

Dietary effect of Kakuti (*Ziziphora clinopodioides*) extract on serum biochemical parameters, liver enzymes activity and antioxidant defense of rainbow trout fry

Oroji, E.¹, Shamsaie Mehrgan, M.^{1*}, Rajabi Islami, H.¹, Sharifpour, I.²

1- Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: 2 October 2024

Accepted: 30 November 2024

Abstract:

Introduction: The aquaculture industry has the fastest growth in animal protein production worldwide. In this regard, salmon farming has a rapid growth in some countries, including Iran, due to modern technologies. The medicinal plant Kakuti, *Ziziphora clinopodioides* (ZE), belongs to the mint family and is one of the important medicinal plants, all parts of this herb are used in traditional medicine.

Materials and Methods: This study was conducted in a private farm in Chaharmahal and Bakhtiari province for 8 weeks. In this study, 450 healthy rainbow trout fry with an average weight of 21.19 ± 1.09 g were randomly transferred to 15 tanks to design 5 experimental groups with three replications. Different experimental groups were fed three times a day based on apparent satiety with experimental diets including 0 (control), 0.5, 1.5, 3 and 4.5% ZE extract for 8 weeks. In order to obtain the extract of ZE, Kakuti plant was dried in the shade, ground well with an electric grinder and shaken for 48 h in 85% methanol solution for 2 days at room temperature with a shaker. Then, the resulting solution was passed through filter paper and its alcohol was separated by a rotary device at 50 °C. The resulting extract was stored at 4 °C. Finally, the effect of different levels of the ZE aqueous-alcoholic extract on the serum biochemical indices, liver enzymes, and antioxidant defense of rainbow trout was evaluated.

Results and Discussion: The results showed that administration of ZE at all levels except 0.5% increased catalase activity ($p < 0.05$). The serum biochemical parameters showed that dietary supplementation with concentrations of 3 and 4.5% significantly reduced glucose, cholesterol and cortisol levels ($P < 0.05$). Meanwhile, the highest amount of albumin was recorded in fish fed with dose of 4.5%, which showed a significant difference with other groups except 3% ($p < 0.05$). Examination of liver enzymes showed that the levels of liver enzymes in response to a diet containing 3% ZE showed a significant decrease compared to 0.5% and the control group. Rainbow trout treated with 3% ZE extract is one of the main reasons for these findings, as this dose was able to protect the hepatobiliary system against stress. The

supplementation of the diet with 3% ZE extract resulted in a significant improvement in the activity of superoxide dismutase (77.72 ± 2.09 U/ml) compared to fish belonging to 0.5 and 1.5 treatments and the control groups ($p < 0.05$). Also, the amount of malondialdehyde (2.70 ± 0.25 nM/ml) and glutathione peroxidase (0.38 ± 0.08 U/ml) were significantly changed in the group fed with 3% ZE. ZE at 3% improved the serum biochemical metabolites and antioxidant capacity in rainbow trout.

Conclusion: Overall, the 3% aqueous alcoholic extract of Kakuti improved serum biochemical metabolites and antioxidant capacity in rainbow trout fry.

Keywords: Albumin, Liver enzymes, Antioxidant defense, Feed supplements, Medicinal plant.

* Corresponding Author: m.shamsaie@iau.ac.ir

"مقاله پژوهشی"

تأثیر خوراکی عصاره آبی-الکلی کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم، آنزیم‌های کبدی و دفاع آنتی‌اکسیدانی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

الهه اروجی^۱، مهدی شمسایی مهرجان^{۱*}، هومن رجبی اسلامی^۱، عیسی شریف‌پور^۲

۱- گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۹/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۷/۱۱

چکیده

تأثیر سطوح مختلف عصاره آبی-الکلی کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم، آنزیم‌های کبدی و دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ارزیابی شد. ماهیان (۴۵۰ عدد) با میانگین وزن اولیه 21.19 ± 1.09 گرم در ۱۵ مخزن توزیع و طی مدت ۸ هفته با سطوح مختلف عصاره کاکوتی در پنج تیمار شامل: ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱/۵، ۳ و ۴/۵ درصد غذادهی شدند. نتایج نشان داد که مکمل سازی جیره با غلظت‌های ۳ و ۴/۵ درصد به طور معنی داری سطح گلوکز، کلسترول و کورتیزول را کاهش داد ($p < 0.05$). این در حالست که بالاترین مقدار آلبومین در ماهیان تغذیه شده با دوز ۴/۵ درصد (1.95 ± 0.18) ثبت شد که اختلاف معنی داری را با سایر گروه‌ها به جز ۳ درصد نشان داد ($p < 0.05$). بررسی آنزیم‌های کبدی نشان داد که سطح آنزیم‌های کبدی در پاسخ به جیره حاوی کاکوتی ۳ درصد کاهش معنی داری را نسبت به ۰/۵ درصد و گروه شاهد نشان داد. تجویز عصاره کاکوتی در تمام سطوح به جز ۰/۵ درصد فعالیت کاتالاز را ارتقا داد ($p < 0.05$). از طرف دیگر، مکمل سازی جیره با کاکوتی ۳ درصد منجر به بهبود معنی دار در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (77.2 ± 72.09 U/ml) در مقایسه با ماهیان متعلق به گروه‌های ۰/۵، ۱/۵ درصد و شاهد شد ($p < 0.05$). همچنین مقدار مالون دی‌آلدئید ($2.0 \pm 7.0/25$ nM/ml) و گلووتاتیون پراکسیداز (0.0 ± 38.08 U/ml) تنها در گروه تغذیه شده با کاکوتی ۳ درصد به طور معنی داری تغییر یافت ($p < 0.05$). در مجموع، عصاره آبی الکلی کاکوتی در تیمار ۳ درصد سبب بهبود متابولیت‌های بیوشیمیایی سرم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شد.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، آلبومین، آنزیم‌های کبدی، دفاع آنتی‌اکسیدان، مکمل‌های غذایی، گیاه دارویی

