

تأثیر عصاره پونه (*Mentha longifolia*) بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و شاخص‌های رشد ماهی کپور (*Cyprinus carpio*)

مهدی بنایی^{۱*}، بهزاد نعمت‌دوست حقی^۱، پروانه شوکت^۱

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبياء (ص) بهبهان، بهبهان، ایران، کدپستی: ۶۳۶۱۶-۴۷۱۸۹

تاریخ دریافت: ۲ اردیبهشت ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۱۵ شهریور ۱۳۹۵

چکیده

هدف از این مطالعه، ارزیابی پیش‌بالینی تأثیر تجویز عصاره آبی-الکلی پونه بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و شاخص‌های رشد ماهی کپور است. در این آزمایش، ۱۴۴ عدد ماهی کپور معمولی (با میانگین وزنی $87/85 \pm 10/75$ گرم) به مدت ۴۵ روز با غذای تجاری غنی‌شده با عصاره هیدروالکلی پونه در غلظت‌های ۰/۰ (کنترل)، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد به ازای هر کیلوگرم غذا تغذیه شدند. پس از گذشت ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز از آغاز آزمایش، ۹ ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی صید و از ساقه‌ی دمی آنها خون‌گیری شد. تلفاتی در بین ماهی‌ها در طی دوره آزمایش مشاهده نگردید. افزایش معنی‌داری در سطوح گلوکز، فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در ماهی‌های تحت تیمار ۰/۵ و ۱ درصد عصاره‌ی پونه در روز ۴۵ مشاهده شد ($P < 0/05$). سطح آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، کلسترول خون و آلبومین در روزهای ۳۰ و ۴۵ آزمایش در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های ۱ درصد عصاره‌ی پونه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$). همچنین افزایش معنی‌داری در سطح تری‌گلیسرید و کراتینین خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۱ درصد عصاره‌ی پونه در روز ۳۰ آزمایش دیده شد. درحالی‌که سطح گلبولین خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۱ درصد عصاره‌ی پونه در روز ۴۵ از آزمایش به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$)؛ اما فعالیت آنزیم کراتین فسفوکیناز (CPK) تنها در روز ۱۵ آزمایش به‌طور معنی‌داری در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۰/۱ درصد عصاره‌ی پونه افزایش یافت. تجویز ۰/۵ و ۱ درصد از عصاره‌ی پونه سبب کاهش نرخ رشد ویژه، وزن به‌دست‌آمده و وزن نهایی در روز ۳۰ و ۴۵ آزمایش و افزایش معنی‌داری ضریب تبدیل غذایی گردید. درحالی‌که بر اساس نتایج این تحقیق، تجویز عصاره‌ی پونه تأثیری بر شاخص چاقی ماهی‌ها نداشت. نتایج مطالعه پیش‌بالینی بررسی اثر عصاره پونه بر ماهی کپور معمولی حاکی از این است که تجویز پونه (در غلظت‌های بیش از ۵ گرم) می‌تواند با ایجاد سمیت سلولی بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و شاخص‌های رشد ماهی‌ها تأثیری منفی داشته باشد.

کلمات کلیدی: فاکتورهای بیوشیمیایی، شاخص‌های رشد، پونه، کپور

مقدمه

باوجود تمامی مزایای استفاده از آنتی بیوتیک ها در درمان و پیشگیری از بیماری های آبرزیان، تحقیقات اخیر نشان می دهد که بقایای آنتی بیوتیک های موجود در لاشه ماهی ها، می تواند منجر به پیدایش سویه های مقاوم در بدن مصرف کنندگان گردد و به یک مانع بزرگ زیستی در درمان بسیاری از بیماری های باکتریایی که در درمان آنها از آنتی بیوتیک های مشابه استفاده می شود، بدل گردد. عصاره های گیاهی غالباً به دلیل دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف با خاصیت آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی، به صورت سنتی در درمان و کنترل برخی از بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرند (Frankič *et al.*, 2009). لذا در طی سال های اخیر استفاده از گیاهان دارویی در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری های آبرزیان (Harikrishnan, *et al.*, 2010) و همچنین افزایش و تقویت توان سیستم ایمنی ماهی ها بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است (Ardó *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2009; Dorucu *et al.*, 2009; Bilen and Bulut, 2010; Asadi *et al.*, 2012; Ahmadi *et al.*, 2012a). تأثیر سینرژیک استفاده توأم از عصاره گیاهان دارویی و داروهای سنتتیک، واکسن ها و نیز ترکیبات محرک ایمنی از دیگر مزایای استفاده از عصاره گیاهان دارویی در فارماکولوژی دامپزشکی است. بسیاری از این ترکیبات ممکن است با ضد عفونی کردن سیستم گوارش، تحریک اشتها و همچنین تحریک پانکراس جهت افزایش سطح سنتز و ترشح آنزیم های گوارشی، قابلیت هضم و گوارش را در جانوران افزایش دهند (نوبخت و همکاران، ۱۳۹۲).

یکی از گیاهان دارویی پر کاربرد در طب سنتی ایران، گیاه پونه *Mentha longifolia* (L.) Huds. از خانواده Lamiaceae است (Sher and Khan,

2007)؛ و برگ ها و جوانه های تازه ی آن به دلیل داشتن ترکیبات بیوشیمیایی مختلفی از جمله اسید سینامیک، اگلیکون، گلیکوزاید یا فلاونوئیدهای استیل شده و استرادیول های گلیکوزایدی و روغن های ضروری نظیر ۱،۸- کینول، منتول، کاروون، لیمونن، اکسید پیریتون، بتا کاریوفیلن، اپوکسید ترانس پیپتریتون و پولگون (جدول ۱) دارای خاصیت ضد قارچی، ضد التهابی، ضد میکروبی، گندزدایی و ضد عفونی کنندگی و آنتی اکسیدانی است (Ali *et al.*, 2010; Koliopoulos *et al.*, 2002) و در دفع حشرات موزی، درمان اختلال گوارشی، بی اشتها و اختلالات کبدی و درمان تب، سردرد، ناراحتی های گوارشی و سوء هاضمه و نیز به عنوان طعم دهنده در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می گیرد (Ahmad *et al.*, 2012b).

خاصیت ضد باکتریایی ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در اسانس پونه و مکانیسم باکتریسیدی آنها به وجود ترکیبات فعال مونوترپنی به ویژه پولگون، منتول و ۱-۸ سینئول (محمودی و همکاران، ۱۳۹۰) و پتانسیل آنها در پیشگیری از رشد باکتری ها و همچنین تخریب غشای سلولی آنها نسبت داده می شود (Hafedh *et al.*, 2007). اثر ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی اسانس بسیاری از گونه های پونه علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی (Moreno *et al.*, 2002) نظیر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی (رضایی و رسولی، ۱۳۷۹) و هلیکوباکتر پیلوری (نوری زاده و همکاران، ۱۳۸۳)، باسیلوس ها و برخی از گونه های قارچی نظیر آسپرژیلوس، فوزاریوم و پنی سیلیوم (Gulluce *et al.*, 2007) مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است. از این رو این گیاه ممکن است کاندیدای مناسبی برای بدل شدن به یک داروی گیاهی قابل

هدف از این مطالعه بررسی اثرات پیش‌بالینی تجویز نسبت‌های مختلف عصاره پونه به‌صورت خوراکی بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی کپور معمولی به‌منظور امکان‌سنجی استفاده از این گیاه در جیره غذایی به‌عنوان یک داروی احتمالی یا افزودنی خوراکی است؛ تا بدین ترتیب احتمال وجود هرگونه تأثیر سوء ناشی تجویز عصاره پونه بر ماهی‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

ماهی

۱۴۴ عدد ماهی کپور معمولی (با میانگین وزنی 10.75 ± 8.87 گرم) به‌طور تصادفی در ۱۲ مخزن فایبرگلاس (۲۰۰ لیتری) مجهز به هواده و با تعویض روزانه ۲۰ درصدی آب توزیع گردید. پیش از شروع آزمایش، ماهی‌ها به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاهی ($22 \pm 2^\circ\text{C}$ دمای، دوره‌ی نوری L/D ۸، اکسیژن 1 ± 6 mg/L، سختی 20 ± 40 بر اساس کربنات کلسیم، 7.4 ± 0.2 pH)، آزمایشگاه تکثیر و پرورش دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست دانشگاه خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان، سازگار گردیدند. در طی دوره‌ی سازگاری ماهی‌ها با جیره‌ی تجاری کپور به‌صورت دو بار در روز و در حد سیری تغذیه شدند.

