a	۶۲/۳۳±۷/۸۳ a	۶۹±۵/۲۹ a	۷۲±۶/۰۲ a
LDL (mg/dl)	۲۹/۳۳±۶/۶۴ a	۲۸/۶۶±۱۰/۶۸ a	۳۴±۴ a	۳۱±۵/۸۵ a	۳۲±۷/۵۰ a
HDL / LDL	۲/۵۰ ±۰/۴۵ a	۲/۸۰ ±۰/۶۱ a	۱/۸۳ ±۰/۱۵ a	۲/۳۵ ±۰/۳۴ a	۲/۳۹ ±۰/۳۰ a
S.G.O.T (U/L)	۱۴۰/۳۳±۱۶/۵۷ a	۱۴۷/۶۶±۲۲/۲۲ a	۱۱۹/۳۳±۳۲/۹۴ a	۱۳۰/۶۶±۲۰/۹۸ a	۱۴۶±۱۲/۵۸ a
S.G.P.T (U/L)	۴۸/۳۳±۱۱/۵۶ a	۶۲±۱۸/۴۷ a	۳۸/۳۳±۷/۷۵ a	۲۴/۳۳±۳/۲۸ a	۲۱/۶۶±۵/۴۸ a
ALK (U/L)	۱۷۹/۶۶±۶۹/۳۷ a	۱۷۲/۳۳±۱۰/۷۲ a	۱۸۱/۳۳±۵۷/۶۲ a	۱۶۲/۰۰±۴۱/۱۹ a	۱۸۱/۳۳±۶۷/۱۱ a
TP (g/dl)	۳/۰۶±۰/۲۶ b	۳±۰/۲۵ b	۴/۰۶±۰/۱۲ a	۳/۸۶±۰/۶۶ a	۳/۶۶±۰/۱۶ a
Alb (g/dl)	۱/۰۶±۰/۰۸ a	۱/۱±۰/۱۵ a	۱/۵۸±۰/۰۱ a	۱/۳۳±۰/۲۰ a	۱/۴۰±۰/۰۵ a
Glob (g/dl)	۲/۰۰±۰/۱۹ a	۱/۹۰±۰/۱۱ a	۲/۴۸±۰/۱۱ a	۲/۵۳±۰/۱۶ a	۲/۲۶±۰/۱۷ a
LDH (U/L)	۱۱۰۹±۲۱۴/۵۵ a	۹۹۳±۲۴۱/۱۳ a	۱۱۵۲/۳۳±۳۰۹/۷۶a	۹۰۱/۶۶±۱۷۳/۹۴a	۸۶۵±۷۵/۰۲ a

حروف مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده نبود اختلاف معنادار است (p>۰/۰۵).

فعالیت لیزوزیمی

مقادیر فعالیت لیزوزیمی در تمامی تیمارهای حاوی عصاره الکلی پوست انار نسبت به گروه شاهد تفاوت معنادار نشان داد (p<۰/۰۵). بالاترین مقدار فعالیت لیزوزیمی در تیمار ۶۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست انار ۰/۹۸۸± ۱۳/۴۹۷ میلی‌متر به‌دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱ فعالیت لیزوزیمی ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره پوست انار (میانگین ± خطای استاندارد).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