مقدمه

صنعت آبی‌پروری سریع‌ترین رشد را در تولیدپروتئین حیوانی دارا است. در این زمینه پرورش آزاد ماهیان به خاطر تکنولوژی‌های مدرن رشد سریعی را در برخی از کشورها همانند نروژ، دانمارک، شیلی، ترکیه، چین و ایران داشته است. هرچند این رشد سریع اخیر در صنعت قزل‌آلای رنگین‌کمان با تهدیداتی روبرو بوده است. تحت شرایط متراکم، ماهی در معرض چندین عامل تنش‌زای محیطی یا پرورشی قرار دارد. همه این عوامل ممکن است بر سلامت و کارایی رشد ماهی تأثیر منفی برجای گذارد. به طوری‌که حساسیت ماهی به عوامل بیماری‌زا فرصت طلب به دلیل تضعیف سیستم ایمنی ماهی افزایش یابد و منجر به بحران بهداشتی و زیان اقتصادی شود (Faggio *et al.*, 2016; Awad *et al.*, 2006; Ringø and Song, 2015). به طور گسترده پذیرفته شده که وضعیت جیره دارای اثرات گسترده‌ای بر سلامت میزبان است. بنابراین جیره باید براساس ویژگی‌های مورد نیاز برای سلامت ماهی فرموله شود یکی از راهکارهای مهم در کاهش اثرات استرس شرایط پرورش استفاده از مکمل‌های غذایی است (Van Hai, 2015; Guerreiro *et al.*, 2016). مکمل‌های غذایی شامل ترکیباتی هستند که علاوه بر تأمین نیازهای غذایی فواید خاصی را برای میزبان دارا هستند. در واقع جیره‌های ارتقا یافته شامل طیف گسترده‌ای از فرآورده‌های طبیعی همانند ویتامین‌ها، پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و عصاره گیاهی هستند که دارای چندین اثر بیولوژیکی همانند تقویت دفاع آنتی اکسیدانی و تحریک سیستم ایمنی را دار می‌باشند (Carbone and Faggio, 2016; Dawood and Koshio, 2016). با توجه به ویژگی‌های

منحصر به فرد عصاره‌های گیاهی همانند اثرات زیستی متنوع، در دسترس بودن، فراوری آسان و قیمت ارزان این مکمل‌ها طبیعی در سال‌های گذشته محبوبیت زیادی یافته‌اند (Mariappan *et al.*, 2023). در یک دهه اخیر چندین مطالعه اثرات عصاره‌های گیاهی را بر گونه‌های مختلف مطالعه کرده‌اند هرچند بیشتر این مطالعات کارایی جیره را بر روی وضعیت رشد و پاسخ‌های ایمنی ماهی خصوصاً پارامترهای ایمنی ذاتی و مقاومت در برابر پاتوژنها را بررسی کرده‌اند و اثرات بالقوه عصاره‌های گیاهی بر وضعیت پارامترهای مرتبط با استرس کمتر مطالعه شده است (Pu *et al.*, 2017; Bahi *et al.*, 2017). با توجه به تراکم نسبتاً بالا در پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان و حساسیت آن نسبت به فاکتورهای فیزیکی‌کوشیمیایی (کمبود اکسیژن، درجه حرارت نامتعارف و افزایش آمونیاک و...)، گرسنگی و دستکاری بررسی پاسخ‌های فیزیولوژی مرتبط با استرس در جیره‌های غنی شده با عصاره‌های گیاهی در این ماهی اهمیت بالایی دارد.

گیاه دارویی کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides*) متعلق به خانواده نعناعیان است و یکی از گیاهان دارویی مهم است که تمامی بخش‌های این گیاه در طب سنتی استفاده می‌شود. این گیاه به طور گسترده در مناطق مختلف ایران به ویژه در شمال غرب، غرب، جنوب غربی و البرز مرکزی به وفور یافت می‌شود (Aghajani *et al.*, 2008). این گیاه دارویی در انسان دارای چندین فعالیت بالقوه شامل اثرات ضد سرطان، ضد دیابت، تقویت کبد، درمان بیماری‌های گوارشی، کاهش استرس و آرام بخشی و دارای اثرات تحریکی سیستم ایمنی است (Gursoy *et al.*, 2009). عصاره کاکوتی غنی از ترکیبات فنلی، ترپن و

گامی در جهت خود کفایی و رفع مشکلات آبرزی پروری کشور برداشت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در یک مزرعه خصوصی در استان چهارمحال و بختیاری به مدت ۸ هفته با خصوصیات فیزیکیوشیمیایی شامل: دمای ۱۵-۱۳ درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول ۷/۵-۸ میلی گرم برلیتر، $pH=7-8$ و جریان آب ۲ لیتر بر ثانیه در استخرهای آبراهه‌ای (طول سه متر، عرض سانتی متر ۷۰ و عمق ۱ متر) انجام شد. در این تحقیق برای طراحی ۵ گروه آزمایشی با سه تکرار، ۴۵۰ قطعه بچه ماهی سالم با میانگین وزن $21/19 \pm 1/09$ به طور تصادفی به ۱۵ استخرهای آبراهه-ای انتقال یافتند. گروه‌های آزمایشی مختلف سه بار در روز و بر اساس سیری ظاهری (ساعت‌های: ۸، ۱۲ و ۱۶) با جیره‌های آزمایشی شامل ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱/۵، ۳ و ۴/۵ درصد به مدت ۸ هفته تغذیه شدند (Oroji et al., 2021) و میزان غذای خورده شده و تلفات (در صورت وجود) هر گروه به صورت روزانه ثبت شد. برای ۸ هفته انجام شد.

به منظور عصاره‌گیری از گیاه کاکوتی، مقداری از گیاه پس از خشک‌نمودن در سایه، با آسیاب برقی به خوبی آسیاب شد و به مدت ۴۸ ساعت در محلول متانول ۸۵ درصد به مدت ۲ روز در دمای اتاق با دستگاه شیکر به صورت افقی تکان داده شد. سپس محلول حاصل از کاغذ صافی عبور و الکل آن توسط دستگاه روتاری در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد جداسازی شد. عصاره حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید (Citarasu et al., 2006).

آلکالوئیدهایی شناخته شده مانند تیمول، منتول، کارواکرول، لینالول، پولوگون، اتیل استات، کوئرستین و کامپفرول است که بخشی اصلی عصاره این گیاه را تشکیل می‌دهند به طوریکه خواص آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی بیشتری را نسبت به سایر گونه‌های تیره نعناعیان نشان می‌دهد (Aghajani et al., 2008; Wu et al., 2019). برای مثال Gursoy و همکاران (۲۰۰۹) اثبات کردند که عصاره کاکوتی به دلیل بالا بودن ترکیبات فنلی ($129/2 \pm 55$ میکروگرم بر گرم) نسبت به سایر گیاهان این تیره همانند پونه ($93/47 \pm 1/84$ میکروگرم بر گرم) و ریحان ($76/14 \pm 1/07$ میکروگرم بر گرم) فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی (MIC) (*Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*) (*Clostridium perfringens* و *Escherichia coli*) بالاتری را نسبت به این دو گیاه نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که خواص آنتی اکسیدانی قوی در عصاره کاکوتی ناشی از وجود روغن‌های فرار، ترپن‌ها و آلکالوئیدها در این گیاه است و به همین دلیل استفاده از عصاره کاکوتی در جیره آبزیان می‌تواند نقش مهمی را در کاهش اثرات استرس‌ها در ماهیان در شرایط پرورش ایفا کند (Yang et al., 2011; Wu et al., 2019). با توجه به پتانسیل‌های عصاره کاکوتی و اثرات بیولوژیکی ذکر شده آن در زمینه‌های مختلف، تاکنون اثرات عصاره الکلی این گیاه در تغذیه آبزیان مطالعه نشده است و اطلاعات بسیار محدودی در این زمینه وجود دارد. لذا در این مطالعه تأثیر عصاره الکلی کاکوتی در سطوح مختلف بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم، آنزیم‌های کبدی و دفاع آنتی اکسیدانی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان مهمترین گونه پرورشی کشور مورد مطالعه قرار خواهد گرفت تا بتوان