عصاره گیاه پونه

گیاه پونه *Mentha longifolia* (L.) Huds. به‌صورت خشک از عطاری خریداری گردید. سپس با آسیاب برقی پودر گردید. پس از الک کردن پودر پونه، به ترتیب جهت تهیه عصاره‌ی ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصدی، مقدار ۱۰۰ گرم از پودر پونه با ۳۰۰ سی‌سی

تجویز در آبی‌پروری باشد. با این وجود، اگر مبنای انتخاب این گیاه مانند اغلب گیاهان دارویی در تحقیقات صورت گرفته بر روی آبی‌زیان بر اساس خواص درمانی آنها باشد ممکن است در دستیابی به هدف مطلوب چندان موفق نباشیم؛ زیرا این گیاه به دلیل داشتن ترکیباتی مانند منتول و پولگون ممکن است برای ماهی‌ها سمی باشد. از سویی دیگر این گیاه می‌تواند با تأثیر بر سیستم تولیدمثلی جانوران نر و کاهش میل جنسی، سنتز و ترشح هورمون‌های دخیل در کنترل بلوغ و رسیدگی جنسی (شریعتی و همکاران، ۱۳۹۰) در روند تکثیر و تولیدمثل ماهی‌ها نیز اختلال به وجود آورد. از این رو توجه به جنبه‌های سم‌شناسی دارویی، به‌ویژه انجام هرگونه آزمایش پیش‌بالینی استاندارد و تعیین سلامت دارویی پیش از تجویز گیاه موردنظر به‌عنوان یک داروی جدید امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر است.

لذا پیش از تجویز عملی یک ترکیب به‌عنوان دارو می‌بایست با انجام یک سری آزمایش‌های متداول، جنبه‌های مختلف فارماکولوژی و سم‌شناسی ترکیب موردنظر بر اندام‌های هدف مورد بررسی قرار گیرد؛ اما از آنجایی که پایش و ارزیابی سلامت و عملکرد صحیح این اندام‌ها به‌ویژه در زمانی که مشاهده‌ی مستقیم تغییرات در بافت‌ها در موجود زنده مقدور نبوده و مشکل است، می‌توان با ارزیابی تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی خون، به اطلاعات نسبتاً کاملی از وضعیت فیزیولوژیکی سلول‌ها و بافت‌ها به‌ویژه بافت کبد، دست‌یابییم. این اطلاعات می‌تواند در ارزیابی تأثیر دارویی و سم‌شناسی دارویی به‌منظور تعیین دوز غیر سمی دارو مفید باشد (Banacee et al., 2011).

الکل اتیلیک و ۳۰۰ سی سی آب مقطر (به نسبت ۱ به ۱) مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۴۸ ساعت بر روی دستگاه شیکر قرار داده شد. سپس، عصاره هیدرو الکلی به وسیله کاغذ صافی، صاف گردید. سپس با قرار

دادن عصاره هیدرو الکلی در انکوباتور با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، عصاره تغلیظ و در نهایت عصاره خشک تهیه شد. سپس به ترتیب ۱، ۵ و ۱۰ گرم از عصاره خشک به جیره غذایی ماهی ها افزوده گردید.

جدول ۱: ترکیب فیتوشیمیایی عصاره پونه ی *Mentha longifolia* L. (Mahmoudi, 2014).

نام ترکیب	درصد	نام ترکیب	درصد
آلفاپینن	۱/۸۶	کامفن	۰/۵۷
سابینن	۰/۵۲	۲- بتاپینن	۳/۰۷
بنامیرسن	۰/۵۰	۳- اکتانول	۰/۶۰
۱، ۸- سینئول	۱۵/۸۹	پارامنتا ۳، ۸ دین	۰/۵۴
ایزوپنتیل ۲- منتیل- بوتانوات	۰/۹۱	پارامنت ۳ ان ۸ ال	۷
منتوفوران	۱۱/۱۸	سیس ایزو پولگون	۹/۷۴
بورنئول	۱/۰۱	نئو ایزو دی هیدرو کاروئول	۱/۷۸
پولگون	۳۱/۵۴	۲ سیکلو هگزان ۱ وان	۳/۸۰
۱ دسن	۱/۵۸	پیپریتونون اکساید	۰/۳۴
سیس جاسمون	۰/۴۰	۱، ۴ بنزن دی آمین	۰/۳۵
اسپاتولنون	۰/۵۲	کاریوفیلن اکساید	۱/۶۰

طرح آزمایش

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تیمار آزمایشی و ۱ گروه کنترل شامل ماهی های تحت تیمار غذای تجاری غنی شده با عصاره هیدرو الکلی پونه در غلظت های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد به ازای هر کیلو گرم غذای تجاری و هر یک با ۳ تکرار انجام گرفت. ماهی ها روزانه ۲ بار و در حد سیری با جیره های غذایی فوق تغذیه شدند. پس از گذشت ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز از آغاز آزمایش، ۹ ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی صید و پس از بی هوش نمودن آنها با محلول پودر گل میخک (۲۰۰ میلی گرم در لیتر)، از ساقه ی دمی آنها با استفاده از سرنگ های خلاء دار حاوی

ماده ی ضد انعقاد هپارین خون گیری شد (Nafisi Bahabadi et al., 2014).

فاکتورهای بیوشیمیایی خون

پس از خون گیری از کمان خونی ساقه ی دمی ماهی ها، خون به درون اپندروف ۲ میلی لیتری ریخته شد و پس از سانتریفیوژ آنها با دستگاه میکروسانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، پلاسما تهیه گردید. پلاسما ی به دست آمده نیز تا انجام مراحل آزمایش های بیوشیمیایی در فریزر ۲۱- درجه ی سانتی گراد نگهداری گردید (Nafisi Bahabadi, et al., 2014). اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون با استفاده از کیت های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و

مرحله از نمونه برداری بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

$$\text{SGR} = \frac{\text{Ln (وزن نهایی بدن)} - \text{Ln (وزن اولیه بدن)}}{\text{طول دوره آزمایش}} \times 100$$

$$\text{FCR} = \frac{\text{غذای دریافتی (g)}}{\text{وزن تر بدست آمده (g)}} \times 100$$

$$\text{CF} = \frac{\text{وزن نهایی}}{\text{طول نهایی}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل آمار

تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) انجام گرفت. نرمال بودن داده‌ها نیز بر اساس آزمون Kolmogorov-Smirnov Normality Test با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19 انجام و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۹٪ ($\alpha = 0.01$) صورت گرفت.

نتایج

در طی دوره‌ی آزمایش هیچ گونه تلفاتی در بین ماهی‌های تحت تیمار جیره‌ی حاوی عصاره‌ی پونه مشاهده نگردید. افزایش چشمگیری در حجم کیسه‌ی صفرا در ماهی‌های تحت تیمار جیره‌ی حاوی عصاره‌ی پونه، مهم‌ترین تغییر بالینی مشاهده‌شده در طی دوره‌ی آزمایش بود. با توجه به محتویات سیستم گوارش و

با دستگاه اسپکتروفتومتری UV/Vis (مدل ۲۱۰۰ یونیکو آمریکا) صورت گرفت. سطح پروتئین تام پلاسما بر اساس واکنش فیلو-درونیو-پیکرین (۵۴۰ نانومتر، $\text{OD} = \frac{\text{وزن بدست آمده}}{\text{آلبومین پلاسما بر اساس واکنش برموکرزول گرین و}} \times 100$) در طول موج ۶۳۰ نانومتر، گلبولین پلاسما بر اساس نسبت آلبومین از پروتئین تام پلاسما (Johnson *et al.*, 1999)، گلوکز پلاسما بر اساس روش آنزیمی گلوکز اکسیداز و در طول موج ۵۰۰ نانومتر، سطح کلسترول پلاسما نیز به روش آنزیمی (CHO-PAP) در طول موج ۵۱۰ نانومتر و تری گلیسرید بر اساس روش آنزیمی GPO-PAP و در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Thomas, 1998). کراتینین به روش Jaffe و پس از واکنش با اسید پیکریک در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Foster-Swanson *et al.*, 1994). سطح فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز پلاسما بر اساس مقدار مصرف NADPH و تبدیل آن به NAD^+ در طول موج ۳۴۰ نانومتر، لاکتات دهیدروژناز پلاسما بر اساس تبدیل پیرووات به لاکتات در طول موج ۳۴۰ نانومتر، آلکالین فسفاتاز بر اساس تبدیل نیتروفنیل فسفات به نیتروفنول و فسفات و در طول موج ۴۰۵ نانومتر تعیین و بر اساس میزان جذب نوری OD و فرمول ارائه‌شده در دستورالعمل کیت‌ها محاسبه گردید (Moss and Henderson, 1999).