بحث

افزایش معنادار RBC، Hb و Hct در تیمارهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست انار بر کیلوگرم جیره نشان‌دهندهٔ تأثیر مثبت عصارهٔ پوست انار بر شاخص‌های خونی در ماهی کپور است که احتمالاً می‌تواند ناشی از دسترسی به آهن مورد نیاز بدن به‌دلیل ترکیبات موجود در پوست انار، یا اثر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پوست انار بر کاهش همولیز پراکسیداسیون چربی‌های موجود در غشای گلبول‌های قرمز خون و یا اثر حفاظتی پلی‌فنول‌ها در برابر پراکسید هیدروژن ناشی از اکسیداسیون در گلبول‌های قرمز باشد (Lanping et al.,2000). پلی‌فنول‌های موجود در ترکیبات گیاهی می‌توانند با فلزات و یون‌های فلزی مانند آهن، کمپلکس‌هایی تشکیل دهند و این پتانسیل را دارند که در واکنش‌های فیزیولوژیکی مربوط به آهن و دیگر فلزات واسطه دخل و تصرف کنند. بنابراین این احتمال وجود دارد که دسترسی به آهن مورد نیاز بدن را تسهیل کنند (Satyakeerthy, 1999). با توجه به در نظر گرفتن اثرهای آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنول‌ها بر سطح غشای گلبول‌ها، این مواد می‌توانند یک مانع فیزیکی در برابر رادیکال‌های آزاد محلول فراهم کنند (Lanping et al.,2000). بنابراین دلیل احتمالی افزایش گلبول‌های قرمز همراه با افزایش میزان عصاره پوست انار در جیره قابل توجیه است. نتایج تحقیق حاضر دربارهٔ افزایش گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت با مصرف جیره حاوی عصاره انار با یافته‌های Abd-Zaher و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی تأثیر گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum*) بر فاکتورهای خونی ماهی تیلاپیای نیل، مطابقت دارد(Abd-Zaher et al., 2009). در تحقیق حاضر اعداد به‌دست آمده برای تعداد گلبول‌های قرمز خون نزدیک به محدوده مناسب برای کپور ماهیان (۱/۶۹ –۱/۹۱ ×10 ^{6} /µ L) است (Tripathi et al., 2004). همچنین هیچ‌گونه تغییر شکل و اندازه غیرعادی که ناشی از دوز سمی پلی‌فنول‌ها باشد نیز در سلول‌های خونی مشاهده نشد. اگرچه تعداد گلبول قرمز و هماتوکریت به‌طور معناداری در تیمارهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم عصاره انار نسبت به سایر تیمارها افزایش نشان داد، با این حال مقدار MCV در تیمارهای مختلف اختلاف معنادار نشان نداد. این در حالی است که مقدار عددی MCV در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم بیشتر از سایر تیمارها بود. Gallaugher و همکاران (۱۹۹۲)، گزارش کردند افزایش MCV و کاهش MCHC نشان‌دهندهٔ تورم گلبول‌های قرمز است (Gallaugher et al., 1992). در تحقیق حاضر میزان MCHC و MCH فاقد تفاوت معنادار در سطح ۹۵ درصد در بین تیمارها بود. بر این اساس، تغییرات هموگلوبین در مطالعه حاضر احتمالاً نمی‌تواند ناشی از تورم گلبول‌های قرمز باشد (Wepener et al., 1992). در تحقیق Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۲)، میوه کامل انار موجب افزایش گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCH و MCHC به‌طور معناداری پس از ٤ هفته در ماهی پهن (*Paralichthys olivace*) شد (Harikrishnan et al., 2012).

ایجاد عفونت یا استرس در بدن به تغییر تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC)(Pickering and Pottinger, 1987) یا سرکوب فعالیت‌های آن منجر می‌شود (Ellsaesser and Clem, 1986). بررسی تغییر تعداد گلبول‌های سفید حاکی از نبود اختلاف معنادار بین تیمارهای مورد مطالعه در این تحقیق است؛ البته تعداد گلبول‌های سفید در مطالعه حاضر در محدوده مناسب برای کپور ماهیان ۱۹۹۰۰–۲۸۱۰۰ در µL بود (Tripathi و همکاران ۲۰۰٤). Harikrishnan و همکاران ۲۰۱۰ گزارش دادند که سلول‌های سفید خون (WBC) در ماهی گلدفیش

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

که با رژیم غذایی حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا از مخلوط عصاره‌های گیاهی تغذیه شده است، به‌طور قابل‌توجهی نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد (Harikrishnan et al., 2010) ($p<۰/۰۵$). اختلاف بین نتایج احتمالاً می‌تواند ناشی از تفاوت گونه ماهی، عصاره مصرفی و طول دوره آزمایش باشد. Kumar و همکاران ۲۰۰۷ نشان دادند که افزایش تعداد گلبول‌های سفید بخشی از دفاع سیستم ایمنی ماهی است، ولی همیشه میزان محافظت ماهی در برابر عوامل عفونی با تعداد لکوسیت‌های ماهی ارتباط مستقیم ندارد(Kumar et al., 2007). تغییر تعداد گلبول‌های سفید از حساس‌ترین علائم وقوع استرس هستند و عموماً استرس به کاهش تعداد لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها و همچنین افزایش تعداد نوتروفیل‌ها منجر می‌شود (Mashayi, 2000). Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۲) افزایش معناداری در تعداد لکوسیت‌هایی مانند لنفوسیت‌ها، مونوسیت و نوتروفیل‌ها طی ٤ هفته در ماهیان پهن ژاپنی مبتلا شده به *Philasterides dicentrarchi* و تغذیه شده با غذای حاوی عصاره میوه کامل انار در مقایسه با گروه شاهد را مشاهده کردند (Harikrishnan et al., 2012). این تفاوت در نتایج احتمالاً ممکن است به‌دلیل تفاوت در نحوهٔ طراحی آزمایش و در نوع عصاره و ماهی باشد. شاید علت اصلی عدم تغییر در تعداد و نسبت لوکوسیت‌ها در آزمایش حاضر این است که ماهیان در طی آزمایش با هیچ عامل استرس‌زا، انگلی و یا عفونت‌زا مواجه نشده‌اند.

فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی ممکن است تحت شرایط غذایی، محیطی یا حضور عوامل تنش‌زا تغییر کند (Barcellos et al., 2004). در تحقیق حاضر مطابق نظر Kopp و همکاران (۲۰۱۱) تفاوت‌های اندک و غیرمعنادار در میان شاخص‌های بیوشیمیایی یک جمعیت ماهی، طبیعی در نظر گرفته شده است (Kopp et al., 2011). داده‌های جدول ۳ نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنادار صرفاً در پروتئین کل سرم خون بچه ماهیان کپور در تیمارهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست انار بر کیلوگرم جیره با سایر تیمارها است و تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره بالاترین مقدار پروتئین کل (۰/۱۲±٤/۰٦) را نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$). پروتئین‌های پلاسما به‌وسیلهٔ کبد سنتز و در بسیاری از بیماری‌ها و اختلالات فیزیولوژیک از بدن دفع می‌شوند. اندازه‌گیری پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در سرم یا پلاسما در تشخیص بیماری‌های ماهی به‌عنوان شاخصی برای وضعیت تغذیه‌ای و همچنین سیستم عروق، عملکرد کبد و کلیه کاربرد دارد (Abdel-Tawwab et al., 2008). تحقیقات موجود نشان می‌دهد که افزایش سطوح پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در سرم خون ماهیان موجب تقویت سیستم ایمنی ذاتی و افزایش سطح ایمنوگلوبولین می‌شود (Hussein, 1996)، علاوه بر این بهبود عملکرد کبد و سایر ارگان‌های بدن که سنتز اجزای پلاسما را به عهده دارند نیز به افزایش سطح پروتئین سرم خون منجر می‌شود (Metwally, 2009). مقدار آلبومین و گلوبولین در هیچ تیماری تفاوت معنادار در سطح ۹۵ درصد نشان نداد، اما روند افزایشی را با افزایش دوز عصاره نشان داد. Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که پروتئین کل در ماهی (*P. olivaceus*) تحت تیمار با عصاره میوه کامل انار در هفته ۲ تا ٤ در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری داشت (Harikrishnan et al., 2012). به نظر می‌رسد تأثیر مثبت عصاره پوست انار بر پروتئین کل احتمالاً ناشی از تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی و به دنبال آن بهبود عملکرد کبد و سایر ارگان‌های بدن، که سنتز اجزای پلاسما را به عهده دارند، باشد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