برای آماده سازی جیره پایه، تمام نهاده‌های غذایی به مدت ۲۰ دقیقه با یکدیگر مخلوط شدند و پس از افزودن ۳۰۰ میلی لیتر آب به ازای هر کیلو به خمیر تبدیل شدند. خمیر از طریق یک چرخ گوشت صنعتی به پلت تبدیل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد خشک شد و نهایتاً در کیسه‌های

پلاستیکی زیپ دار ذخیره شدند. جیره‌ها آزمایشی نیز از طریق افزودن دوزهای مختلف عصاره به خمیر آماده شدند. وضعیت بیوشیمیایی جیره و نهاده‌های غذایی مورد استفاده برای ساخت جیره پایه در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: ترکیبات جیره‌های آزمایشی جهت انجام مطالعه (برحسب گرم در کیلوگرم در ماده خشک).

Table 1: Proximate composition of experimental diets (g/kg of dry matter).

Food ingredients	g/kg of dry basis	Biochemical components	% in dry basis
Fishmeal ¹	320	Crude protein	42.5
Soybean meal ²	260	Crude fat	16.4
White flour	178	Fiber	3.20
Meat powder ³	100	Ash	9.6
Fish oil	60		
Soybean oil	50		
Mineral complex ⁴	16		
Vitamin complex ⁴	10		
Phytase ⁵	3		
DL-Methionine	3		
Total	1000		

1- Protein: 67%, Fat: 10%, Ash: 13% (Khazar Company, Mazandaran) 2- Protein: 46%, Gorgan Soybean, Gorgan 3- Protein: 60% and Fat: 18% 4- Golbid Tehran 5- Tayvar Mad, Sanandaj

به منظور بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم و آنزیم‌های کبدی نمونه‌های خون ماهیان در انتهای دوره پرورش با استفاده از سرنگ ۲ میلی لیتری گرفته شد. خونگیری از طریق ورید ساقه دمی صورت گرفت در هر بار نمونه‌گیری تعداد نه قطعه ماهی از هر تیمار (هر تکرار سه قطعه ماهی) بصورت تصادفی جهت خونگیری انتخاب شدند. قبل از خونگیری ماهیان به کمک محلول پودر گل میخک (۲۰۰ میلی گرم در لیتر) بیهوش شدند. برای تهیه سرم اجازه داده شد، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق و سپس، ۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا

سرم در بالای رسوب سلولی شناور شود. در مرحله بعد نمونه‌ها با دور ۱۶۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و سرم هر نمونه بطور جداگانه جمع‌آوری شده و در میکروتیوب‌های استریل (به وسیله اتوکلاو) ذخیره و تا زمان انجام آنالیزها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی در هر نوبت تعدادی از سرم‌ها را از حالت انجماد خارج شده و با استفاده از کیت‌های اختصاصی پارس آزمون، فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز موکوس (ALP)، آلانین ترانسفراز (ALT) و AST اندازه‌گیری شد. برای اندازه

گیری AST و ALT تغییر رنگ ایجاد شده در اثر فعالیت آنزیم با طول موج ۵۰۵ نانومتر قرائت گردید و با مقایسه با منحنی استاندارد فعالیت آنزیم محاسبه گردید. برای اندازه گیری ALP نیز از کیت پارس آزمون و در طول موج ۴۰۵ استفاده شد و پس از مقایسه با منحنی استاندارد، مقدار این آنزیم یادداشت و در نهایت آنزیم‌ها بر حسب U/L گزارش شد (Borges *et al.*, 2004). سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) با استفاده از روش رنگ سنجی Wroblewski و Ladua (۱۹۹۵) و کیت شرکت پارس آزمون در طول موج ۳۴۰ انجام شد.

اندازه‌گیری هورمون کورتیزول خون با هورمون کورتیزول با روش ELISA و با کیت انسانی رادیم ساخت ایتالیا و بر حسب نانوگرم در میلی لیتر اندازه‌گیری شد (Poursaeid *et al.*, 2012). هم چنین سنجش آلبومین، کلسترول و گلوکز با استفاده از کیت تجاری پارس آزمون انجام شد.

میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوکاتایون بافت کبد با تهیه عصاره آنزیمی همراه با تغییر سطوح عصاره کاکوتی جیره غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه عصاره آنزیمی ماهیان بیهوش شده در مجاورت یخ قرار گرفتند تا فعالیت آنزیمی آنها در مراحل کالبد گشایی به حداقل برسد سپس امعاء و احشاء آنها تخلیه شده و بافت کبد با آب مقطر سرد به خوبی شستشو داده شد و نمونه‌ها با نسبت وزنی به حجمی ۱ به ۳ با کلرید سدیم ۰/۲ مولار مخلوط شدند و در حضور یخ عمل یکنواخت سازی با هموژنایزر صورت پذیرفت. سپس سوسپانسیون حاصله در سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و مایع رویی

جدا و برای سنجش آنزیمی با استفاده از کیت‌های مورد نظر استفاده گردید (Qu *et al.*, 2014). فعالیت اختصاصی آنزیم کاتالاز با استفاده از H_2O_2 به عنوان سوپراکسید و فعالیت اختصاصی سوپر اکسید دیسموتاز بر پایه توانایی آن در بازداري از احیا Nitroblue tetrazolium و به وسیله سوپر اکسید سنجیده شد (Winterbourn *et al.*, 1975). فعالیت اختصاصی آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز از طریق تشکیل گلوکاتایون کلرو دی نیتروبنزن و به روش اسپکتوفتومتری در طول موج ۳۴۰ نانومتر تعیین شد (Habig *et al.*, 1974). سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس درگیری رادیکال سوپر اکسید در اکسیداسیون خودبه خودی پیروگالول و مطابق روش Marklund (۱۹۷۴) صورت گرفت در این روش پس از مخلوط کردن ۵۰ میلی مولار Tris- HCL با سرم پیروگالول به آن اضافه گردید سپس اکسیداسیون خود به خودی پیروگالول در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شد. هر واحد فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به صورت مقدار آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از اکسیداسیون پیروگالول تا ۵۰ درصد در یک دقیقه تعیین گردید. اندازه گیری MDA پلاسما با روش Rajabiesterabadi و همکاران (۲۰۲۰) انجام پذیرفت. در این روش که اساس آن واکنش MDA با تیوباربیتوریک اسید و استخراج بوتانول نرمال است، سرم با اسید فسفریک و TBA مخلوط و به مدت ۴۵ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد. پس از آن مخلوط مورد نظر سرد و بوتانول نرمال به این مخلوط اضافه و سپس مخلوط بدست آمده سانتریفیوژ و جذب نوری مایع رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش حاضر در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌های بدست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنف بررسی شد. بررسی آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و به کمک آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین توکی (Tukey's HSD test) انجام شد. تمام مفروضات آنالیز واریانس پیش از انجام تحلیل‌های آماری، مورد بررسی قرار گرفت و در صورت لزوم از تبدیل‌های مناسب استفاده شد. شایان ذکر است که تمامی آزمون‌ها در سطح معنی‌داری کمتر از ۵ درصد تفسیر شد و نتایج نهایی بصورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش گردید. برای ترسیم نمودارها نیز از نرم افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد.