شاخص‌های رشد

شاخص‌های مختلف رشد، وزن نهایی، درصد وزن به‌دست آمده، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی نیز پس از ریخت سنجی و وزن‌کشی ماهی‌ها، در پایان هر

رفتار تغذیه‌ی ماهی‌ها، تغییری در اشتتهای ماهی‌ها نیز مشاهده نگردید. وزن نهایی ماهی‌های تحت تیمار ۰/۵ درصد از عصاره‌ی پونه در روز ۴۵ آزمایش کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد. نرخ رشد ویژه و وزن به‌دست‌آمده در روزهای ۳۰ و ۴۵ آزمایش کاملاً معنی‌دار است.

جدول ۲: وزن اولیه، وزن نهایی و شاخص‌های رشد ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پونه

فاکتورهای رشد	نسبت‌های مختلف عصاره پونه (گرم)	روز اول	روز پانزدهم	روز سی‌ام	روز چهل و پنجم
وزن اولیه (گرم)	کنترل (صفر)	$89/37 \pm 11/88^a$			
	۱	$86/13 \pm 11/91^a$			
	۵	$86/07 \pm 10/82^a$			
	۱۰	$89/77 \pm 8/10^a$			
وزن نهایی (گرم)	کنترل (صفر)		$104/5 \pm 10/93^a$	$112/50 \pm 7/84^a$	$115/5 \pm 17/97^b$
	۱		$110/10 \pm 6/47^a$	$112/86 \pm 19/5^a$	$114/89 \pm 17/4^b$
	۵		$99/76 \pm 11/65^a$	$103/1 \pm 14/16^a$	$90/52 \pm 11/28^a$
	۱۰		$102/12 \pm 11/7^a$	$110/22 \pm 8/01^a$	$92/84 \pm 6/96^{ab}$
درصد وزن به‌دست‌آمده	کنترل (صفر)		$20/82 \pm 4/73^b$	$24/81 \pm 2/73^b$	$30/10 \pm 5/10^b$
	۱		$18/36 \pm 2/90^{ab}$	$27/63 \pm 44/40^b$	$35/85 \pm 17/20^b$
	۵		$13/78 \pm 1/17^a$	$11/49 \pm 4/36^a$	$9/22 \pm 3/32^a$
	۱۰		$16/38 \pm 3/44^{ab}$	$14/91 \pm 3/74^a$	$7/24 \pm 3/83^a$
نرخ رشد ویژه	کنترل (صفر)		$1/26 \pm 0/25^b$	$0/74 \pm 0/07^b$	$0/58 \pm 0/09^b$
	۱		$1/12 \pm 0/16^{ab}$	$0/81 \pm 0/12^b$	$0/67 \pm 0/27^b$
	۵		$0/86 \pm 0/07^a$	$0/36 \pm 0/13^a$	$0/20 \pm 0/07^a$
	۱۰		$1/01 \pm 0/20^{ab}$	$0/46 \pm 0/11^a$	$0/15 \pm 0/08^a$
ضریب تبدیل غذایی	کنترل (صفر)		$2/09 \pm 0/39^a$	$2/04 \pm 0/20^a$	$1/70 \pm 0/25^a$
	۱		$2/34 \pm 0/36^a$	$1/85 \pm 0/31^a$	$1/66 \pm 0/70^a$
	۵		$3/07 \pm 0/27^b$	$4/90 \pm 1/92^b$	$6/23 \pm 2/72^b$
	۱۰		$2/67 \pm 0/60^{ab}$	$3/54 \pm 0/92^{ab}$	$8/10 \pm 2/82^b$
شاخص چاقی (فاکتور وضعیت)	کنترل (صفر)		$5/73 \pm 0/19^a$	$4/82 \pm 0/14^a$	$4/53 \pm 0/30^{ab}$
	۱		$5/61 \pm 0/47^a$	$5/08 \pm 0/21^a$	$5/09 \pm 0/54^b$
	۵		$6/50 \pm 1/05^a$	$5/09 \pm 0/63^a$	$4/12 \pm 0/56^a$
	۱۰		$6/25 \pm 0/58^a$	$5/27 \pm 0/63^a$	$3/89 \pm 0/33^a$

داده‌ها به‌صورت $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ در جداول ارائه شده است. اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف نیز با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است.

ضریب تبدیل غذایی در ماهی‌های تحت تیمار ۰/۵ درصد از عصاره‌ی پونه در طول دوره‌ی آزمایش افزایش معنی‌داری داشت. تغذیه ماهی‌ها با جیره‌ی حاوی ۱ درصد عصاره‌ی پونه در روز ۴۵ آزمایش سبب افزایش معنی‌دار ضریب تبدیل غذایی گردید. نتایج نشان می‌دهد که تجویز عصاره‌ی پونه تأثیری بر شاخص چاقی ماهی‌ها ندارد (جدول ۲).

اگرچه پس از گذشت ۱۵ و ۳۰ روز تغییر معنی‌داری در سطح گلوکز خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پونه مشاهده نگردید؛ اما پس از ۴۵ روز از شروع آزمایش، سطح گلوکز خون ماهی‌هایی که با جیره‌ی غذای غنی‌شده با ۰/۵ و ۱ درصد عصاره‌ی پونه به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) افزایش یافت (جدول ۳).

در طول دوره‌ی آزمایش، تغییر معنی‌داری ($P > 0/05$) در سطح پروتئین تام خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پونه مشاهده نگردید. در روزهای ۳۰ و ۴۵ آزمایش، سطح آلبومین در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۱ درصد عصاره‌ی پونه در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$). نتایج نشان می‌دهد، سطح گلبولین خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۱ درصد از عصاره‌ی پونه در روز ۴۵ از آزمایش به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$). این در حالی است که سطح گلبولین خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ درصد تغییر معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل در طول دوره آزمایش نداشته است (جدول ۳).

اگرچه، تغییر معنی‌داری ($P > 0/05$) در سطح کلسترول خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پونه در روز ۱۵ آزمایش مشاهده نگردید؛ اما سطح کلسترول در خون ماهی‌هایی که با جیره‌ی غنی‌شده با غلظت ۱٪ عصاره پونه تغذیه شدند در روز ۳۰ و ۴۵ آزمایش به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$). سطح کلسترول در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۰/۱ درصد عصاره پونه در روز ۳۰ آزمایش، به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0/05$).

سطح کراتینین خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۱ درصد عصاره‌ی پونه در روز ۳۰ آزمایش به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۳).

در روز ۱۵ آزمایش، تغییر معنی‌داری ($P > 0/05$) در سطح فعالیت آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پونه مشاهده نگردید؛ اما سطح فعالیت آنزیم AST در روزهای ۳۰ و ۴۵ آزمایش در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد عصاره‌ی پونه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$).

در روزهای ۱۵ و ۳۰ آزمایش، تغییر معنی‌داری ($P > 0/05$) در سطح فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پونه مشاهده نگردید؛ اما سطح فعالیت آنزیم ALT در روز ۴۵ آزمایش در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد عصاره‌ی پونه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$).