در تحقیق حاضر کلسترول، لیپوپروتئین چگالی بالا، تری‌گلیسرید و لیپوپروتئین چگالی پایین فاقد تفاوت معنادار در بین تیمارها بود، ولی در محدوده مقادیر مناسب (مقادیر مشخص شدهٔ کلسترول در طیف فیزیولوژیکی مناسب برای کپور ماهیان ٦٥- ٢٦٤ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و مقدار تری‌گلیسیرید در محدوده مناسب ٦٨-٢٠٠ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) هستند (Nicula et al., 2010). Harikrishnan و همکاران ۲۰۱۲ نشان دادند که تغذیه ماهی کفشک ژاپنی *Paralichythys olivaceus* با غذای حاوی عصاره میوه کامل انار پس از ٤ هفته موجب افزایش معنادار کلسترول می‌شود ($p<۰/۰۵$) (Harikrishnan et al., 2012). این تفاوت در نتایج احتمالاً می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع مواد مؤثره عصاره‌ها (تانن‌های موجود در پوست انار ممکن است بر اکسیداسیون چربی‌های موجود در خون ماهی کپور تأثیری نداشته باشد، اما دربارهٔ برخی ترکیبات گیاهی مانند سیر، ترکیبات سولفوری بر اکسیداسیون چربی‌ها تأثیر دارد(Metwally, 2009))، طول دوره و شرایط سنی ماهی مربوط باشد. میزان ALT و LDH تفاوت معناداری در هیچ یک از تیمارها نشان نداد، اما با افزایش سطح عصاره در تیمارهای ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست انار این آنزیم‌ها روند کاهشی داشت که با توجه به کارکرد این دو آنزیم، کاهش مشاهده شده احتمالاً می‌تواند نشان‌دهندهٔ تأثیر مثبت عصاره پوست انار بر عملکرد قلب باشد. Ibrahium در سال ۲۰۱۰ بیان کرد که تغذیه موش با عصاره پوست انار در سطح ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن می‌تواند سطح AST، ALK و ALT را پس از ۸ هفته کاهش دهد. این یافته‌ها نشان می‌دهد برخی ترکیبات گیاهی ممکن است در غشای سلولی تثبیت شود و از سلول‌های کبد در برابر عوامل مخرب و آسیب رادیکال آزاد محافظت کند. نتایج تحقیق Ibrahium منطبق با یافته‌های تحقیق حاضر نیست؛ البته این تفاوت احتمالاً می‌تواند نشان‌دهندهٔ عدم تأثیر عصاره پوست انار و ترکیبات موجود در آن بر آنزیم‌های کبدی ماهی کپور باشد (Ibrahium, 2010).

سطح گلوکز در تحقیق حاضر در هیچ تیماری تفاوت معنادار با سایر تیمارها نداشت و در محدوده ٦٩/٢٥- ١٠٤/٢٥ بود، ولی در تیمارهای ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست انار روند صعودی داشت که این افزایش با توجه به اینکه خون‌گیری از ماهیان ٢٤ ساعت پس از قطع غذادهی انجام شده است، احتمالاً می‌تواند با عمل تأخیر در هضم و جذب گلوکز توسط پلی‌فنول‌ها، یا تأثیر قندها و پلی‌فنول‌های موجود در پوست انار بر تغییر در سوخت‌وساز و افزایش سطح قند مرتبط باشد (Torronen et al., 2009).

فعالیت آنزیم لیزوزیم در تمامی تیمارهای حاوی عصاره الکلی پوست انار نسبت به گروه شاهد تفاوت معنادار نشان داد ($p<۰/۰۵$). بالاترین مقدار فعالیت لیزوزیم در تیمار ٦۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست انار ۰/۹۸۸± ١٣/٤٩٧ میلی‌متر به دست آمد (شکل ۱). Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که فعالیت لیزوزیم سرم در ماهی *P. olivaceus* تحت تیمار با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا از مخلوط عصاره‌های میوه انار *Dalmatian chrysanthemum* *Chrysanthemum cinerariaefolium* و *Zanthoxylum schinifolium* در هفته‌های ۱ تا ٤ به‌طور معناداری افزایش یافته است (Harikrishnan et al., 2012). افزایش پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین به مقدار زیاد بازتابی از تقویت سیستم ایمنی است. نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهندهٔ افزایش پروتئین کل در برخی تیمارها است که با نتایج حاصل از فعالیت لیزوزیمی مطابقت دارد. این نتایج نشان می‌دهند عصاره پوست انار موجب تحریک و تقویت سیستم ایمنی بچه ماهیان کپور معمولی شده است.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

با توجه به نتایج شاخص‌های خونی و فعالیت لیزوزیمی و با بررسی کلی داده‌ها به نظر می‌رسد تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست انار بر هر کیلوگرم غذا نسبت به سایر تیمارها دارای عملکرد بهتری از نظر تقویت سیستم ایمنی است. این تیمار از نظر هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد گلبول قرمز، پروتئین کل و فعالیت لیزوزیمی افزایش معناداری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد. اگرچه تیمار ۶۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست انار بر کیلوگرم غذا نیز از شرایط مناسبی برخوردار بود، اما با توجه به سطوح بالاتر شاخص پروتئین کل در این تیمار و همچنین دُز پایین‌تر عصاره، می‌توان نتیجه گرفت که تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره پوست انار مناسب‌ترین تیمار برای فاکتورهای خونی و سیستم ایمنی بدن است. بنابراین مطالعات گسترده‌تر برای آگاهی بیشتر از توانایی‌های انار به‌عنوان یک محرک گیاهی برای تقویت سیستم ایمنی با توجه به گونه‌های ماهی توصیه می‌شود.