نتایج

جدول ۲: پارامترهای بیوشیمیایی سرم ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره آبی-الکلی کاکوتی.

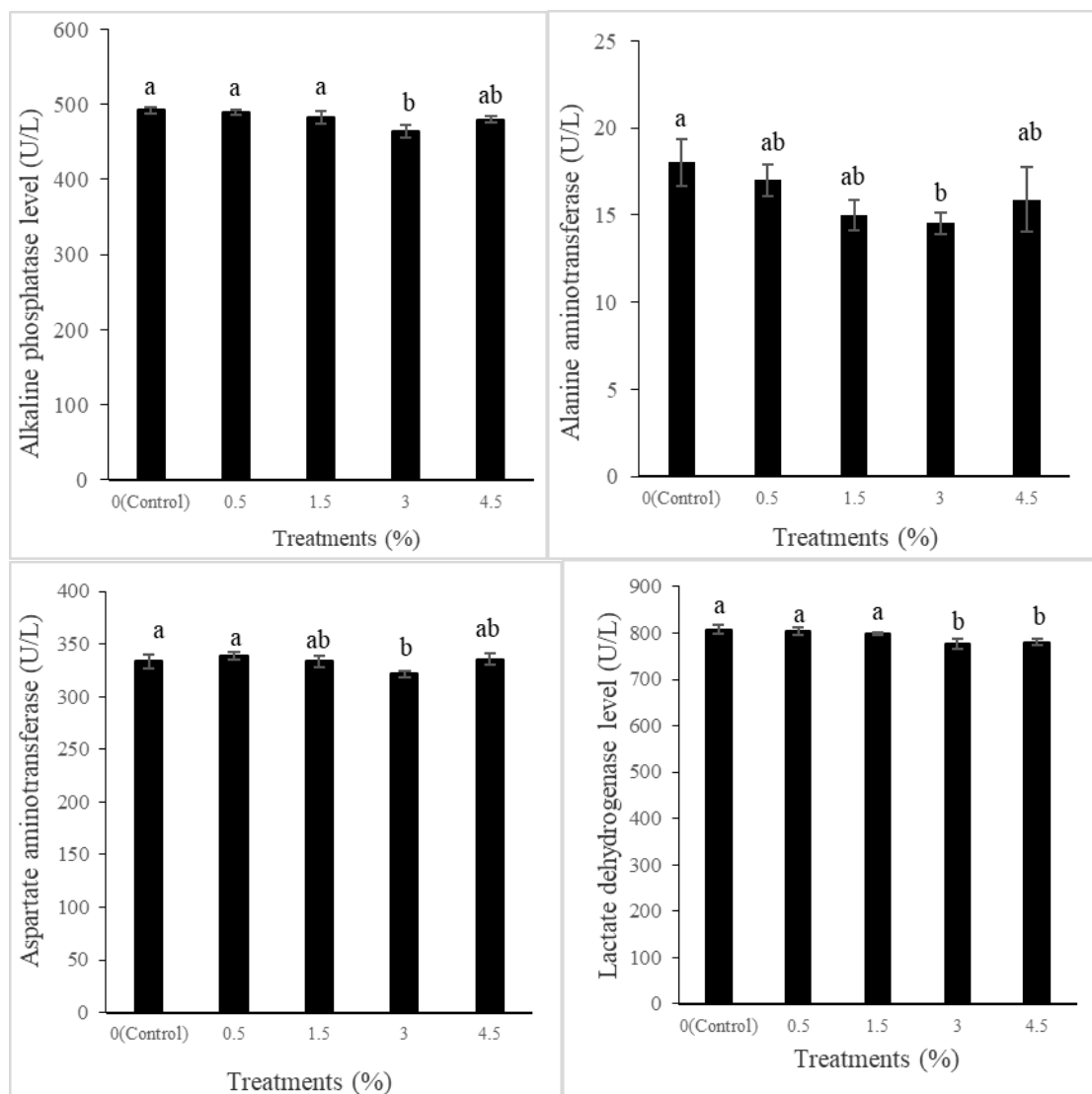
Table 2: Serum biochemical parameters of rainbow trout fed with different levels of Kakuti hydroalcoholic extract.

Parameters	Different levels of Kakuti hydroalcoholic extract (%)				
	0 (Control)	0.5	1.5	3	4.5
Total protein	3.58±0.90 ^a	4.04±0.35 ^a	4.04±0.37 ^a	4.12±0.50 ^a	4.20±0.31 ^a
Albumin	1.33±0.10 ^c	1.49±0.09 ^{bc}	1.55±0.14 ^{bc}	1.82±0.10 ^{ab}	1.95±0.18 ^a
Cholesterol	336.12±6.56 ^a	340.16±10.02 ^a	335.59±7.50 ^a	308.99±7.87 ^b	314.24±6.33 ^b
Glucose	92.56±2.11 ^a	91.33±4.12 ^a	88.34±6.98 ^{ab}	76.78±5.77 ^b	78.93±1.57 ^b
Cortisol	203.86±2.01 ^a	202.94±2.17 ^a	200.00±2.00 ^{ab}	192.33±2.51 ^c	196.66±2.53 ^{bc}

Different letters in each row indicate significant differences at the 5% level ($p < 0.05$).

کاکوتی ۳ درصد اختلاف معنی‌داری را مقایسه با گروه شاهد نشان دادند ($p < 0.05$). علاوه بر این سطح لاکتات دهیدرژناز در گروه‌های تغذیه شده با کاکوتی ۳ (۷۷۷/۱۱±۳۳/۰۵) و ۴/۵ (۷۸۰/۳۳±۷/۵۰) درصد به طور معنی‌دار نسبت به گروه‌های شاهد و ۰/۵ درصد کاهش یافت ($p < 0.05$).

داده‌های بدست آمده از تأثیر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی کاکوتی بر آنزیم‌های کبدی در شکل ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که سطح آلکالین فسفاتاز (۴۶۳/۷۳±۸/۴۶)، آلانین آمینوترانسفراز (۱۴/۵۴±۰/۶۱) و آسپارات آمینوترانسفراز (۳۲۱/۳۳±۳/۵۱) در ماهیان تیمار شده با



شکل ۱: سطح آنزیم‌های کبدی در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره آبی-الکلی کاکوتی حروف غیرهمسان در هر نمودار بیانگر اختلاف معنی دار است ($p < 0.05$).