جدول ۳: تغییرات سطوح فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پونه

روزهای نمونه‌برداری			نسبت‌های مختلف عصاره پونه (گرم)	فاکتورهای بیوشیمیایی خون
۴۵	۳۰	۱۵		
$55/70 \pm 9/31^a$	$85/14 \pm 13/84^a$	$88/80 \pm 10/56^a$	کنترل (صفر)	
$66/71 \pm 5/55^a$	$81/32 \pm 8/76^a$	$77/73 \pm 13/77^a$	۱	گلوکز
$86/72 \pm 9/77^b$	$82/58 \pm 11/51^a$	$82/98 \pm 7/46^a$	۵	(میلی گرم بر دسی لیتر)
$95/54 \pm 7/76^b$	$99/86 \pm 11/25^a$	$88/75 \pm 8/41^a$	۱۰	
$3/83 \pm 0/28^a$	$3/31 \pm 0/17^a$	$3/60 \pm 0/54^a$	کنترل (صفر)	
$4/15 \pm 0/41^a$	$2/85 \pm 0/29^a$	$3/34 \pm 0/11^a$	۱	پروتئین تام
$3/69 \pm 0/44^a$	$3/37 \pm 0/34^a$	$3/48 \pm 0/34^a$	۵	(گرم بر دسی لیتر)
$3/89 \pm 0/37^a$	$3/34 \pm 0/49^a$	$3/13 \pm 0/22^a$	۱۰	
$1/87 \pm 0/33^a$	$2/03 \pm 0/12^{bc}$	$2/17 \pm 0/19^b$	کنترل (صفر)	
$1/75 \pm 0/23^a$	$1/63 \pm 0/08^a$	$1/76 \pm 0/13^a$	۱	آلبومین
$2/38 \pm 0/17^b$	$1/96 \pm 0/06^b$	$1/91 \pm 0/20^{ab}$	۵	(گرم بر دسی لیتر)
$2/90 \pm 0/25^c$	$2/28 \pm 0/34^c$	$1/91 \pm 0/18^{ab}$	۱۰	
$1/95 \pm 0/58^{bc}$	$1/28 \pm 0/22^a$	$1/43 \pm 0/38^a$	کنترل (صفر)	
$2/41 \pm 0/26^c$	$1/22 \pm 0/26^a$	$1/58 \pm 0/07^a$	۱	گلوبولین
$1/31 \pm 0/58^{ab}$	$1/42 \pm 0/35^a$	$1/57 \pm 0/48^a$	۵	(گرم بر دسی لیتر)
$1/00 \pm 0/39^a$	$1/06 \pm 0/30^a$	$1/22 \pm 0/29^a$	۱۰	
$128/73 \pm 25/27^a$	$111/54 \pm 7/48^a$	$120/02 \pm 20/31^a$	کنترل (صفر)	
$136/31 \pm 12/21^{ab}$	$137/19 \pm 21/75^b$	$116/86 \pm 15/69^a$	۱	کلسترول
$137/91 \pm 17/33^{ab}$	$124/22 \pm 22/05^{ab}$	$120/59 \pm 18/61^a$	۵	(میلی گرم بر دسی لیتر)
$151/53 \pm 34/46^b$	$139/29 \pm 20/30^b$	$110/07 \pm 13/81^a$	۱۰	
$229/74 \pm 10/55^b$	$195/35 \pm 49/24^a$	$210/31 \pm 30/29^a$	کنترل (صفر)	
$184/50 \pm 39/62^a$	$204/28 \pm 14/45^a$	$175/30 \pm 14/92^a$	۱	تری گلیسرید
$215/74 \pm 18/32^{ab}$	$236/28 \pm 29/75^{ab}$	$207/12 \pm 13/63^a$	۵	(میلی گرم بر دسی لیتر)
$247/10 \pm 23/63^b$	$255/75 \pm 15/40^b$	$200/14 \pm 25/65^a$	۱۰	
$0/94 \pm 0/07^a$	$0/73 \pm 0/07^a$	$1/06 \pm 0/24^a$	کنترل (صفر)	
$1/04 \pm 0/12^a$	$1/00 \pm 0/24^{ab}$	$1/07 \pm 0/23^a$	۱	کراتینین
$0/98 \pm 0/08^a$	$1/20 \pm 0/19^{bc}$	$1/11 \pm 0/19^a$	۵	(میلی گرم بر دسی لیتر)
$1/03 \pm 0/11^a$	$1/38 \pm 0/16^c$	$1/10 \pm 0/24^a$	۱۰	

داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ در جداول ارائه شده است. اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف نیز با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است.

در روز ۱۵ آزمایش، تغییر معنی‌داری ($P > 0.05$) در سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پونه مشاهده نگردید؛ اما افزایش معنی‌داری در سطح فعالیت آنزیم LDH در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های ۰/۵ درصد عصاره‌ی پونه در روز ۳۰ آزمایش مشاهده گردید. همچنین، سطح فعالیت آنزیم LDH در روزهای ۳۰ و ۴۵ آزمایش در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های ۱ درصد عصاره‌ی پونه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$).

جدول ۴: تغییرات سطوح فعالیت آنزیم‌های پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پونه

روزهای نمونه‌برداری			نسبت‌های مختلف عصاره پونه (گرم)	آنزیم‌های پلازما
۴۵	۳۰	۱۵		
۷۷/۰۵±۲۱/۰۷ ^a	۶۲/۸۵±۱۷/۶۳ ^a	۸۵/۰۸±۱۱/۱۷ ^a	کنترل (صفر)	
۷۲/۹۳±۵/۷۴ ^a	۷۸/۸۶±۱۳/۸۲ ^a	۷۹/۳۸±۵/۱۲ ^a	۱	آسپارات آمینوترانسفراز
۱۱۳/۵۰±۱۳/۲۰ ^b	۱۰۸/۵۰±۱۲/۲۶ ^b	۸۶/۵۱±۸/۵۲ ^a	۵	(واحد بین‌المللی بر لیتر)
۱۲۸/۳۷±۱۷/۰۲ ^b	۱۱۰/۷۶±۱۵/۳۳ ^b	۹۰/۷۲±۹/۷۴ ^a	۱۰	
۱۰/۲۱±۱/۰۳ ^a	۱۰/۹۵±۲/۶۱ ^a	۱۰/۵۶±۲/۱۴ ^a	کنترل (صفر)	آلانین آمینوترانسفراز
۹/۷۹±۱/۴۳ ^a	۹/۸۷±۱/۵۸ ^a	۱۰/۰۳±۱/۶۵ ^a	۱	(واحد بین‌المللی بر لیتر)
۱۸/۵۳±۱/۵۸ ^b	۱۱/۸۰±۱/۶۴ ^a	۱۰/۵۲±۱/۶۹ ^a	۵	
۲۱/۱۹±۱/۹۶ ^b	۱۲/۴۹±۲/۳۰ ^a	۱۱/۱۵±۲/۱۴ ^a	۱۰	
۸۰/۱۴±۱۱/۸۷ ^{ab}	۹۱/۶۶±۱۲/۸۵ ^a	۶۵/۶۳±۱۲/۸۴ ^b	کنترل (صفر)	آلکالین فسفاتاز
۷۸/۰۲±۱۵/۴۸ ^{ab}	۱۰۷/۵۷±۱۴/۷۰ ^{ab}	۴۵/۱۱±۶/۰۰ ^a	۱	(واحد بین‌المللی بر لیتر)
۶۴/۱۱±۸/۴۸ ^a	۱۳۵/۰۱±۲۹/۳۱ ^b	۴۵/۷۲±۴/۳۳ ^a	۵	
۹۲/۴۱±۹/۸۵ ^b	۱۲۵/۴۸±۱۹/۴۸ ^b	۵۰/۳۶±۴/۴۰ ^a	۱۰	
۲۶۱/۷۸±۲۵/۳۷ ^a	۲۳۵/۸۰±۲۴/۰۹ ^a	۲۱۹/۷۵±۳۵/۷۲ ^a	کنترل (صفر)	لاکتات دهیدروژناز
۲۴۲/۳۴±۲۷/۳۱ ^a	۳۰۴/۷۹±۵۰/۹۹ ^{ab}	۲۴۶/۴۶±۳۳/۱۹ ^a	۱	(واحد بین‌المللی بر لیتر)
۴۲۱/۷۰±۳۲/۳۹ ^b	۳۲۵/۲۳±۶۰/۳۴ ^b	۲۴۴/۳۸±۲۰/۹۵ ^a	۵	
۳۹۸/۰۲±۵۱/۶۶ ^b	۳۱۰/۸۲±۴۵/۰۴ ^{ab}	۲۳۶/۶۶±۳۳/۷۷ ^a	۱۰	
۱۱۴۱/۷۷±۱۶۵/۳۶ ^a	۸۴۵/۶۵±۱۲۳/۵۴ ^{ab}	۸۱۰/۷۱±۱۰۸/۴۵ ^a	کنترل (صفر)	کراتین فسفوکیناز
۹۹۴/۰۴±۱۶۷/۴۳ ^a	۷۹۷/۴۱±۷۴/۱۵ ^a	۱۲۰/۶۹±۱۶۱/۹۳ ^b	۱	(واحد بین‌المللی بر لیتر)
۱۱۵۷/۱۲±۱۷۲/۸۶ ^a	۱۰۲۵/۴۷±۱۸۴/۳۳ ^b	۱۰۱۴/۹۱±۲۸۷/۴۶ ^{ab}	۵	
۱۰۶۸/۰۰±۱۶۴/۴۸ ^a	۷۳۶/۴۲±۷۷/۴۷ ^a	۹۲۵/۰۵±۱۴۰/۱۷ ^a	۱۰	

داده‌ها به‌صورت mean±S.D. در جداول ارائه شده است. اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف نیز با حروف الفبای انگلیسی مشخص شده است.