منابع

Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A. M. and Ismael, N. E. M. 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280: 185-189.

Abd-Zaher A., Mostafa, M., Hassan-Ahmad, M., Mousallamy, A. and Samir, A. 2009. Effect of using dried fenugreek seeds as natural feed additives on growth performance, feed utilization, whole-body composition and entropathogenic *Aeromonas hydrophila*-challing of monsex nile tilapia *O. niloticus* (L) fingerlings. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3:1234–1245.

Alishahi, M., Cheshmeh, B., M., Peyghan, R., Ghorbanpour, M., and mohammadian, T., 2013. The effect anesthesia with MS222, clove oil and phenoxy ethanol on some immune indexes in common carp *(Cyprinus carpio)*. *Journal of Wetland Ecobiology*, 5(18):23-32. (In persian)

Alishahi, M., Mesbah, M., namjooian, F., sabzevari , M. and Jalali, M. 2012. Comparison of effect of oral administration of some Immunostimulant and herbal extract on hematological parameters of *Astronorus ocellatus*. *Iranian Veterinary Journal*. 8(2):58.(In persian)

Aly, S. M., Atti, N. M. A. and Mohamed, M. F. 2008. Effect of garlic on the survival, growth, resistance and quality of *Oreochromis niloticus*. In 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture.

Ameri Mahabadi, M. 2009. Laboratory methods of Veterinary Hematology. Institute of Tehran University Publishing printing, 126p. (In persian)

Anonymous, E. 2005. The Wealth of India: A dictionary of Indian raw materials and industrial products. New Delhi: *CSIR Publication*, 317p.

AOAC. 2002. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 17th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, 1114.

AOAC. 1990. Tannin. ln: Official Methods of Analysis of the Assotciation Offical Arulytical Chenists' 15th ed.: Association of Official Analytical Chemiss' Washington' D' C'.

Aviram, M. and Dornfeld, L. 2001. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*, 158:195-198.

Aviram, M., Rosenblat, M. and Gaitini, D. 2004. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure, and LDL oxidation. *Clinical Nutrition,* 23:423-433.

Barcellos, L. J. G., Kreutz, L. C., Souza, C., Rodriguez, L. B., Fioreze, I., Quevedo, R. M., Cericato, L., Soso, A. B., Fagundes, M., Conrad, J., Lacerda, L. A. and Terra, S. 2004. Haematological changes in Jundia (*Rhamdia quelen*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture,* 237: 229-236.

Batta, A. K. and Rangaswami, S. 1973. Crystalline chemical components of some vegetable drugs. *Phytochemistry,* 12:214-216.

Biswas, G., Jena, J. K., Singh, S. K., Patmajhi, P. and Muduli, H. K. 2006. Effect of feeding

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

Philasterides dicentrarchi infection. *Journal of Aquatic Animal Health,* 22:235–243.

Hrubec, T. C. and Smith, S. A. 2010. Hematology of fishes. 944-1003p, In: Weiss, D. A. and K. J., Wardop (Sixth eds), *Veterionary Hematology*, Wiley-Blackwell, USA, 1206.

Hussein, S. A. 1996. Electrophoretic pattern of serum protein and immunoglobulin level in chickens in relation of age. *faculty* of *veterinary medicine Benha* University Egypt, 7: 95-107.

Ibrahium, M. I. 2010. Efficiency of pomegranate peel extract as antimicrobial, antioxidant and protective agents. *World Journal of Agricultural Sciences,* 6 (4): 338-344.

Kay, C. D. and Holub, B. J. 2002. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *British Journal of Nutrition,* 88: 389–398.

Koller, A. 1984. Total serum protein. in: Kaplan, L. A. and Pesce, A. J., (eds).Clin Chem, theory, analysis and correlation. St. Louis: Mosby Company, 1316-1319.

Kopp, R., Mares, J., Palikova, M., Navratil, S., Kubicek, Z., Zikova, A., Hlavkova, J. and Blaha, L. 2009. Biochemical parameters of blood plasma and content of microcystins in tissues of common carp *(Cyprinus carpio* L.) from a hypertrophic pond with cyanobacterial water bloom. *Aquaculture Research,* 40: 1683-1693.