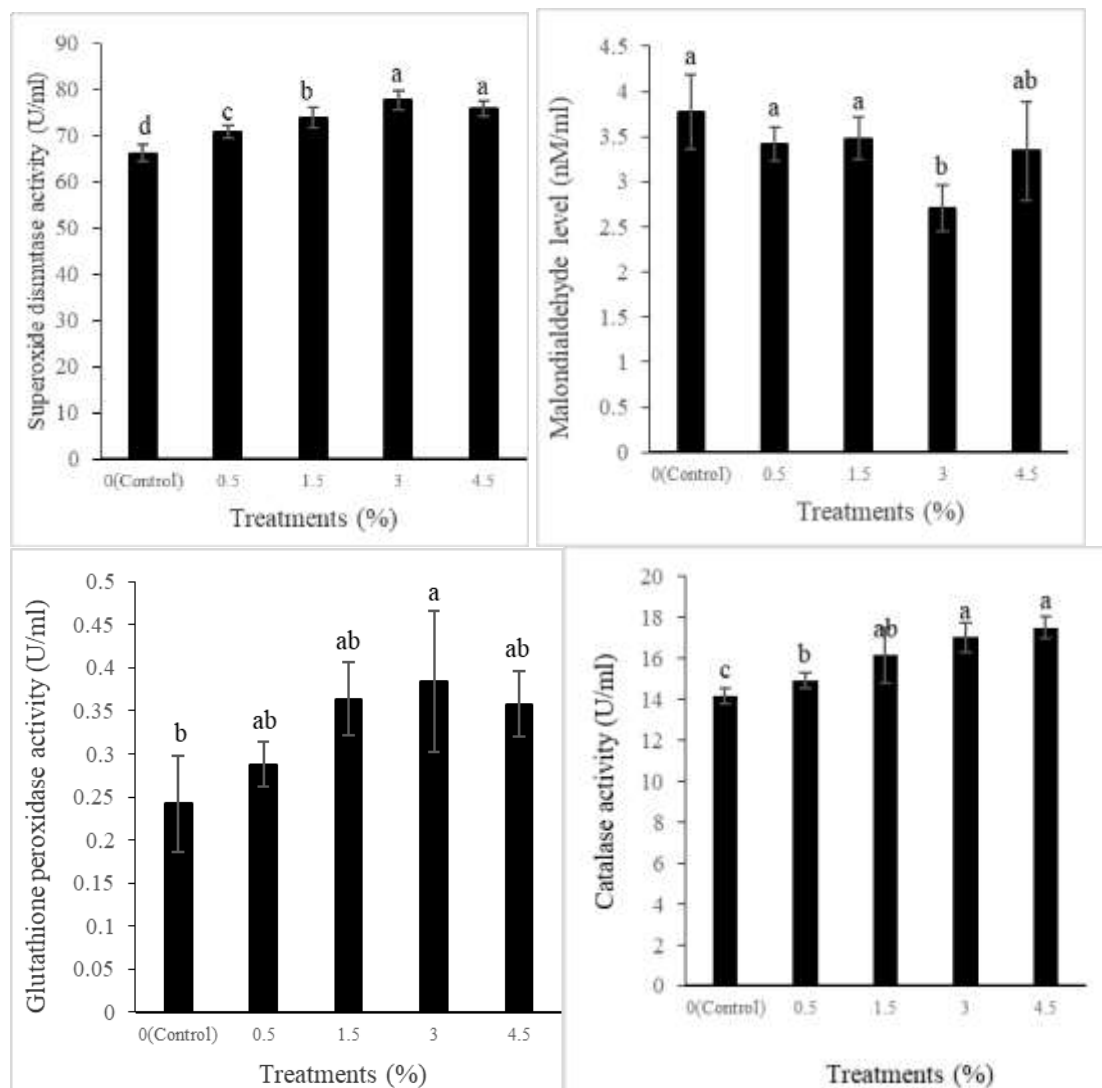
Figure 1: Liver enzyme levels in rainbow trout fed with different levels of Kakuti hydroalcoholic extract. Different letters in each graph indicate significant differences ($p < 0.05$).

این تجویز عصاره کاکوتی به میزان ۳ u/ml) $(17/1 \pm 51/67)$ u/ml و ۴/۵ درصد $(17/0 \pm 02/71)$ فعالیت آنزیم کاتالاز را در مقایسه با ماهیان متعلق به گروه شاهد و گروه ۰/۵ درصد افزایش داد ($p < 0.05$). از سوی دیگر سطح فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در واکنش به کاکوتی ۳ درصد $(0/0 \pm 38/08)$ u/ml

براساس شکل ۲ دفاع آنتی اکسیدانی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان توسط سطوح مختلف کاکوتی در جیره تحت تأثیر قرار گرفت. تفاوت قابل توجهی در سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ماهیان تغذیه شده با کاکوتی ۳ درصد $(77/2 \pm 72/09)$ u/ml در مقایسه با گروه شاهد ثبت شد ($p < 0.05$). علاوه بر

۲۵/۷۰±۲/۰). هر چند سایر سطوح کاکوتی تأثیر معنی داری بر این فراورده سمی نداشتند ($p>0.05$).

افزایش معنی داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد ($p<0.05$). هم چنین میزان مالون دی‌الدئید به عنوان یک فرآورده سمی حاصل از پراکسیداسیون چربی‌ها به طور معنی داری در ماهیان تیمار شده با جیره مکمل شده با کاکوتی ۳ درصد کاهش یافت (nM/ml)



شکل ۲: پاسخ‌های دفاع آنتی اکسیدانی در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره آبی-الکلی کاکوتی حروف غیرهمسان در هر نمودار بیانگر اختلاف معنی دار است ($p>0.05$).

Figure 2: Antioxidant defense responses in rainbow trout fed with different levels of Kakuti hydroalcoholic extract. Different letters in each graph indicate significant differences ($p<0.05$).

بحث

استرس‌های محیطی می‌تواند تغییرات زیادی در سطح هورمون‌ها، قندها، پروتئین و کلسترول خون ماهی ایجاد کنند. یکی از پاسخ‌های ثانویه اندازه‌گیری گلوکز و هورمون کورتیزول خون به عنوان معیار اندازه‌گیری شرایط استرس است (Ellis et al., 2012). کاتکول آمین‌ها با تأثیر بر کبد سبب القاء گلیکوژنولیز می‌شوند که این امر منجر به افزایش میزان گلوکز سرم خون می‌شود. علاوه بر این، تحت شرایط استرس، مواد ترشح شده از هیپوتالاموس به قسمت قدامی کلیه وارد می‌شود و با تحریک سلول‌های بین کلیوی سبب ترشح کورتیزول می‌شود (Galvez Ranilla et al., 2010). نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره کاکوتی از طریق کاهش اثرات استرس‌ها سطح کورتیزول و گلوکز را در ماهیان به ویژه تیمار ۳ درصد کاهش داد. مطابق با نتایج ما، Gabriel و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که عصاره آلورا سطح گلوکز و کورتیزول سرم در ماهی تیلاپیا را کاهش داد. در حقیقت، با مصرف خوراک واجد کاکوتی نرخ به مراتب بالایی از گلوکز خون طی فرآیند گلیکوژنز به گلیکوژن تبدیل و در کبد ذخیره می‌شود که می‌تواند در نهایت میزان گلوکز خون را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان کاهش دهد (Rito et al., 2019).