سطح فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روز ۱۵ آزمایش به طور معنی داری در خون ماهی های تحت تیمار غلظت های مختلف عصاره ی پونه کاهش یافت؛ اما سطح فعالیت آنزیم ALP در روز ۳۰ آزمایش در خون ماهی های تحت تیمار غلظت های ۰/۵ درصد عصاره ی پونه و در روز ۴۵ آزمایش در خون ماهی های تحت تیمار غلظت های ۰/۵ و ۱ درصد عصاره ی پونه به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0.05$).

سطح فعالیت آنزیم کراتین فسفوکیناز در روز ۱۵ آزمایش به طور معنی داری در خون ماهی های تحت تیمار غلظت ۰/۱ درصد عصاره ی پونه افزایش یافت؛ اما تغییر معنی داری در سطح فعالیت آنزیم CPK در دیگر نمونه ها مشاهده نگردید (جدول ۴).

بحث

استفاده از ترکیبات جدید به عنوان دارو در جیره ی غذایی ماهی ها مستلزم تحقیقات و پژوهش های بسیاری بر روی تأثیر این ترکیبات بر وضعیت فیزیولوژیک و سلامت جانوران است. لذا، در این آزمایش پس از بررسی تغییر فاکتورهای بیوشیمیایی تأثیرات سم شناسی و فارماکولوژی عصاره گیاه پونه مورد بررسی قرار گرفت. در طول دوره ی آزمایش، مرگ و میر در هیچ یک از گروه های تحت تیمار و نیز گروه کنترل دیده نشد.

تغذیه ماهی ها با جیره ی غنی شده با ۰/۱ درصد عصاره پونه سبب بهبود فاکتورهای رشد در ماهی ها گردید. در حالی که وزن نهایی ماهی های تحت تیمار ۰/۵ درصد از عصاره ی پونه در روز ۴۵ آزمایش کاهش معنی داری یافت. کاهش نرخ رشد ویژه و وزن به دست آمده در ماهی های تحت تیمار ۰/۵ و ۱ درصد

از عصاره ی پونه در روزهای ۳۰ و ۴۵ آزمایش از دیگر تأثیرات عصاره پونه بر فاکتورهای رشد ماهی های کپور است. اگرچه وجود ترکیبات محرک رشد و فلاونوئیدها در بسیاری از گیاهان می تواند بر روی اشتها و رفتار تغذیه ماهی ها تأثیر بسزایی داشته باشد. اما وجود برخی ترکیبات و اسیدهای چرب سمی موجود در عصاره ی پونه سبب کاهش نرخ رشد در ماهی ها، شده است. به عبارتی دیگر ماهی ها، انرژی دریافتی از مواد غذایی را به جای آن که صرف رشد کنند، صرف برقرار هموستازی و مقابله با تأثیرات سمی ترکیبات موجود در عصاره پونه کرده اند.

افزایش ضریب تبدیل غذایی در ماهی های تحت تیمار ۱ درصد عصاره ی پونه نشان دهنده ی تأثیر تجویز عصاره پونه در کاهش کارایی بهره وری ماهی ها از مواد غذایی است. کاهش کارایی سیستم گوارشی و افزایش نیاز ماهی ها به انرژی بیشتر جهت مقابله با اثر مسمومیت با ترکیبات موجود در عصاره ی پونه سبب شده تا ضریب تبدیل غذایی در این ماهی ها افزایش یابد. اگرچه استفاده از عصاره ی پونه در جیره تأثیر معنی داری بر روی شاخص چاقی نداشته است؛ اما عصاره ی این گیاه تأثیری منفی بر دیگر شاخص های رشد ماهی ها داشته است.

تغییرات غلظت گلوکز در بسیاری از موارد با آسیب های وارده به کلیه ماهی ها و اختلالات کبدی مرتبط است (Banaee et al., 2011). افزایش سطح گلوکز خون ماهی هایی که با جیره ی غذای غنی شده با ۰/۵ و ۱ درصد عصاره ی پونه به مدت ۴۵ روز تغذیه شده اند حاکی از مسمومیت دارویی یا غذایی این ماهی ها است. این افزایش را می توان به مسمومیت با پولگون و منتوفوران موجود در عصاره پونه و نکرور

بافت هیپاتوپانکراس ماهی‌ها نسبت داد. با افزایش غلظت و دوره زمانی تجویز، تأثیر دیگر مواد موجود در عصاره پونه نظیر منتول، ۸،۱-سینول، پنن، پیریدین و پیریدین اکسید ممکن است سبب افزایش انرژی‌خواهی سلولی جهت مقابله با اثرات سمیت سلولی ناشی از تجویز غلظت بیش‌ازحد دارو گردد. لذا افزایش سطح گلوکز خون در چنین شرایطی طبیعی به نظر می‌رسد. افزایش سطح گلوکز خون یا هیپرگلیسمی همچنین نشان‌دهنده‌ی بروز اختلال در روند متابولیسم کربوهیدرات‌ها است که معمولاً ناشی از افزایش تجزیه گلیکوژن کبدی است. به عبارتی دیگر کاهش ذخایر گلیکوژن کبدی و افزایش گلوکز خون یکی از معمولی‌ترین واکنش‌های ماهی‌ها در مسمومیت است (Banaee et al., 2011). درواقع در چنین شرایطی، گلوکز ۶- فسفات حاصل از تجزیه‌ی گلیکوژن کبدی، به‌وسیله‌ی گلوکز ۶- فسفاتاز هیدرولیز شده و گلوکز حاصل به داخل خون آزاد می‌گردد. کاهش فعالیت آنزیم G6PDH در کبد و نیز گلوکز خون در موش-های تحت تیمار پولگون و منتوفوران مشاهده‌شده است (Madyastha and Raj, 1994; Vadiraja et al., 1998). مشابه این وضعیت در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمانی که با غلظت ۸۰۰ میلی گرم سیلی‌مارین تغذیه شدند نیز مشاهده‌شده است (Banaee et al., 2011). این در حالی است که تجویز عصاره‌ی بومادران به‌صورت خوراکی به ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان تأثیری بر روی سطح گلوکز خون ماهی‌ها نداشته است (Nafisi Bahabadi et al., 2014). کاهش سطح گلوکز خون ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss*، تحت تیمار غلظت‌های پایین‌تر از ۴۰۰ میلی گرم عصاره سیلی‌مارین

(*Silybum marianum* L.) (Banaee et al., 2011) و نیز گربه‌ماهی‌های *Clarias lazera*، تحت تیمار عصاره پیاز (*Allium cepa*) و سیر (*Allium sativum*) (Al-Salahy, 2002) قرار گرفته‌اند نیز گزارش شده است. سلول‌های پارانشیم بافت کبد مسئول سنتز پروتئین‌های پلاسما است که شامل آلبومین‌ها، فیبرینوژن، فاکتورهای انعقادی و گلوبولین‌ها می‌شود. سطح پروتئین تام پلاسما نیز متأثر از ذخیره پروتئینی بافت‌ها، به‌ویژه بافت کبد است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز خوراکی عصاره پونه تأثیری بر سطح پروتئین تام خون ماهی‌های نداشته است. درحالی‌که تجویز عصاره آبی الکلی پونه به موش‌های آزمایشی سبب کاهش معنی‌دار پروتئین کل و آلبومین گردید (مختاری و همکاران، ۱۳۸۷). پولگون و منتوفوران با باند شدن به ماکرومولکول‌ها به‌ویژه پروتئین‌ها در بافت کبد، شش و کبد سبب ایجاد سمیت سلولی می‌گردد. لذا شدت مسمومیت ایجادشده به میزان دسترسی زیستی سلول‌ها به پولگون و منتوفوران و نیز باند شدن آنها به پروتئین‌های سلولی بستگی دارد (National Toxicology Program, 2011). از آنجایی‌که آلبومین در انتقال داروها در گردش خون جانوران نقش دارند، لذا افزایش سطح آلبومین در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۱ درصد عصاره‌ی پونه در روزهای ۳۰ و ۴۵ آزمایش، می‌تواند روند توزیع ترکیبات مؤثر پونه را در خون افزایش دهد. لذا افزایش آلبومین ممکن است سبب افزایش سطح دسترسی زیستی پولگون و منتوفوران برای بافت‌های مختلف گردد. افزایش نسبی سطح آلبومین در ماهی‌های تحت تیمار مکمل دارویی سیلی‌مارین (Banaee et al., 2011)، عصاره بومادران

(Nafisi Bahabadi *et al.*, 2014) و گل ختمی (بنایی و همکاران، ۱۳۹۳) نیز گزارش شده است.