Kumar, J. A., Pal, A. K., Sahu, N. P., Kumar, S. and Mukherjee, S. C. 2007. Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA, γ-3 fatty acid and β- carotene in *Catla catla* juveniles. *Fish and Shellfish Immunology,* 23: 917-927.

Lanping, M. A., Zaiqun, L., Bo, Z., Li, Y. and Zhongli, L. 2000. Inhibition of free radical induced oxidative hemolysis of red blood cells by green tea polyphenols. *Chinese Science Bulletin,* 45- 22.

Mashayi, M. A. 2000. Physiology of fish in intensive culture systems. Assistance reproduction and aquaculture - General Directorate for Education and Promotion, 302p. (In persian)

Metwally, M. A. A. 2009. Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *World Journal of Fish and Marine Sciences,* 1 (1): 56-64.

frequency on growth, survival and feed utilization in mrigal, *Cirrhinus mrigala*, and rohu, *Labeo rohita*, during nursery rearing. *Aquaculture*, 254: 211 – 218.

Blaxhall, P. C. and Daisley, K. W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5: 771-781.

Castro, R., Lamas, J., Morais, P., Sanmartín, M. L., Orallo, F. and Leiro, J. 2008. Resveratrol modulates innate and inflammatory responses in fish leucocytes. *Veterinary Immunology & Immunopathology,* 32: 184-188.

Ellsaesser, C.F. and Clem, L.W. 1986. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *Journal of Fish Biology,* 28: 511–521.

Gallaugher, P., Axelsson, M. and Farrell, A. P. 1992. Swimming performance and haematological variables in splenectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology,* 171: 301-314.

Ghiasi, M. Aghajani, S. Binaii, M. Pourgholam, R. Amiri,B. 2015. Effect of aqueous extracts of *Hypericumperforatum* on hemato serological parameters and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) under thermal stress. *Scientific Research Journal*, 4(2):91-101.

Gil, M. and Tomas, B. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agriculture Food Chemistry,* 48: 4581- 4589.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Bhuvaneswari, R. 2005. Restorative effect of *Azadirachta indicab* aqueous leaf extract dip treatment on haematological parameter changes in *Cyprinus carpio* (L.) experimentally infected with *Aphanomyces invadans* fungus. *Journal of Applied Ichthyology,* 21: 410–413.

Harikrishnan, R., Kima, J., Kima, M., Balasundaramb, C. and Heoa, M. S. 2012. Pomegranate enriched diet enhances the hematology, innate immune response, and disease resistance in olive flounder against *Philasterides dicentrarchi*. *Veterinary Parasitology,* 187: 147-156.

Harikrishnan, R., Kim, M., Sangkim, J., Jaehan, Y. and Heoa, M. S. 2010. Effect of a mixed herb–enriched diet on the innate immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

the requirements for the degree of doctor of philosophy, India Cochin University of Science and Technology, 82p.

Seeram, N. P., Henning, S. M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z. and Heber, D. 2006. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *Journal of Nutrition,* 136:2481-2485.

Shabtay, A., Eitam, H., Tadmor, Y., Orlov, A., Meir, A., Weinberg, P., Weinberg, Z. G., Chen, Y., Brosh, A., Izhaki, I. and Kerem. Z. 2008. Nutritive and antioxidative potential of fresh and stored pomegranate industrial byproduct as a novel beef cattle feed. *Journal of Agriculture Food Chemistry,* 56 -21.

Siri, S., Somdung, W., Wadbua, P., Kitancharoen, K., Wongphathanakul, W. and Chantaranothai, P. 2008. Antibacterial and phytochemical studies of 20 thai medicinal plants against catfish-infectious bacteria *Aeromonas caviae*. The First International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Subregion, 93p.

Thomas, L. 1998. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 652p.

Torronen, R., Sarkkinen, E., Tapola, N., Hautaniemi, E., Kilpi, K. and Niskanen, L. 2009. Berries modify the postprandial plasma glucose response to sucrose in healthy subjects. *British Journal of Nutrition*; *EPUb Ahead of Print,* 103(8):1094-1097.

Tripathi, N. K., Latimer, K. S. and Burnley V. V. 2004. Hematological reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*) including blood cell morphology, cytochemistry, and ultrastructure. *Veterinary Clinical Pathology*, 33: 74 – 83.

Wepener, V., Van Vuren, J. H. J. and Du Preez, H. H. 1992. The effect of hexavalent chromium at different pH values on the haematology of *Tilapia sparmani* (Chichlidae). *Comparative Biochemistry and Physiology,* 101: 375–381.

Yamasaki, M., Kitagawa, T. and Koyanagi, N. 2006. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. *Nutrition,* 22: 54- 59.

Najafzadeh, H., Sane, N., Hemmati, A. and Avlapoor, S. 2010. The effect of pomegranate peel extract on streptozotocin-induced diabetes in mice. *Pharmaceutical Sciences*, 16 (4): 239-248. (Abstarct in English)

Nicula, M., Bura, M., Simiz, E., Banatean-Dunea, I., Patruica, S., Marcu, A., Lunca, M. and Szelei, Z. 2010. Researches concerning reference values assessment of serum biochemical parameters in some fish species from Acipenseridae, Cyprinidae, Esocidae and Salmonidae family. *Journal of Animal Science and Biotechnology,* 43(1): 498-505.

Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A. and Packer, A. 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidin: delphinidin, cyanidin and pelargonidin.", *Journal of Agriculture Food Chemistry,* 50: 166- 171.

Pai, V., Chanu, R., Chakraborty, R., Raju, B. and Ballal, M. 2011. Evaluation of the antimicrobial activity of *Punica granatum* peel against the enteric pathogens. *Asian Journal of Plant Science and Research,* 1(2): 57-62.

Parry, R. M., Chandan, C. R. and Shahani, K. M. 1965. A rapid and sensitive assay of muramidase.

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,119,1340–1342.23, quoted

by M.J and J.A., Roth J.A (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovin neutrophil

primary granules.*Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58: 239-248.

Pickering, A. D. and Pottinger, T. G. 1987. Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation, *Journal of Fish Biology,* 32:701–712.

Rifai, N., Bachorik, P. S. and Albers, J. J. 1999. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 809p.

Rodak, B. F., Fritsma G. A. and Keohane E. 2007. Hematology: Clinical Principles and Applications 3e, Philadelphia : Saunders , 14:160-190.

Satyakeerthy, T. R. 1999. Polyphenolic compounds liberated during coir retting in a BID- reactor: separation, characterisation and possible applications. *Thesis submitted in partial fulfilment of*

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 5, No. 2, Summer 2016

Effect of alcoholic extract of pomegranate peel (*Punica granatum* L.) on blood parameters of common carp *(Cyprinus carpio)* fingerling

Fariba Shafiei[1]*, N. M. Soofiani[2], E. Ebrahimi[3], A. Nematollahi[4], A. Mohebbi[5]

1- M. Sc. Student, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
2- Professor, Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
3- Associate Prof., Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
4- Associate Prof., Department of Food Hygiene and Quality Control, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
5- Assistant Prof., Clinical Science Department, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 24.01.2015 Accepted: 18.06.2016
*Corresponding author: fr.shafiei@yahoo.com

Abstract:

The effects of alcoholic extract from pomegranate *(Punica granatum*) peel on some hematological and biochemical parameters, including RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, WBC, TP, CHO, GLU, LDL, HDL, Glb, TG, GOT, GPT, Alb, ALK, LDH, and lysozyme activity of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings (11.73 ± 1.81g) were studied for a period of 75 days. Treatments included different concentrations of ethanol extract of pomegranate peel (Zero: control, 50, 150, 300 and 600 mg/kg of diet). At the end of experiment, all fish were sedated for morphometric measurement and blood sampling. Significant increases in Hb, Hct and RBC in groups 300 and 600 mg/kg of diet were observed ($P<0.05$). Total protein in groups 150, 300 and 600 mg/kg of diet showed a significant difference with other groups ($P<0.05$). Lysozyme activity was significantly enhanced in all diet containing pomegranate peel extract compared to the control group ($P<0.05$). In brief, the present study revealed an overall improvement in hematological parameters and lysozyme activities and total protein when 300 mg pomegranate peel extract was used in the diet.

Keywords: Pomegranate peel extract, *Punica granatum*, Hematological parameters, Serum biochemical parameters, Lysozyme activity, Common Carp.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2025-01-08]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.2.5.2]