کلسترول یکی از ترکیبات ضروری غشای سلولی، لایه خارجی پروتئین پلاسما و پیش ماده تمام هورمون‌های استروئیدی است. نقش اول کلسترول مهیا کردن انرژی سلول است و می‌تواند به عنوان یک شاخص در ارزیابی وضعیت تغذیه ماهیان استفاده شود (Kamal and Omar, 2011). تعداد زیادی از عصاره‌های گیاهی از طریق افزایش سطح آنزیم ۷-آلفا کلسترول

هیدروکسیلاز در سلول‌های کبد موجب افزایش دفع میزان کلسترول و کاهش سنتز کلسترول سلولی می‌شوند که تأیید کننده کاهش سطح کلسترول و تری گلیسرید در اثر مصرف عصاره مورد نظر است (Pripdeevech and Machan, 2011).

در مطالعه حاضر عصاره گیاه کاکوتی منجر به کاهش کلسترول خون شد. عصاره گیاه کاکوتی به دلیل وجود ترکیباتی با خاصیت هیپولیپیدمیک موجب کاهش کلسترول خون می‌شود علاوه بر این حضور ترکیباتی همانند کارواکول و تیمول می‌تواند سطح کلسترول خون را کاهش دهند. در این مطالعه تجویز عصاره کاکوتی در غلظت‌های ۳ و ۴ درصد منجر به کاهش معنی‌دار در سطح کلسترول خون شد. در راستای نتایج ما Palermo و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که استفاده از گیاه آلوئه ورا در سطح ۲ درصد منجر به کاهش میزان کلسترول در ماهی گلدفیش (*Carassius auratus*) می‌شود.

فرآورده‌های گیاهی، سنتز پروتئین را که منجر به تولید بیشتر مولکول‌های پروتئینی دخیل در ایمنی می‌شود را افزایش می‌دهند. از سوی دیگر افزایش میزان پروتئین منجر به افزایش میزان پروتئین درون سلولی و نهایتاً افزایش رشد می‌شود (Liu et al., 2010). پروتئین کل در سرم خون شامل آلبومین و گلوبین است که عملکردهای فیزیولوژیکی گسترده‌ای را در ماهیان استخوانی بر عهده دارد. آلبومین نقش مهمی در انتقال ترکیبات مختلف همانند داروها در خون بر عهده دارد. بنابراین تحریک سنتز این پروتئین‌ها توسط کبد یا سایر بخش‌های سیستم ایمنی، می‌تواند منجر به بهبود انتقال محرک‌های ایمنی همانند مکمل‌های گیاهی در خون شود (Kamal and Omar, 2011). در این مطالعه

اختلاف معنی‌داری در غلظت پروتئین کل در بین گروه‌های آزمایشی مختلف ثبت نشد. هر چند سطح آلبومین در ماهیان تحت تغذیه با کاکوتی ۴/۵ درصد اختلاف معنی‌داری را با سایر گروه‌های آزمایشی نشان داد. در راستای نتایج مطالعه حاضر، Oskoi و همکاران (۲۰۱۲) گزارش دادند که افزودن عصاره سرخار گل به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت هشت هفته منجر به افزایش میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در مقایسه با گروه شاهد و تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵ و ۲ دو درصد می‌شود. هرچند در مطالعه Dorrojan و همکاران (۲۰۱۵) اختلاف معنی‌داری در سطح پارامترهای بیوشیمیایی خون ماهی از جمله پروتئین کل، آلبومین، تری گلیسرید، کلسترول و گلوکز ماهی اوزن برون تغذیه شده با سطوح مختلف آویشن شیرازی نیافتند.

در شرایط پرورش کبد ماهیان اولین ارگانی است که هر نوع بی‌نظمی در شرایط پرورش همانند حضور مواد سمی، پاتوژن‌های فرصت طلب، استفاده بیش از حد از داروها و ضدعفونی کننده‌ها، استرس‌های اکسیداتیو، وضعیت جیره و مکمل‌های غذایی را منعکس می‌کند. علاوه بر این این اندام در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف شامل سم زایی، متابولیسم مواد غذایی و سنتز عناصر دفاعی مانند کمپلمان دخالت دارد (Wolf and Wolfe 2005; Jia et al., 2019). سنجش آنزیم‌های کبدی شامل ALT، AST، ALP و LDH یکی از معیارهای شناخته شده در تعیین وضعیت سلامت کبد است. آنزیم‌های کبدی توسط سلول‌های پوششی مجرای کیسه صفرا تولید می‌شوند و در اختلال کبدی و انسداد مجرای صفرا، سطح آنها به طور ناگهانی در پلاسما افزایش می‌یابد (Ramadan et al., 2002). افزایش این آنزیم‌ها بیانگر بهبود سلامت کبد و کارایی

آن در ماهیان است. در این مطالعه تجویز عصاره کاکوتی در سطح ۳ درصد به طور معنی‌داری فعالیت این آنزیم‌ها را کاهش داد. افزایش توان آنتی اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمار شده با کاکوتی ۳ درصد یکی از دلایل اصلی این یافته‌ها است که این دوز به خوبی توانسته است سیستم کبدی صفراوی را در برابر استرس‌ها محافظت کند. علاوه بر این عدم افزایش آنزیم‌های کبدی در جیره‌های تیمار شده با سطوح مختلف کاکوتی بیانگر عدم اثرات جانبی و سمی بودن این محرک گیاهی برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است. استفاده از جیره‌های غذایی حاوی فرآورده‌های گیاهی مانند سینامیک اسید (Yilmaz and Ergün, 2018)، برگ گیاه درمنه (Mirghaed et al., 2020a) و عصاره میوه بلوط (Rashidian et al., 2018) به طور معنی‌داری سطح گردش آنزیم‌های کبدی را در قزل‌آلای رنگین‌کمان کاهش دادند که با نتایج ما مطابقت دارد.