گلوبولین‌ها، دومین گروه از پروتئین‌های تام پلاسمایی می‌باشند که شامل سه دسته آلفا گلوبولین، بتا گلوبولین و گاما گلوبولین می‌شود. آلفا و بتا گلوبولین به‌عنوان پروتئین‌های حامل عمل می‌کنند و گاما گلوبولین نقش بسزایی در فعالیت‌های ایمنولوژیکی جانوران ایفا می‌کنند. کاهش سطح گلوبولین خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۱ درصد از عصاره‌ی پونه در روز ۴۵ از آزمایش ممکن است نشان‌دهنده کاهش سطح گلوبولین‌های حامل و یا گاما گلوبولین‌های فعال در سیستم ایمنی ماهی باشد. این در حالی است که تجویز برخی از ترکیبات گیاهی نظیر بومادران (Nafisi Bahabadi *et al.*, 2014) و عصاره سیلی‌مارین (Banaee *et al.*, 2011) به ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش نسبی سطح گلوبولین و تقویت سیستم ایمنی آنها گردید. نتیجه مطالعات Al-Salahy (۲۰۰۲) نشان می‌دهد که تغذیه گربه‌ماهی با جیره‌ی غذایی غنی شده با عصاره پیاز و سیر، تغییر معنی‌داری در سطح آلبومین و پروتئین تام ایجاد نکرد.

افزایش سطح کلسترول در خون ماهی‌هایی که با جیره‌ی غنی شده با غلظت ۱ و ۰/۱ درصد عصاره پونه تغذیه شدند در روز ۳۰ و ۴۵ آزمایش ممکن است نشان‌دهنده‌ی بروز سمیت سلولی، پراکسیداسیون لیپیدی و اختلالات کبدی در ماهی‌ها در اثر مسمومیت با پولگون موجود در عصاره پونه باشد. انسداد مجاری صفراوی، مسمومیت کبدی، اختلال در عملکرد پانکراس و حتی افزایش گلوکز خون، تخریب ساختار غشاهای زیستی از جمله غشای سلول‌های عصبی می‌تواند عامل افزایش کلسترول پلاسما باشد (Banaee

2011 *et al.*). در شرایطی که ماهی‌ها تحت استرس ناشی از مسمومیت غذایی با ترکیبات ضد تغذیه‌ای موجود در عصاره‌ی پونه قرار گرفته‌اند، افزایش گلوکز خون و اختلال در عملکرد پانکراس، می‌تواند موجب افزایش اکسیداسیون گلوکز در بافت‌ها و به تبعیت آن افزایش سطح کلسترول گردد. گلوکز در مسیر گلیکولیز به پیرووات تبدیل می‌شود و پیرووات نیز در بافت‌های هوازی به استیل CoA متابولیزه می‌شود که می‌تواند به‌عنوان پیش ساز اسیدهای چرب و کلسترول در چرخه‌ی اسیدسیتریک عمل نماید (Murray *et al.*, 2003).

افزایش سطح تری‌گلیسرید خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۱ درصد عصاره‌ی پونه در روز ۳۰ آزمایش نیز می‌تواند نشان‌دهنده‌ی مسمومیت ماهی‌ها باشد. این در حالی است که ممکن است عصاره‌ی برخی از گیاهان، از طریق افزایش سطح فعالیت آنزیم ۷ آلفا کلسترول‌هیدروکسیلاز در سلول‌های کبدی موجب افزایش دفع میزان کلسترول و کاهش سنتز کلسترول سلولی شوند. کاهش سطح کلسترول و تری‌گلیسرید در خون ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان و گربه‌ماهی که به ترتیب تحت تیمار عصاره سیلی‌مارین (Banaee *et al.*, 2011)، بومادران (Nafisi Bahabadi *et al.*, 2014) و عصاره پیاز و سیر (Al-Salahy, 2002) از جمله‌ی این موارد است.

کراتینین یک محصول کاتابولیک کراتین فسفات عضلانی است، که در انقباض عضلات اسکلتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کراتینین در نتیجه دهیدراسیون غیر آنزیمی و غیرقابل برگشت در ماهیچه‌ها و همچنین در پی حذف فسفات از کراتین فسفات تولید می‌شود و پس از آزاد شدن به داخل مایع خارج سلولی، از طریق

کلیه‌ها دفع می‌گردد (Murray *et al.*, 2003). افزایش سطح کراتینین خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۱ درصد عصاره‌ی پونه در روز ۳۰ آزمایش ممکن است ناشی از افزایش فرایند تجزیه فسفوریل کراتین حاصل از فسفوریله شدن کراتین، در خون و یا اختلال در فرایند دفع کلیوی کراتینین در این ماهی‌ها باشد. اختلال در فعالیت فیلتراسیون گلومرولی و افزایش سطح کراتینین در خون ماهی‌های تحت تیمار دارویی ۸۰۰ میلی گرم سیلی مارین، نیز به وسیله‌ی Banaee و همکاران (۲۰۱۱) گزارش گردید.

نقش سیتوکروم P450 در سم‌زدایی و متابولیسم پولگون بسیار حائز اهمیت است. اکسیداسیون پولگون به ۹-هیدروکسی پولگون و سپس به منتوفوران و نیز تولید ۸-پولگون الدهید سبب افزایش رادیکال‌های آزاد شده و شرایط را برای پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی مهیا می‌کند (National Toxicology Program, 2011; Kamatou *et al.*, 2013). از این‌رو در اثر آسیب به غشای سلولی ممکن است آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) که در داخل میتوکندری سلول‌ها در بافت‌های مختلفی نظیر کبد، قلب، ماهیچه‌های اسکلتی، کلیه، پانکراس، طحال، گلبول‌های قرمز و آبشش ماهی‌ها یافت می‌شود به داخل خون آزاد شوند و سطح فعالیت آنها در خون افزایش یابد (Banaee *et al.*, 2011). از این‌رو افزایش سطح فعالیت آنزیم AST و ALT در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد عصاره‌ی پونه در روزهای ۳۰ و ۴۵ آزمایش، ممکن است نشان از بروز مسمومیت سلولی با ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره پونه از جمله پولگون، ایزوپولگون، پیریتنون و منتوفوران و نیز

آسیب وارده به غشای سلولی در اثر استرس اکسیداتیو باشد. از آنجایی که این آنزیم‌ها نقش مهمی در مراحل نهایی تجزیه پروتئین جهت تولید ATP دارند؛ افزایش فعالیت آنها، نقش مؤثری در استفاده از اسیدهای آمینه در فرایند اکسیداسیون یا گلوکوژنز بازی می‌کند (Banaee *et al.*, 2011) و شاخص بالینی مناسبی جهت تشخیص آسیب‌های وارد به کبد محسوب می‌شود. تغذیه ماهی تیلپیا با مخلوط از ترکیبات گیاهی سبب افزایش AST و ALT در خون گردید که این امر به اختلال در عملکرد کبد ناشی از وجود مواد ضد تغذیه-ای در ترکیبات گیاهی داده شده است (Soltan *et al.*, 2008). افزایش فعالیت آنزیم‌های آمینوترانسفراز در خون موش‌های تحت تیمار پولگون و منتوفوران، در اثر آسیب وارده به غشای سلول‌های کبدی نیز مؤید این امر است (Madyastha and Raj, 1994; Nelson *et al.*, 1998; Vadiraja *et al.*, 1992). آسیب‌های هیستوپاتولوژیک وارده به کبد موش‌های تحت تیمار پولگون نشان‌دهنده سمیت این ماده است (Thorup *et al.*, 1983). تجویز اسانس *Mentha pulegium* (حاوی ۶۲-۹۷ درصد پولگون) می‌تواند سبب مسمومیت شدید توأم با نکروز بافت کبد، ادم شش‌ها و خونریزی داخلی و در نهایت منجر به مرگ در موش‌های آزمایشی گردید (Anderson *et al.*, 1996). این در حالی است که تجویز عصاره آبی الکلی پونه سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در موش‌های آزمایشی گردید (مختاری و همکاران، ۱۳۸۷).

کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلولی، افزایش رادیکال‌های آزاد در طی متابولیسم پولگون، منتوفوران، ایزوپولگون و پیریتنون سبب بروز استرس اکسیداتیو و

کلیه‌ها دفع می‌گردد (Murray *et al.*, 2003). افزایش سطح کراتینین خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۱ درصد عصاره‌ی پونه در روز ۳۰ آزمایش ممکن است ناشی از افزایش فرایند تجزیه فسفوریل کراتین حاصل از فسفوریله شدن کراتین، در خون و یا اختلال در فرایند دفع کلیوی کراتینین در این ماهی‌ها باشد. اختلال در فعالیت فیلتراسیون گلومرولی و افزایش سطح کراتینین در خون ماهی‌های تحت تیمار دارویی ۸۰۰ میلی گرم سیلی مارین، نیز به وسیله‌ی Banaee و همکاران (۲۰۱۱) گزارش گردید.

نقش سیتوکروم P450 در سم‌زدایی و متابولیسم پولگون بسیار حائز اهمیت است. اکسیداسیون پولگون به ۹-هیدروکسی پولگون و سپس به منتوفوران و نیز تولید ۸-پولگون الدهید سبب افزایش رادیکال‌های آزاد شده و شرایط را برای پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی مهیا می‌کند (National Toxicology Program, 2011; Kamatou *et al.*, 2013). از این‌رو در اثر آسیب به غشای سلولی ممکن است آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) که در داخل میتوکندری سلول‌ها در بافت‌های مختلفی نظیر کبد، قلب، ماهیچه‌های اسکلتی، کلیه، پانکراس، طحال، گلبول‌های قرمز و آبشش ماهی‌ها یافت می‌شود به داخل خون آزاد شوند و سطح فعالیت آنها در خون افزایش یابد (Banaee *et al.*, 2011). از این‌رو افزایش سطح فعالیت آنزیم AST و ALT در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد عصاره‌ی پونه در روزهای ۳۰ و ۴۵ آزمایش، ممکن است نشان از بروز مسمومیت سلولی با ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره پونه از جمله پولگون، ایزوپولگون، پیریتنون و منتوفوران و نیز

تخریب غشای سلولی (National Toxicology Program, 2011) و نیز آزاد شدن آنزیم LDH به داخل خون خواهد شد. لذا افزایش معنی‌داری در سطح فعالیت آنزیم LDH در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد عصاره‌ی پونه نیز ممکن است نشان‌دهنده‌ی بروز تغییرات متابولیکی ناشی از مسمومیت با ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره پونه باشد. به عبارتی دیگر در شرایطی که ماهی‌ها در معرض یک عامل استرس‌زا قرار می‌گیرند، روند کاتابولیسم گلیکوژن و گلوکز به سمت تشکیل لاکتات در عضلات ماهی‌های تحت استرس پیش می‌رود (Murray et al., 2003) و این امر افزایش سطح LDH را در پی دارد.

آلکالین فسفاتاز (ALP)، آنزیمی است که در اپیتلیوم مجاری صفراوی، سلول‌های کبدی و نیز در مخاط روده و کلیه‌ها یافت می‌شود. در کبد این آنزیم در سلول‌های کوپفر موجود است. این سلول‌ها سیستم جمع‌آوری صفراوی را می‌پوشانند. لذا سطح این آنزیم در انسداد مجاری صفراوی داخل و خارج کبدی، سیروزی و اختلالات کبدی به شدت افزایش می‌یابد (Banaee et al., 2011). افزایش معنی‌داری در سطح فعالیت آنزیم ALP در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد عصاره‌ی پونه نیز ممکن است نشان‌دهنده‌ی بروز سمیت سلولی است؛ که این امر ممکن است آزاد شدن آنزیم آلکالین فسفاتاز از سلول‌های آسیب‌دیده و در نتیجه افزایش سطح این آنزیم در خون شده باشد. افزایش ALP در خون ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تیمار ۰/۵ درصد عصاره گل ختمی مشاهده شده است (بنایی و همکاران، ۱۳۹۳). در مقابل، مختاری و همکاران (۱۳۸۷) گزارش

کردند که کاهش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در موش‌های تحت تیمار عصاره آبی الکلی پونه می‌تواند حاکی از تأثیر سمی عصاره این گیاه بر اپیتلیوم مجاری صفراوی و ایجاد کلستاز و یا حتی اختلال در روند استخوان‌سازی باشد.

کراتین فسفوکیناز (CK) آنزیمی است که در ماهیچه‌های اسکلتی، قلب، آبشش‌ها و مغز ماهی‌ها یافت می‌شود (Banaee et al., 2011). افزایش سطح فعالیت آنزیم کراتین فسفوکیناز در خون ماهی‌های تحت تیمار غلظت ۰/۱ درصد عصاره‌ی پونه در روز ۱۵ آزمایش نشان‌دهنده‌ی بروز مسمومیت سلولی در ماهی‌ها و افزایش انرژی‌خواهی سلولی است؛ زیرا این آنزیم نقش مهمی در فسفوریلاسیون کراتین و سنتز کراتین فسفات و سنتز مجدد مولکول پرانرژی ATP از ADP دارد (Dorucu et al., 2009).

کاهش گلوکوتایون سلولی و بروز استرس اکسیداتیو، نکرز بافت کبد و نیز آسیب شدید وارده به سیستم تنفسی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مسمومیت با پولگون، ایزوپولگون، پیریتنون و متوفوران است (National Toxicology Program, 2011). لذا در مواردی تجویز پونه ممکن است سبب تغییر سطح فاکتورهای بیوشیمیایی خون جانوران آزمایشی گردد؛ اما با توجه به وجود انواع فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها در عصاره‌ی گیاه پونه، استفاده از غلظت‌های پایین عصاره‌ی پونه نه تنها سبب ایجاد مسمومیت سلولی نمی‌شود، بلکه حتی می‌تواند از تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری کند و آنها را خنثی نماید (Khan et al., 2011). از این رو با در نظر گرفتن تأثیر عصاره هیدرو الکلی پونه بر فاکتورهای بیوشیمیایی و شاخص‌های رشد ماهی کپور معمولی می‌توان چنین اذعان کرد

فاکتورهای عملکردی کبد در موش صحرایی نر. فصلنامه

دانشگاه علوم پزشکی سبزوار (اسرار)، ۱۵ (۴۸)، ۷۳-۸۱.

۶. نوبخت، ع.، رحیم‌زاده، م.ر.، صفامهر، ع.ر.، ۱۳۹۲. بررسی

اثر سطوح مختلف مخلوط گیاهان دارویی گزنه، پونه و

کاکوتی بر عملکرد، کیفیت لاشه و پارامترهای بیوشیمیایی

و سلول‌های سفید خون جوجه‌های گوشتی. فصلنامه علمی

پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۹ (۱)،

۲۱۵-۲۲۴.

۷. نوری‌زاده، ع.، میرزا پور، ط.، قاسمی، ک.ا.، رضوی،

س.م.، لطیفی‌نویید، س.، ۱۳۸۳. بررسی آثار ضدباکتریایی

عصاره‌های نعناع، شیرین‌بیان، پونه، بابونه و آویشن بر

هلیکوباکتر پیلوری. مجله دانشور پزشکی، ۱۱ (۵۲)، ۶۷-۷۲.

8. Ahmad, N., Fazal, H., Ahmad, I., Haider Abbasi, B., 2012a. Free radical scavenging (DPPH) potential in nine *Mentha* species. *Toxicology and Industrial Health*, 28(1), 83-89.

9. Ahmadi, K., Banaee, M., Vosoghei, A.R., Mirvaghefi, A.R., Ataeimehr, B., 2012b. Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract (*Silybum marianum*) on some immune parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae). *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*, 42 (2), 113-120.

10. Ali, M.S., Saleem, M., Ahmad, W., Parvez, M., Yamdagni, R., 2002. A chlorinated monoterpene ketone, acylated â-sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 59, 889-895.

11. Al-Salahy, M.B. 2002. Some physiological studies on the effect of onion and garlic juices on the fish, *Clarias lazera*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 27, 129-142.

12. Anderson, I.B., Mullen, W.H. Meeker, J.E. Khojasteh-Bakht, S.C. Oishi, S. Nelson, S.D. Blanc, P.D. 1996. Pennyroyal toxicity: measurement of toxic metabolite levels in two cases and a review of the literature. *Annals Internal Medicine*, 124, 726-734.

13. Ardó, L., Yin, G., Xu, P., Váradi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., Jeney, G., 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 275, 26-33.

که عصاره این گیاه دارویی در غلظت‌های ۰/۵ و ۱

درصد برای ماهی‌ها سمی بوده و می‌تواند موجب بروز

مسمومیت در ماهی‌ها شود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح پژوهشی با کد ۹۲۰۸ بوده و

با حمایت مدیریت محترم پژوهشی دانشگاه صنعتی

خاتم‌الانبیاء (ص) بهیمن انجام شده است. بدین وسیله

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و سپاس خود را از

مسئولین ذی‌ربط اعلام می‌دارند.

منابع

۱. بنایی، م.، نعمت‌دوست حقی، ب.، سلیمانی و.، فلاح‌پور،

ف.، محیسنی، م.، ۱۳۹۳. ارزیابی پیش‌بالینی تجویز خوراکی

نسبت‌های مختلف عصاره گل ختمی (*Althaea*

officinalis L. بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله

بوم‌شناسی آبزیان، ۴ (۳)، ۲۶-۲۰.

۲. رضایی، م.ب.، رسولی، ا.، ۱۳۷۹. فعالیت بیولوژیکی و

ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن (*Thymus x-porlock*) و

پونه (*Mentha longifolia*). مجله دانشور پزشکی، ۸ (۳۱)،

۱-۸.

۳. شریعتی، م.، اسفندیاری، آ.، مدرسی، م.، رحمانی، ز.،

۱۳۹۰. اثر ضد باروری عصاره آب الکلی برگ گیاه پونه در

موش‌های صحرایی نر بالغ. فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی

سبزوار (اسرار)، ۱۹ (۶۳)، ۴۱-۳۴.

۴. محمودی، ر.، تاجیک، ح.، فرشید، ا.ع.، احسانی، ع.، زارع،

پ.، مرادی، م.، ۱۳۹۰. تعیین ترکیبات شیمیایی و اثرات

ضدمیکروبی اسانس پونه کوهی علیه باکتری

استافیلوکوکوس اورئوس. مجله ارمغان دانش، ۱۶ (۶۵)،

۴۰۰-۴۱۲.

۵. مختاری، م.، شریعتی، م.، خداپرست، ل.، ۱۳۸۷. بررسی

اثرات عصاره آبی-الکلی برگ گیاه پونه بر روی

24. Kamatou, G.P.P., Vermaak, I., Viljoen, A.M., Lawrence, B.M., 2013. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Photochemistry*, 96, 15–25.
25. Khan, R.A., Khan, F.U., Ahmad, M., Shah, A.S., Khan, N.S., Khan, M.R., Shah, M.S., 2011. Phytotoxic and antibacterial assays of crude methanolic extract of *Mentha longifolia* (Linn.). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1(4), 175-200.
26. Koliopoulos, G., Pitarokili, D., Kioulos, E., Michaelakis, A., Tzakou, O., 2010. Chemical composition and larvicidal evaluation of *Mentha*, *Salvia*, and *Melissa* essential oils against the West Nile virus mosquito *Culex pipiens*. *Parasitology Research*, 107, 327-335.
27. Madyastha, K.M., Raj, C.P., 1994. Effects of menthofuran, a monoterpene furan on rat liver microsomal enzymes, *in vivo*. *Toxicology*, 89(2), 119-25.
28. Mahmoudi, R., 2014. Effect of *Mentha longifolia* L. essential oil on physicochemical properties of the Bio-Ayran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(1), 56-66.
29. Moreno, L., Bello, R., Primo-Yufera, E., Esplugues, J., 2002. Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh. *Phytotherapy Research*, 16, 10-13.
30. Moss, D.V., Henderson, A.R., 1999. Clinical enzymology In: Burtis, C.A., Ashwood, E.R., editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 617-721.
31. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*, Twenty-Sixth Edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill (Medical Publishing Division). New York, 402 p.
32. Nafisi Bahabadi, M., Banaee, M., Taghiyan, M., Nematdoust Haghi, B., 2014. Effects of dietary administration of yarrow extract on growth performance and blood biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Aquatic Biology*, 2(5), 275-285.
33. National Toxicology Program. 2011. Toxicology and carcinogenesis studies of pulegone (CAS No. 89-82-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). National Toxicology Program Technical Report Series, 563, 1-201.
34. Nelson, S.D., McClanahan, R.H., Thomassen, D., Gordon, W.P., Knebel, N., 1992. Investigations of mechanisms of reactive metabolite formation from (R)-(+)-pulegone. *Xenobiotica*, 22(9-10), 1157-1164.
14. Asadi, M.S., Mirvaghefi, A.R., Nematollahi, M.A., Banaee, M., Ahmadi, K., 2012. Effects of Watercress (*Nasturtium nasturtium*) extract on some immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Open Veterinary Journal*, 2(1), 32-39.
15. Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., Rafei, G.R., 2011. Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 887-896.
16. Bilen, S., Bulut, M., 2010. Effects of laurel (*Laurus nobilis*) on the non-specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(8), 1275-1279.
17. Dorucu, M., Ozesen Colak, S., Ispir, U., Altinterim, B., Celayir, Y., 2009. The effect of black cumin seeds, *Nigella sativa*, on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mediterranean Aquaculture Journal*, 2(1), 27-33.
18. Foster-Swanson, A., Swartzentruber, M., Roberts, P., 1994. Reference interval studies of the rate-blanked creatinine/jaffe method on BM/Hitachi Systems in six U.S. Laboratories. *Clinical Chemistry*, Abstract No 361.
19. Frankič, T., Voljč, M., Salobir, J., Rezar, V., 2009. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta argiculturae Slovenica*, 94, 95-102.
20. Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan, H., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*. *Food chemistry*, 103(4), 1449-1456.
21. Hafedh, H., Fethi, B.N., Emira, N., Mejdi, S., Emira, N., Amina, B., 2010. Effect of *Mentha longifolia* L. spp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. *African Journal of Microbiology Research*, 4(11), 1122-1127.
22. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2010. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 28, 354-361.
23. Johnson, A.M., Rohlf, E.M., Silverman, L.M., 1999. Proteins. In: Burtis, C.A., Ashwood, E.R., editors. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 477-540.

- pulegone and menthol. Toxicology Letters, 19(3), 207-210.
39. Vadiraja, B.B., Gaikwad, N.W., Madyastha, K.M., 1998. Hepatoprotective effect of C-phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. Biochemical and Biophysical Research Communications, 249(2), 428-31.
 40. Yin, G., Ardo, L., Thompson, K.D., Adams, A., Jeney, Z., Jeney, G., 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology, 26, 140-145.
 35. Sher, Z., Khan, Z.D., 2007. Floristic composition, life form and leaf spectra of the vegetation of Chagharzai Valley, District Buner. Pakistan Journal of Plant Sciences, 13(1), 57-66.
 36. Soltan, M.A., Hanafy M.A., Wafa, M.I.A., 2008. An Evaluation of fermented silage made from fish by products as a feed ingredient for African catfish (*Clarius gariepinus*). Global Veterinaria, 2, 80-86.
 37. Thomas, L. 1998. Clinical laboratory diagnostics. 1st ed Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 65-71.
 38. Thorup, I., Würtzen, G., Carstensen, J., Olsen, P., 1983. Short toxicity study in rats dosed with