سیستم آنتی‌اکسیدان ماهیان نقش مهمی را در حمایت از سلول‌ها زنده بر ضد رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های التهابی بیش از حد و آپوپتوز ایفا می‌کنند (Yin et al., 2019). آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز آنزیم‌های اصلی دفاع آنتی اکسیدانی هستند که به عنوان اولین خط دفاعی این سیستم عمل می‌کنند. این آنزیم‌ها سوپراکسید را به مولکول پراکسید هیدروژن و آب تبدیل می‌کنند (Yousefi et al., 2021). در واقع این آنزیم‌ها نقش حیاتی را حفظ یکپارچگی سلولی در واکنش به استرس‌های اکسیداتیو کنترل نشده در شرایط پرورش بر عهده دارند. نتایج مطالعه ما نشان داد که فعالیت این سه آنزیم در سرم ماهیان تغذیه شده با کاکوتی ۳ درصد به

تحقیقات و همچنین شرکت خوراک آبزیان کیمیاگران تغذیه (شهر کرد) اعلام می‌دارد.

منابع

1. Aghajani, Z., Assadian, F., Masoudi, S., Chalabian, F., Esmaceli, A., Tabatabaei-Anaraki, M. and Rustaiyan, A., 2008. Chemical composition and in vitro antibacterial activities of the oil of *Ziziphora clinopodioides* and *Z. capitata* subsp. *capitata* from Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(3), pp.387-389. DOI:10.1007/s10600-008-9073-4
2. Awad, E., Austin, B., Abdel-Aal, E.S.M., Young, J.C. and Rabalski, I., 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 54(13), pp.696-704. DOI: 10.1021/jf0606609
3. Bahi, A., Guardiola, F.A., Messina, C.M., Mahdhi, A., Cerezuela, R., Santulli, A. and Esteban, M.A., 2017. Effects of dietary administration of fenugreek seeds, alone or in combination with probiotics, on growth performance parameters, humoral immune response and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and shellfish immunology*, 60, pp.50-58. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.11.039
4. Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30(1), pp.21-25. DOI: 10.1007/s10695-004-5000-1
5. Carbone, D. and Faggio, C., 2016. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology*, 54, pp.172-178. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.04.011
6. Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N. and Murugan, V., 2006. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus*

طور چشمگیری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. علاوه بر این مقدار مالون دی‌آلدئید به عنوان یک فرآورده سمی ناشی از پراکسیداسیون چربی‌ها در ماهیان تحت تغذیه با عصاره گیاهی کاکوتی به ویژه در سطح ۳ درصد کاهش یافت. از طرف دیگر مطالعات نقش عصاره‌های گیاهی را در تحریک آنزیم‌های درون سلولی را تأیید کرده‌اند. برای مثال تجویز سینول (Yonar et al., 2018)، کرکومین (Hoseini et al., 2018)، عصاره زنجبیل (*Zingiber officinale*; Zargar et al., 2020) و آویشن (*Zataria multiflora*; Mirghaed et al., 2020b) دفاع آنتی اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را تقویت کرد. با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از عصاره هیدروالکلی کاکوتی یک مکمل ارزان، بدون اثرات جانبی، تقویت کننده سلامت ماهی است. هر چند بررسی سطوح مختلف عصاره در این مطالعه نشان داد که استفاده از دوز ۳ درصد قابلیت بالاتری در تقویت پارامترهای بیوشیمیایی سرم، دفاع آنتی‌اکسیدانی نسبت به سایر سطوح عصاره داشت علاوه براین، این غلظت به عنوان کاهنده استرس اثرات حفاظتی چشمگیری را نیز بر کبد نشان داد. لذا بررسی استفاده از دوز ۳ درصد عصاره هیدروالکلی کاکوتی به عنوان یک مکمل ارزان و کارا در کاهش استرس و تقویت دفاع آنتی اکسیدان ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در شرایط پرورش توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از آزمایشگاه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی، علوم و

- effect on immune and hepatic oxidative status and gut morphology of White Sea bream (*Diplodus sargus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 50(7), pp.168-174. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.01.023
14. Gursoy, N., Sihoglu-Tepe, A. and Tepe, B., 2009. Determination of in vitro antioxidative and antimicrobial properties and total phenolic contents of *Ziziphora clinopodioides*, *Cyclotrichium niveum*, and *Mentha longifolia* ssp. *typhoides* var. *typhoides*. *Journal of Medicinal Food*, 12(3), pp.684-689. DOI: 10.1089/jmf.2008.0102
 15. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), pp.7130-7139.
 16. Hoseini, S.M., Mirghaied, A.T., Iri, Y. and Ghelichpour, M., 2018. Effects of dietary cineole administration on growth performance, hematological and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 495, pp.766-772. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.073
 17. Jia, R., Gu, Z., He, Q., Du, J., Cao, L., Jeney, G. and Yin, G., 2019. Anti-oxidative, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of Radix Bupleuri extract against oxidative damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) via Nrf2 and TLRs signaling pathway. *Fish and Shellfish Immunology*, 93, pp.395-405. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.07.080
 18. Kamal, S.M. and Omar, W.A., 2011. Effect of different stocking densities on hematological and biochemical parameters of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* fingerlings. *Life Science*, 8(4), pp.580-586.
 19. Liu, B., Ge, X., He, Y., Xie, J., Xu, P., He, Y. and Chen, R., 2010. Effects of anthraquinones extracted from *Rheum officinale* Bail on the growth, non-specific immune response of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 310(1-2), pp.13-19. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.09.020
 20. Mariappan, B., Kaliyamurthi, V. and monodon with reference to haematological, biochemical and immunological changes. *Fish and Shellfish Immunology*, 21(4), pp.372-384. DOI: 10.1016/j.fsi.2006.01.002
 7. Dawood, M.A. and Koshio, S., 2016. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture, a review. *Aquaculture*, 454, pp.243-251. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.12.033
 8. Dorojan, O.G.V., Cristea, V., Crețu, M., Dediu, L., Docan, A.I. and Coadă, M.T., 2015. The effect of thyme (*Thymus vulgaris*) and vitamin E on the *Acipenser stellatus* juvenile welfare, reared in a recirculating aquaculture. *AACL Bioflux*, 8(2), pp.150-158.
 9. Ellis, T., Yildiz, H.Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M.T., Tort, L., Øverli, Ø. and Martins, C.I., 2012. Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), pp.163-188. DOI: 10.1007/s10695-011-9568-y
 10. Faggio, C., Fazio, F., Marafioti, S., Arfuso, F. and Piccione, G., 2015. Oral administration of Gum Arabic, effects on haematological parameters and oxidative stress markers in *Mugil cephalus*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(1), pp.60-72.
 11. Gabriel, N.N., Qiang, J., He, J., Ma, X.Y., Kpundeh, M.D. and Xu, P., 2015. Dietary *Aloe vera* supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). *Fish and Shellfish Immunology*, 44(2), pp.504-514. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.03.002
 12. Galvez Ranilla, L., Kwon, Y.I., Apostolidis, E. and Shetty, K., 2010. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, 101(12), pp.4676-4689. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.093
 13. Guerreiro, I., Couto, A., Machado, M., Castro, C., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A. and Enes, P., 2016. Prebiotics

- pp.851-861. DOI: 10.1007/s10695-012-9745-7
27. Poursaeid, S., Falahatkar, B., Amiri, B.M. and Van Der Kraak, G., 2012. Effects of long-term cortisol treatments on gonadal development, sex steroids levels and ovarian cortisol content in cultured great sturgeon *Huso huso*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 163(1), pp.111-119. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.05.202
 28. Pripdeevech, P. and Machan, T., 2011. Fingerprint of volatile flavour constituents and antioxidant activities of teas from Thailand. *Food Chemistry*, 125(2), pp.797-802. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.074
 29. Pu, H., Li, X., Du, Q., Cui, H. and Xu, Y., 2017. Research progress in the application of chinese herbal medicines in aquaculture, A review. *Engineering* 3(5), pp.731-737. DOI: 10.1016/J.ENG.2017.03.017
 30. Qu, G., Liu, X., Wang, D., Yuan, Y.I. and Han, L., 2014. Isolation and characterization of fucoidans from five brown algae and evaluation of their antioxidant activity. *Journal of Ocean University of China*, 13(5), pp.851-856. DOI: 10.1007/s11802-014-2260-y
 31. Rajabiesterabadi, H., Hoseini, S.M., Fazelan, Z., Hoseinifar, S.H. and Doan, H.V., 2020. Effects of dietary turmeric administration on stress, immune, antioxidant and inflammatory responses of common carp (*Cyprinus carpio*) during copper exposure. *Aquaculture Nutrition*, 26(4), pp.1143-1153. DOI: 10.1111/anu.13071
 32. Ramadan, L. A., Roushdy, H.M., Senna, G.M.A., Amn, N.E. and El-Deshw, O.A., 2002. Radioprotective effect of silymarin against radiation induced hepatotoxicity. *Pharmacological Research*, 45(6), pp.447-454. DOI: 10.1006/phrs.2002.0990
 33. Rashidian, G., Bahrami Gorji, S., Farsani, M.N., Prokić, M.D. and Faggio, C., 2020. The oak (*Quercus brantii*) acorn as a growth promotor for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), growth performance, body composition, liver Binesh, A., 2023. Medicinal plants or plant derived compounds used in aquaculture. In: *Recent Advances in Aquaculture Microbial Technology*. Academic Press, USA. pp.153-207.
 21. Marklund, S. and Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), pp.469-474.
 22. Mirghaed, A.T., Hoseini, S.M., Hoseinifar, S.H. and Van Doan, H., 2020. Effects of dietary thyme (*Zataria multiflora*) extract on antioxidant and immunological responses and immune-related gene expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*, 106, pp.502-509. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.08.002
 23. Mirghaed, A.T., Paknejad, H. and Mirzargar, S.S., 2020. Hepatoprotective effects of dietary *Artemisia (Artemisia annua)* leaf extract on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 527, pp.735443. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735443
 24. Oroji, E., Mehrgan, M. S., Rajabi Islami, H. and Sharifpour, I., 2021. Dietary effect of *Ziziphora clinopodioides* extract on zootechnical performance, immune response, and disease resistance against *Yersinia ruckeri* in *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Reports*, 21, pp.100827. DOI: 10.1016/j.aqrep.2021.100827
 25. Oskoi, S.B., Kohyani, A.T., Parseh, A., Salati, A.P. and Sadeghi, E., 2012. Effects of dietary administration of *Echinacea purpurea* on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(4), pp.1029-1034. DOI: 10.1007/s10695-011-9587-8
 26. Palermo, F.A., Cocci, P., Angeletti, M., Felici, A., Polzonetti-Magni, A.M. and Mosconi, G., 2013. Dietary *Aloe vera* components' effects on cholesterol lowering and estrogenic responses in juvenile goldfish, *Carassius auratus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(4),

- 0.5897/AJB10.2226
42. Yılmaz, S. and Ergün, S., 2018. Trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), I. Effects on haematological, serum biochemical, non-specific immune and head kidney gene expression responses. *Fish and Shellfish Immunology*, 78(1), pp.140-157. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.04.034
 43. Yin, P., Xie, S., Huo, Y., Guo, T., Fang, H., Zhang, Y. and Niu, J., 2019. Effects of dietary oxidized fish oil on growth performance, antioxidant defense system, apoptosis and mitochondrial function of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, 500(1), pp.347-358. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.09.009
 44. Yonar, M.E., Yonar, S.M., İspir, Ü. and Ural, M.Ş., 2019. Effects of curcumin on haematological values, immunity, antioxidant status and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*. *Fish and Shellfish Immunology*, 89(27), pp.83-90. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.03.038
 45. Yousefi, M., Farsani, M.N., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S.H. and Van Doan, H., 2021. The effects of dietary supplementation of mistletoe (*Viscum album*) extract on the growth performance, antioxidant, and innate, immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 536(2), pp.736385. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.736385
 46. Zargar, A., Taheri Mirghaed, A., Mirzargar, S.S., Ghelichpour, M., Yousefi, M. and Hoseini, S.M., 2020. Dietary ginger administration attenuates oxidative stress and immunosuppression caused by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 51(10), pp.4215-4224. DOI: 10.1111/are.14763
 - enzymes activity and blood biochemical parameters. *Natural Product Research*, 34(17), pp.2413-2423. DOI: 10.1080/14786419.2018.1538994
 34. Ringø, E. and Song, S., 2016. Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. *Aquaculture Nutrition*, 22(1), pp.4-24. DOI: 10.1111/anu.12349
 35. Rito, J., Viegas, I., Pardal, M.Â., Metón, I. and Baanante, I.V., Jones, J.G., 2019. Utilization of glycerol for endogenous glucose and glycogen synthesis in seabass (*Dicentrarchus labrax*): a potential mechanism for sparing amino acid catabolism in carnivorous fish. *Aquaculture*, 498, pp.488-495. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.066
 36. Van Hai, N., 2015. Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture, a review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), pp.592-597. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.05.026
 37. Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M. and Carrell, R.W., 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 85(2), pp.337-341.
 38. Wolf, J.C. and Wolfe, M.J. 2005. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology*, 33(1), pp.75-85. DOI: 10.1080/01926230590890187
 39. Wroblewski, L. and Ladue, M., 1955. LDH activity in blood. *Proceedings of Society Experimental Biology and Medicine*, 90, pp.210-213.
 40. Wu, Y., Wang, Y. and Nabi, X., 2019. Protective effect of *Ziziphora clinopodioides* flavonoids against H₂O₂-induced oxidative stress in HUVEC cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 117, pp.109156. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109156
 41. Yang, F.L., Li, X. S., He, B.X., Yang, Z.L., Li, G.H., Liu, P. and Li, J., 2011. Malondialdehyde level and some enzymatic activities in subclinical mastitis milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(28), pp.5534-5538. DOI: