University of Tehran

Journal of Fisheries

Home Page: https://jfisheries.ut.ac.ir

Online ISSN: 2423-7809

Nutritional effects of hesperidin powder on growth performance, blood parameters, nonspecific immunity and antioxidant enzyme activity of common carp (*Cyprinus carpio*)

Ali Arshadi[1*] | Samaneh Khaledi[2] | Abdolali Rahdari[3] | Amin Oujifard[4] | Dara Bagheri[5]

1. Corresponding Author, Department of Fisheries, Faculty of Nano and Bio Science and Technology, Bushehr, Iran. Email: arshadi@pgu.ac.ir
2. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran. Email: khaledi@uoz.ac.ir
3. Department of Fisheries, Hamoon International Wetland Research Institute, Zabol Research Institute, Iran. Email: abdolalirahdari@rizabol.ac.ir
4. Department of Fisheries, Faculty of Nano and Bio Science and Technology, Bushehr, Iran. Email: oujifard@pgu.ac.ir
5. Department of Fisheries, Faculty of Nano and Bio Science and Technology, Bushehr, Iran. Email: dara.bagheri@pgu.ac.ir

ARTICLE INFO

Article type:
Research Article

Article History:
Received: 06 January 2026
Revised: 09 June 2026
Accepted: 13 June 2026
Published online: 05 July 2026

Keywords:
Common carp,
Hematology,
Hesperidin polyphenol,
Immunity index,
Growth performance.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of oral administration of hesperidin powder in the diet on some growth indices, hematology, immune parameters and antioxidant enzymes of common carp. Juveniles with an average weight of 30.02 ± 1.28 g were fed a diet containing hesperidin powder at different levels of zero (control), 100, 200 and 300 mg/kg basal diet for 8 weeks in a completely randomized design in 4 treatments and 3 replications. At the end of the bioassay experiment, blood was taken from apparently healthy fish samples and growth indices, immune indices, metabolic enzyme activities as well as antioxidant enzymes activity and serum lipid oxidation index were measured. The results indicated an increase in growth performance and nutritional indices, red blood cell and white blood cell indices, immune indices, liver enzyme activity and antioxidant enzymes in the experimental treatments fed with the diet containing hesperidin powder supplement. On the other hand, the condition factor, feed conversion ratio and survival rate of common carp were not affected by different levels of hesperidin powder during the experimental period. A significant decrease in the activity of liver enzymes was observed in fish fed with hesperidin powder in the diet compared to the control treatment, with the 200 mg treatment showing the lowest level. A significant increase in the number of red blood cells and white blood cells as well as in the activity of lysozyme, immunoglobulin and serum antioxidant enzymes was obtained in the treatment fed with the diet containing 200 mg of compared to other treatments. The results of this study showed that a level of 200 mg of hesperidin per kilogram of diet had a positive effect on the performance of growth indices, feed efficiency, liver health, metabolic enzymes, immunity, and antioxidant defense of common carp.

Cite this article: Arshadi, A., Khaledi, S., Rahdari, A., Oujifard, A., Bagheri, D. (2026). Nutritional effects of hesperidin powder on growth performance, blood parameters, nonspecific immunity and antioxidant enzyme activity of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Fisheries*, 79 (2), 135-151. DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2026.409547.1474

© The Author(s) **Publisher:** University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2026.409547.1474

شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
سایت نشریه: https://jfisheries.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۷۸۰۹-۲۴۲۳
دانشگاه تهران

اثرات تغذیه‌ای پودر هسپریدین بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی، ایمنی غیراختصاصی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*)

علی ارشدی[1*] | سمانه خالدی[2] | عبدالعلی راهداری[3] | امین اوجی‌فرد[4] | دارا باقری[5]

۱. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکدهٔ علوم و فناوری نانو و زیستی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران. رایانامه: arshadi@pgu.ac.ir
۲. گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه زابل، ایران. رایانامه: khaledi@uoz.ac.ir
۳. گروه شیلات، پژوهشکدهٔ تالاب بین‌المللی هامون، پژوهشگاه زابل، ایران. رایانامه: abdolalirahdari@rizabol.ac.ir
۴. گروه شیلات، دانشکدهٔ علوم و فناوری نانو و زیستی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران. رایانامه: oujifard@pgu.ac.ir
۵. گروه شیلات، دانشکدهٔ علوم و فناوری نانو و زیستی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران. رایانامه: dara.bagheri@pgu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخ‌های مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۳/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۲۳
تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۴/۱۴

کلیدواژه:
کپور معمولی،
خون‌شناسی،
پلی‌فنول هسپریدین،
شاخص ایمنی،
عملکرد رشد.

چکیده

هدف این پژوهش ارزیابی تجویز خوراکی پودرهسپریدین در جیره بر برخی شاخص‌های رشد، خونشناسی، پارامترهای ایمنی و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) بود. بچه‌ماهیان با وزن متوسط ۱/۲۸±۳۰/۰۲ گرم با جیره حاوی پودر هسپریدین در سطوح مختلف صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم جیرهٔ غذایی پایه به‌مدت ۸ هفته به‌صورت یک طرح کاملاً تصادفی در ۴ تیمار و ۳ تکرار (۱۵ قطعه ماهی در هر تکرار) تغذیه شدند. در انتهای آزمایش، پس از زیست‌سنجی از نمونه‌های به ظاهر سالم خونگیری شد و شاخص‌های رشد، ایمنی، فعالیت آنزیم‌های متابولیک، آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و شاخص اکسیداسیون چربی (MDA) سرم خون مورد سنجش قرار گرفت. نتایج حاکی از افزایش عملکرد رشد، تغذیه، شاخص‌های خونی گلبول قرمز و گلبول سفید، ایمنی، فعالیت آنزیم‌های کبدی و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با جیره غذایی حاوی مکمل پودر هسپریدین بود. از طرفی ضریب چاقی، ضریب تبدیل غذایی و بازماندگی کپور معمولی تحت تاثیر سطوح مختلف پودر هسپریدین در طول دوره آزمایش قرار نگرفت ($P>0/05$). کاهش معنی داری در فعالیت آنزیم‌های کبدی در ماهیان تغذیه شده با پودر هسپریدین در جیره نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید که تیمار ۲۰۰ میلی گرم کمترین میزان را نشان داد ($P<0/05$). افزایش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید خون و همچنین در میزان فعالیت لیزوزیم، ایمنوگلبولین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سرم خون در تیمار تغذیه شده با جیرهٔ غذایی حاوی ۲۰۰ میلی گرم هسپریدین نسبت به سایر تیمارها به‌دست آمد ($P<0/05$). نتایج این تحقیق نشان داد که سطح ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین در کیلوگرم جیرهٔ غذایی اثر مثبتی بر عملکرد شاخص‌های رشد، کارایی تغذیه، سلامت کبد، آنزیم‌های متابولیک، ایمنی و دفاع آنتی‌اکسیدانی بچه‌ماهی کپور معمولی داشت.

استناد: ارشدی، علی؛ خالدی، سمانه؛ راهداری، عبدالعلی؛ اوجی‌فرد، امین؛ باقری، دارا (۱۴۰۵). اثرات تغذیه‌ای پودر هسپریدین بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی، ایمنی غیراختصاصی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*). *نشریهٔ شیلات، مجله منابع طبیعی ایران*، ۷۹ (۲)، ۱۵۱-۱۳۵. DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2026.409547.1474

© نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.
DOI: http//doi.org/10.22059/jfisheries.2026.409547.1474

۱. مقدمه

آبزی‌پروری یکی از بخش‌های مهم تولید غذا با بیشترین رشد در دنیا است که در سال ۲۰۲۳ تولید آبزیان پرورشی (به‌جز گیاهان دریایی، ریز جلبک‌ها، صدف و مروارید) به ۹۸/۵ میلیون تن (وزن زنده) رسید که از ۹۰/۴ میلیون تن صید طبیعی پیشی گرفت. این دستاورد نشان‌دهندهٔ رشد پایدار آبزی‌پروری است، به‌طوری که سهم آن از تولید کل آبزیان از ۴ درصد در دههٔ ۱۹۵۰ به ۵۲/۲ درصد در حال حاضر افزایش یافته است (FAO, 2024). عواملی از قبیل افزایش تراکم در استخرها، جابجایی و دستکاری‌های دوره‌ای، تغییرات ناگهانی دما، کاهش کیفیت آب و شرایط تغذیه‌ای ضعیف منجر به تغییرات فیزیولوژیک در ماهی (استرس و ضعف سیستم ایمنی) و افزایش حساسیت به انواع عفونت‌ها می‌شود، که این مشکلات، توسعهٔ این صنعت را با مشکل مواجه نموده است. علاوه‌براین، فقدان اقدامات بهداشتی به گسترش عوامل بیماری‌زا کمک کرده و موجب افزایش میزان تلفات می‌گردد (Naylor *et al*., 2000; Quesada *et al*., 2013). برای جلوگیری از مشکلات مذکور، هر ساله مقدار زیادی آنتی‌بیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیردکه علاوه بر آلوده‌سازی محیط‌زیست و با ایجاد سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در نهایت سلامت مصرف‌کننده را به‌خطر می‌اندازند (Lazado *et al*., 2015). محققان برای جلوگیری از تلفات ناشی از بیماری‌های عفونی یا غیرعفونی ناشی از استرس بیشتر بر سیستم ایمنی آبزیان تمرکز نموده اند و یکی از ایده‌های مطرح جهت بهبود عملکرد رشد و کارایی تغذیه، جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها با مکمل‌های غذایی مانند: پلی‌فنول‌ها، پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و سین بیوتیک‌ها می‌باشد. مطالعات نشان داده است که محرک‌های ایمنی از جمله گیاهان دارویی و مشتقات آنها (اسانس‌ها و عصاره‌ها) با بهبود هضم و جذب غذایی، افزایش قدرت دفاعی و متوقف کردن فعالیت عوامل آسیب‌رسان فرصت‌طلب موجب بهبود رشد و بقای آبزیان می‌شوند، بنابراین استفاده از آنها در مزارع نقش مهمی در سلامت آبزیان ایفا می‌کند (Sakai, 1999; Allsopp *et al*., 2008; Abdel-Latif *et al*., 2020). ماهیان مانند سایر مهره‌داران خونسرد برای مبارزه با عوامل بیماریزا عمدتاً به سیستم ایمنی غیراختصاصی متکی هستند، بنابراین استفاده از محرک‌های ایمنی در تحریک ایمنی غیراختصاصی در ماهیان نسبت به حیوانات خونگرم نقش مؤثرتری دارد، همچنین با توجه به خطرات زیست‌محیطی، افزایش مقاومت باکتریایی آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض جانبی ایـــن داروها بر بدن ماهی (Harikrishnan *et al*., 2003, Iwama and Nakanishi, 1996)، مکمل‌های غذایی می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و حتی واکسیناسیون در پیشگیری و کنترل بیماری‌ها باشند (Swain *et al*., 2006). پلی‌فنول‌های گیاهی دارای طیف گسترده‌ای از عملکردهای ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. به‌طوری که با وجود اثرگذاری کند، به‌دلیل عواملی چون پایدارتر بودن اثر آنها، عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا نسبت به آنها، نداشتن اثرات سوء بر جانداران و محیط‌زیست، دسترسی آسان، تولید کم هزینه و کاربرد مقرون به صرفه آنها از نظر اقتصادی در دنیا، در مقایسه با سایر ترکیبات شیمیایی–دارویی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته‌اند (Ghasemi Pirbaluti *et al*., 2010). رادیکال‌های آزاد مولکول‌ها و اتم‌هایی هستند که به‌دلیل داشتن یک الکترون آزاد حاوی انرژی بالایی بوده و بسیار ناپایدار و واکنش‌پذیر هستند و جهت رسیدن به حالت پایدار با مولکول‌های دیگر (پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA) ترکیب می‌شوند. رادیکال‌های آزاد به‌طور طبیعی در بدن در حین فرآیندهای مختلف متابولیک تولید می‌شوند. غلظت‌های بالای این مولکول‌های رادیکال آزاد باعث ایجاد وضعیتی به نام استرس اکسیداتیو می‌شوند. استرس اکسیداتیو نشانگر عدم تعادل بین تولید انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و توانایی سیستم بیولوژیک برای سم‌زدایی و یا ترمیم آثار مخرب آنها بر سلول، بافت یا ارگان‌های بدن است که نهایتاً این آسیب‌های برگشت‌ناپذیر منجر به تغییر در عملکرد سلول و یا مرگ سلول می‌شود. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی شامل آنزیم‌هایی نظیر سوپر اکسید دیسموتاز[1]، کاتالاز[2]، گلوتاتیون پراکسیداز[3] و گلوتاتیون ردوکتاز[4] هستند که به‌عنوان خنثی‌کننده انواع رادیکال آزاد عمل می‌کنند و نقش حیاتی در حفظ هومئوستازی سلول بازی می‌کنند (Predy *et al*., 1998). انواع ترکیبات پلی‌فنلی را می‌توان بر اساس ساختار مولکولی در دسته‌های متنوعی به‌ویژه انواع ایزوفلاون‌ها فلاونول‌ها، فلاوانون‌ها فلاوانول‌ها، فلاون‌ها، و آنتوسیانیدین‌ها قرار داد (Middleton *et al*., 2000). درحال حاضر غالب بر ۴۰۰۰ ترکیب فلاونوئید شناخته شده است. در بین این ترکیبات فراوان‌ترین آنها هسپریدین[5] است که یک فلاوانون گلیکوزید بوده و این

[1] Superoxide Dismutase-SOD
[2] Catalase
[3] Gluthatione Peroxidase-GPX
[4] Glutathione Reductase-GR
[5] Hesperetin-7-O-Rutinoside

ترکیب فراوان‌ترین فلاونوئید حاصل از مرکبات است (Garg *et al* 2001). در مطالعات مختلفی که سال‌های اخیر انجام شده است اثرات زیستی و دارویی هسپریدین مورد بحث بررسی قرار گرفته است که نشان‌دهنده اثر مفید هسپریدین در افزایش و ارتقای راهبرد سیستم فیزیولوژیک بدن آبزیان و کاهش غلظت نشاگرهای التهابی می‌باشند. پودر سنتتیک هسپریدین حاوی ترکیبات زیست‌فعال فلاوانون گلیکوزید می‌باشد و به‌دلیل از بین بردن رادیکال‌های آزاد بدن می‌تواند نقش مؤثری در پیشگیری از انواع بیماری‌ها داشته باشد. هسپریدین با غلظت بالایی از مرکبات قابل استحصال است، در عین حال مصرف این ترکیب هیچ‌گونه اثر سمی و عارضه جانبی به‌همراه نخواهد داشت (Roohbakhsh *et al*., 2015). در مطالعات مختلف نقش ضدباکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و بیشتر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی آن مورد تأیید قرار گرفته است. علاوه‌بر این، به کمک مطالعات مختلف انجام شده اثربخشی ضد قارچی و ضدباکتریایی، و ضد ویروسی ترکیب هسپریدین اثبات گردیده است (Garg *et al* 2001; Roohbakhsh *et al*., 2015; Liu *et al*., 2020). خواص فیزیولوژیکی هسپریدین شامل ویژگی‌های آنتی اکسیدانتی (Johnson, 2002)، ضدسرطانی (Roohbakhsh *et al*., 2015)، تسکین‌دهنده (Guzmán *et al*., 2009)، ضد التهاب (Dimpfel, 2006) و کاهش‌دهنده چربی خون (Akiyama *et al*., 2010; Bansal *et al*., 2024) به اثبات رسیده است.

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به‌عنوان یکی از مهمترین ماهیان پرورشی، نقش مهمی در افزایش نرخ تولیدات آبزی پروری در سطح جهان ایفا می‌کند، همچنین این گونه پرورشی به‌علت ویژگی‌های منحصر به‌فرد مانند مقاومت در برابر تنش‌های محیطی از سهولت زیادی جهت پرورش نسبت به سایر ماهیان برخوردار است و جزء گونه‌های پرورشی در اکثر مناطق ایران محسوب می‌شود (Sharif Zadeh *et al*., 2016).

در سال‌های اخیر تحقیقاتی در به‌کارگیری اثر محرک‌های ایمنی و مکمل‌های غذایی روی آبزیان صورت گرفته است که می‌توان به استفاده از سطوح مختلف عصارهٔ گیاه آویشن شیرازی و پونه بر تغییرات لیزوزیم، فاگوسیتوز، انفجار تنفسی[1] و تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Akbary *et al*., 2015)، اثرات هسپریدین بر عملکرد رشد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ایمنی و مقاومت در مواجهه با بیماری در خرچنگ باتلاقی قرمز (*Procambarus clarkia*) (Liu *et al*., 2020)، اثر عصارهٔ الکلی پوست انار بر فاکتورهای خون ماهی کپور معمولی (Shafiei *et al*., 2016)، اثر عصارهٔ میوهٔ گیلاس بر عملکرد رشد، مقاومت در برابر بیماری و بیان ژن مربوط به ایمنی و آنتی‌اکسیدان سرم ماهی کپور معمولی (Ahmadifar *et al*., 2022)، تأثیر سطوح مختلف عصارهٔ هیدروالکلی داروش بر رشد و شاخص‌های خونی ماهی خاویاری سیبری (*Acipenser baerii*) (Moradi *et al*., 2018) و همچنین تأثیر عصارهٔ برگ خرمالو بر پارامترهای خونی و ایمنی غیراختصاصی ماهی کپور معمولی (Ahmadifar *et al*., 2019) اشاره کرد.

در ماهیان پارامترهای خونی به‌عنوان شاخص‌های فیزیولوژیک در پاسخ به تغییرات خارجی و داخلی مانند بیماری، نوع تغذیه، به‌کارگیری مکمل‌های غذایی در جیره، آلودگی و تغییرات زیست‌محیطی و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله اهداف آبزی‌پروری اقتصادی، افزایش تولید در واحد سطح می‌باشد، که یکی از راه‌های دستیابی به محصول بیشتر در انتهای دورهٔ پرورش آبزیان، افزایش تراکم می‌باشد. افزایش تراکم، دستکاری‌های دوره ای، تغییرات شدید و ناگهانی دمای آب، شرایط بد تغذیه و غیره از جمله عوامل مهم و مؤثر بر شرایط نامساعد زیستی، استرس آبزی و شیوع بیماری می‌باشند. در صنعت آبزی‌پروری یکی از راه‌های بهبود رشد و تغذیه و همچنین مقابله با بیماری‌ها و تقویت مکانسیم دفاعی بدن با تجویز مواد محرک ایمنی و مکمل‌های غذایی از جمله ترکیبات زیست‌فعال فلانوییدی در جیرهٔ غذایی می‌باشند. بنابراین در این تحقیق دستیابی به یک جیرهٔ غذایی با سطوح مناسب هسپریدین از نظر فیزیولوژیکی و اقتصادی ماهی کپور معمولی مورد توجه قرارگرفته است. با توجه به مطالب ذکرشده و اهمیت محرک‌های ایمنی در پیشگیری از بیماری‌ها و کاهش تلفات و افزایش تولید و همچنین اهمیت تقویت سیستم ایمنی در صنعت آبزی‌پروری، در این مطالعه تأثیر هسپریدین در جیرهٔ غذایی بر عملکرد رشد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی ماهی کپور معمولی، مورد بررسی قرار خواهدگرفت.

۲. روش‌شناسی پژوهش

[1] Reactive Oxygen Species

۲-۱. تهیهٔ ماهی و شرایط انجام آزمایش

تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی کپور معمولی سالم با میانگین وزنی ۱/۲۸±۳۰/۰۲ گرم از استخر خاکی مرکز تکثیر و پرورش ماهیان بومی زهک صید و در مخازن فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری مجهز به هواده با تعویض روزانه ۴۰ درصدی آب آزمایشگاه خیس گروه شیلات در دانشگاه زابل منتقل گردیدند. پیش از شروع آزمایش، ماهی‌ها به‌مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاهی دمای آب ۲±۲۴ سانتی‌گراد، دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، اکسیژن محلول ۱±۵/۲ میلی‌گرم بر لیتر،۰/۳±۷/۴ :pH سازگار شدند. در طی دورهٔ سازگاری، ماهی‌ها با جیرهٔ تجاری کپور (تهیه شده از شرکت فرادانه، شهرکرد، ایران) به‌صورت دو بار در روز و معادل ۳ درصد وزن بدن تغذیه شدند. سپس ماهی‌ها به‌صورت تصادفی در ۱۲ عدد آکواریوم با ظرفیت ۶۰ لیتر آبگیری در ۴ تیمار با ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۵ قطعه ماهی تقسیم‌بندی شدند. جهت تهیهٔ جیره‌های آزمایشی خوراک مرحلهٔ پرواری (پروتئین ۴۲٪، چربی ۱۱٪، فیبر ۴٪، رطوبت ۱۰٪ و خاکستر ۱۰٪) شرکت فرادانه را ابتدا آسیاب و سپس مقادیر مشخص صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم پودر هسپریدین (درجهٔ خلوص ۸۵ درصد، شرکت Sigma، آمریکا) به‌عنوان غلظت‌های پایین، متوسط و بالای عصاره به‌ازای هر کیلوگرم جیرهٔ غذای ماهی کپور اضافه شد. مخلوط خوراک و هسپریدین به‌خوبی همگن شده و با استفاده از چرخ‌گوشت با اندازهٔ چشمهٔ ۱ میلی‌متر به‌صورت پلت غذایی در آمدند. سپس در دمای اتاق به اندازه‌ای خشک شدند تا میزان رطوبت حدود ۸ تا ۱۰ درصد شد و پس از آن در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد یخچال تا مرحلهٔ بعدی آزمایش نگهداری شدند. میزان خوراک لازم از یخچال به‌صورت روزانه بیرون گذاشته و مصرف شد. در طول دورهٔ پرورش خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب شامل دما، اکسیژن محلول و pH کنترل و ثبت شد. ماهی‌ها طی ۲ مرحله روزهای اول و ۵۶ مورد زیست‌سنجی قرار گرفته و با توجه به میانگین وزنی ۳ درصد وزن بدن با دو وعده در روز در ساعات ۸:۰۰ و ۱۷:۰۰ به‌مدت ۸ هفته با جیره‌های آزمایشی به‌صورت دستی تغذیه شدند.

۲-۲. نمونه برداری و زیست‌سنجی ماهیان

بررسی شاخص‌های رشد و تغذیه از جمله افزایش وزن بدن، درصد افزایش وزن بدن[1] (BWI)، میزان رشدروزانه[2] (DGR)، شاخص وضعیت[3] (CF)، نرخ رشد ویژه[4] (SGR) و ضریب تبدیل غذایی[5] (FCR) براساس رابطه‌های زیر و زیست‌سنجی‌های انجام شده در طول دوره محاسبه شد (Li *et al*., 2009). بدین‌ترتیب که پس از گرسنه نگه‌داشتن ۲۴ ساعته ماهیان، میزان وزن با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم و طول کل با خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر به‌صورت انفرادی اندازه‌گیری شدند. ماهیان قبل از زیست‌سنجی با پودر گل میخک به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر بی‌هوش شدند.

درصد افزایش وزن بدن(٪) = [وزن نهایی (گرم) – وزن اولیه (گرم)] / وزن اولیه (گرم) × ۱۰۰

میزان رشد روزانه (گرم در روز) = [وزن نهایی (گرم) – وزن اولیه (گرم)] / ۵۶

شاخص وضعیت =[وزن نهایی (گرم)] / [طول نهایی (سانتیمتر)]^3 × ۱۰۰

نرخ رشد ویژه (درصد در روز) =[وزن نهایی (گرم)–لگاریتم طبیعی وزن اولیه (گرم)]×۱۰۰ / [تعداد روزهای پرورش/لگاریتم طبیعی

ضریب تبدیل غذایی =غذای مصرف شده (گرم) / افزایش وزن (گرم)

۲-۳. شاخص‌های خون‌شناسی، ایمنی و آنتی‌اکسیدانی

در پایان دورهٔ آزمایش جهت مطالعهٔ پارامترهای خونی و ایمنی، از هر آکواریوم به‌طور تصادفی ۳ عدد ماهی با عصارهٔ پودر گل میخک بیهوش و خون‌گیری از قسمت ساقهٔ دمی با استفاده از سرنگ‌های پلاستیکی ۲ میلی‌متری و سرسوزن شماره ۲۱ انجام شد. بخشی از خون در لوله‌های معمولی (غیر هپارینه) و بخشی دیگر جهت شمارش سلول‌های خونی به لوله‌های هپارینه منتقل شد. نمونه‌های خون نگهداری شده در میکروتیوپ فاقد مادهٔ ضد انعقاد به‌مدت ۲ ساعت در یخچال نگهداری (Ghiasi *et al*., 2015) و سپس سرم با استفاده از سانتریفوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه) جدا شد. سنجش آنزیم‌های کبدی شامل آلکالین

[1] Body Weight Increase
[2] Daily Growth Rate
[3] Condition Factor
[4] Specific Growth Rate
[5] Food Conversion Ratio

فسفاتاز[1] (ALP)، لاکتات دهیدروژناز[2] (LDH)، آسپارتات آمینوترانسفراز[3] (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز[4] (ALT) با دستگاه اتوآنالایزر (Selectera مدل PROM، ساخت کشور هلند) در آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه زابل انجام شد (Acerete *et al*., 2004). همچنین آنزیم‌های اکسیداتیو[5] سوپراکسید دیسموتاز[6] (SOD)، کاتالاز[7] (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز[8] (GPX) و شاخص اکسیداسیون چربی یا مالون‌دی‌آلدهید[9] (MDA) با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی مورد سنجش قرار گرفت (Vitcheva *et al*., 2015). شمارش تعداد گلبول‌های قرمز[10] (RBC) با استفاده از لام هماتوسیتومتر نئوبار قرمز انجام شد. تعداد گلبول‌های قرمز بعد از رقیق‌سازی خون در محلول Lewis (۱ میلی‌لیتر فرمالین، ۹۹ میلی‌لیتر سیترات سدیم و ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) توسط پیپت ملانژور با استفاده از لام هماتوسیتومتر نئوبار و با عدسی با بزرگنمایی ۴۰ شمارش شد (Blaxhall & Daisley, 1973). تعداد گلبول‌های سفید[11] (WBC) با استفاده از لام هماتوسیتومتر نئوبار و عدسی با بزرگنمایی ۴۰ پس از رقیق‌سازی خون هپارینه به نسبت ۱ به ۲۰ در محلول Lewis با استفاده از پیپت ملانژور سفید، شمارش شد (Blaxhall & Daisley, 1973). حجم هماتوکریت[12] (HCT) نمونه با استفاده از لوله‌های موئینه و سانتریفیوژ به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه با دستگاه میکروسانتریفیوژ مدل (Hettich, Germany) انجام شد و حجم سلول‌های خونی به‌صورت درصد با استفاده از خط‌کش میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد (Řehulka, 2000). اندازه‌گیری هموگلوبین[13] (HB) به روش استاندارد سیانو مت‌هموگلوبین انجام شد. ۵ میلی‌لیتر از محلول درابکین با ۲۰ میکرولیتر نمونه خون هپارینه مخلوط و پس از ۱۰–۵ دقیقه نگهداری در محیط تاریک، مقدار جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico, USA) در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان هموگلوبین برحسب گرم بر دسی‌لیتر براساس رابطهٔ زیر محاسبه شد (Řehulka, 2000). سپس با استفاده از رابطهٔ زیر غلظت هموگلوبین در نمونه‌های مورد بررسی، اندازه‌گیری شد.

HB (g/dl)= (OD نمونه × OD استاندارد) × غلظت استاندارد

میزان فعالیت لیزوزیم سرم[14] در انتهای آزمایش با استفاده از روش کدورت‌سنجی و به روش توصیه شده (Ellis, 1990) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین تام سرم خون از روش Siwicki و همکاران (۱۹۹۴) استفاده شد. اساس کار به روش رنگ سنجی Bradford (۱۹۷۶) استوار بوده که میزان جذب نوری محلول G Blue Brilliant Coomassie-250 (به‌عنوان مادهٔ رنگ‌پذیر) هنگام اتصال با پروتئین‌های سرم در طول موج ۵۹۵ نانومتر برای محاسبهٔ میزان پروتئین‌ها به‌کار می‌رود. در این روش محلول استاندارد از غلظت‌های ۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) استفاده شد.

برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون[15] (DLC) (لنفوسیت[16]، مونوسیت[17]، نوتروفیل[18] و ائوزینوفیل[19]) نیز از نمونه خون حاوی مادهٔ ضد انعقاد خون، از روش رنگ‌آمیزی گیمسا استفاده شد. گسترش خونی پس از تهیه با الکل اتانول تثبیت و با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شد. نمونه‌ها به‌صورت حرکت زیگزاگ عدسی میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ انجام گرفت، بر روی لام مشاهده شد و درصد افتراقی به‌واسطهٔ طبقه‌بندی انواع مختلف گلبول‌های سفید براساس تفاوت‌های شکلی، طبق الگوی شکلی و خواص متفاوت رنگ‌پذیری تعیین شد (Blaxhall & Daisley, 1973).

۲–۴. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 18, IBM, USA) انجام شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One–Way ANOVA) انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف اسمیرنف

[1] Alkaline Phosphatase
[2] Lactate Dehydrogenase
[3] Aspartate Aminotransferase
[4] Alanine aminotransferase
[5] Oxidative Enzyme
[6] Superoxide dismutase
[7] Catalase
[8] Glutathione peroxidase
[9] Malondialdehyde
[10] Red Blood Cell Count
[11] White Blood Cell Count
[12] Hematocrit
[13] Hemoglobin
[14] Lysosomes
[15] Differentiated Leukocytes Count
[16] lymphocytes
[17] Monocytes
[18] Neutrophils
[19] Eosinophils

(Kolmogorov-Smirnov) و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون Levene آزمایش شد. برای مقایسهٔ میانگین‌ها از آزمون آماری Duncan در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

۳. یافته‌های پژوهش

۳-۱. شاخص‌های زیست‌سنجی

شاخص‌های رشد بچه‌ماهی کپور معمولی بعد از ۵۶ روز پرورش با جیره‌های حاوی مقادیر متفاوت پودر هسپریدین در جدول ۱ نشان داده شده است. روند رشد ماهیان در طول مدت آزمایش در تیمارهای متفاوت یکسان نبود و اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و تیمارهای آزمایشی مشاهده شد، به‌ترتیبی که بیشترین و کمترین مقدار وزن نهایی به‌ترتیب در تیمارهای ۲۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین در کیلوگرم غذا و تیمار شاهد مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). افزایش وزن بدن، نرخ رشد روزانه و نرخ رشد ویژه در گروه‌های تغذیه شده با تیمارهای مختلف (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم هسپریدین در کیلوگرم غذا) تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند ($P>۰/۰۵$)، با این حال بالاترین مقدار در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین در کیلوگرم غذا مشاهده شد، این درحالی بود که اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). وزن نهایی ماهیان تیمارهای آزمایشی ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم پودر هسپریدین با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند ولی ورن نهایی تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین با دو تیمار مذکور و شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). طبق جدول ۱ شاخص‌های ضریب چاقی، ضریب تبدیل غذایی و نرخ بازماندگی بین تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۱- اثر مقادیر مختلف پودر هسپریدین جیره بر شاخص‌های رشد و تغذیه (خطای استاندارد ± میانگین)
بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در ابتدا و روز ۵۶

شاخص‌های رشد	میزان پودر هسپریدین (میلی‌گرم در کیلوگرم غذا)			
	صفر	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰
وزن اولیه (گرم)	۳۰/۲۱ ± ۱/۸۸^{a}	۲۹/۸۱ ± ۱/۱۲^{a}	۳۰/۴۱ ± ۰/۹۵^{a}	۲۹/۶۳ ± ۱/۱۷^{a}
طول اولیه (سانتی‌متر)	۱۱/۳۲ ± ۰/۱۸^{a}	۱۱/۱۵ ± ۰/۲۶^{a}	۱۱/۳۰ ± ۰/۳۵^{a}	۱۱/۰۳ ± ۰/۴۹^{a}
وزن نهایی (گرم)	۴۵/۳۳ ± ۰/۷۳^{a}	۴۷/۴۶ ± ۱/۰۲^{b}	۵۰/۵۴ ± ۰/۸۷^{c}	۴۸/۲۴ ± ۱/۰۸^{b}
طول نهایی (سانتیمتر)	۱۵/۰۴ ± ۰/۲۲^{a}	۱۵/۶۵ ± ۰/۲۱^{b}	۱۶/۲۸ ± ۰/۳۶^{c}	۱۵/۷۵ ± ۰/۴۱^{bc}
ضریب چاقی	۱/۳۳ ± ۰/۰۴^{a}	۱/۰ ± ۲۴/۰۶^{a}	۱/۱۷ ± ۰/۰۷^{a}	۱/۲۴ ± ۰/۰۷^{a}
افزایش وزن بدن (درصد)	۵۰/۲۵ ± ۶/۷۸^{a}	۵۹/۲۸ ± ۲/۸۷^{b}	۶۶/۲۸ ± ۳/۱۷^{b}	۶۲/۸۵ ± ۲/۴۸^{b}
نرخ رشدروزانه (گرم درروز)	۰/۲۷ ± ۰/۰۳^{a}	۰/۳۲ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۳۶ ± ۰/۰۲^{b}	۰/۳۳ ± ۰/۰۱^{b}
نرخ رشد ویژه (درصد در روز)	۰/۷۳ ± ۰/۰۸^{a}	۰/۸۳ ± ۰/۰۳^{b}	۰/۹۱ ± ۰/۰۳^{b}	۰/۸۷ ± ۰/۰۲^{b}
ضریب تبدیل غذایی	۳/۲۸ ±۰/۴۶^{a}	۲/۸۴ ± ۰/۱۴^{a}	۲/۵۳ ± ۰/۱۳^{a}	۲/۶۸۰ ± ۰/۱۱^{a}
بازماندگی (درصد)	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}

حروف کوچک متفاوت (a, b, c) در هر سطر بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

۳-۲. شاخص‌های خون‌شناسی، ایمنی و آنتی‌اکسیدانی

طبق نتایج جدول ۲، کمترین و بیشترین مقدار فعالیت آنزیم‌های کبدی AST، ALT، ALP و LDH سرم به‌ترتیب در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین و شاهد ملاحظه شد ($P<۰/۰۵$). این به معنی آن است که مقدار فعالیت آنزیم‌های کبدی با افزایش میزان پودر هسپریدین تا مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین روند کاهشی و بیش از آن یعنی ۳۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین روند افزایشی را نشان دادند.

جدول ۲- اثر سطوح مختلف پودر هسپریدین جیره بر میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی، فعالیت لیزوزیمی و ایمنوگلبولین سرم خون (خطای استاندارد ± میانگین) بچه ماهی کپور معمولی روز ۵۶ انجام آزمایش

شاخص‌ها	میزان پودر هسپریدین (میلی‌گرم در کیلوگرم غذا)			
	صفر	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰
آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد بین‌المللی/لیتر)	۴۶۶/۲۶±۱۰/۳۵ d	۳۵۳/۳۹±۱۰/۴۱ c	۲۱۵/۶۴±۹/۳۲ a	۳۱۳/۵۴±۹/۸۷ b
آلانین آمینوترانسفراز (واحد بین‌المللی/لیتر)	۳۹/۳۵±۳/۷۸ d	۲۸/۴۱±۴/۲۱ c	۲۰/۵۳±۲/۲۹ a	۲۵/۷۳±۵/۱۳ b
آلکالین فسفاتاز (واحد بین‌المللی/لیتر)	۲۰۷/۶۴±۸/۱۴ d	۱۳۵/۷۲±۶/۴۸ c	۹۸/۴۷±۳/۷۵ a	۱۲۱/۸۳±۵/۶۷ b
لاکتات دهیدروژناز (واحد بین‌المللی/لیتر)	۴۶۲۷/۸۵±۵۹/۳۴ d	۳۲۲۵/۷۳±۶۴/۷۲ c	۱۷۶۹/۹۷±۴۲/۷۳ a	۲۶۱۹/۲۲±۴۴/۱۵ b
فعالیت لیزوزیم (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۶/۴۲±۱/۰۸ a	۷/۸۶±۰/۹۸ a	۱۲/۸۸±۰/۷۵ c	۱۰/۳۶±۱/۰۴ b
ایمنوگلبولین (میلی‌گرم در دسی لیتر)	۸/۱±۳۸/۱۵ a	۹/۰±۶۳/۶۴ b	۱۱/۰±۲۱/۵۸ c	۱۰/۰±۸۵/۸۳ c

حروف کوچک متفاوت (a, b, c) در هر سطر بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

طبق نتایج میزان فعالیت لیزوزیمی سرم خون ماهی کپور (به‌عنوان شاخص ایمنی ذاتی) در تیمار شاهد با تیمارهای ۱۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$). ولی با تیمارهای آزمایشی ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین تفاوت معنی‌دار را نشان داد ($P<۰/۰۵$) به شکلی که بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم لیزوزیمی سرم خون به‌ترتیب در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین و تیمار شاهد بود. روند تغییرات میزان ایمنوگلبولین با افزایش مقدار پودر هسپریدین در مقایسه با تیمار شاهد افزایشی بود که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P<۰/۰۵$). با این وجود تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین با تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$).

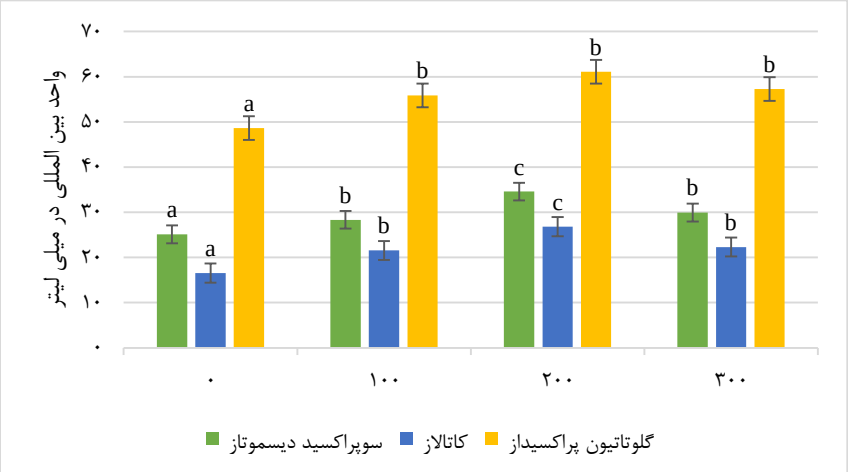
با توجه بـه داده‌های جـدول ۳، مقدار هموگلوبین تیمارهای حاوی پودر ۲۰۰ میلی گرم پودر هسپریدین با شاهد تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$)، در صورتی‌که تیمار شاهد با دو تیمار آزمایشی ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم پودر هسپریدین اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P>۰/۰۵$). درصد هماتوکریت تیمارهای مختلف آزمایشی با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری که با افزایش میـزان پودر هسپریدین، تغییرات درصد هماتوکریت نیز تا تیمار ۲۰۰ میلی گرم پودر هسپریدین روند افزایشی و با افزایش مقدار پودر هسپریدین جیره به ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیرهٔ غذایی روند کاهشی را نشان داد. با افزایش میـزان پودر هسپریدین، تغییرات گلبول‌های قرمز خون نیز تا تیمار ۲۰۰ میلی گرم پودر هسپریدین روند افزایشی و در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم کاهش یافت. گلبول‌های قرمز خون در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$) ولی تیمارهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین با یکدیگر و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<۰/۰۵$).

طبق نتایج شمارش کل گلبول‌های سفید خونی، همهٔ تیمارهای آزمایشی با یکدیگر تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ($P<۰/۰۵$)، به‌ترتیبی که با افزایش میـزان پودر هسپریدین، تغییرات گلبول‌های سفید خونی تا تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین روند افزایشی و در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم کاهش یافت. در شـمارش افتراقـی گلبول سفید، تفاوت معنی‌داری در تعداد لنفوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و نوتروفیـل بین تیمارهای مختلف وجود داشت. بیشترین درصد لنفوسیت مربوط به تیمار شاهد بود که با تیمارهای آزمایشی پودر هسپریدین تفاوت معنی‌داری نشان داد ولی تیمارهای آزمایشی پودر هسپریدین با یکدیگر تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. کمترین درصد نوتروفیل و مونوسیت مربوط به تیمار شاهد بود که با تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با پودر هسپریدین تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$). با افزایش میزان پودر هسپریدین جیره، میزان نوتروفیل و منوسیت‌ها تا تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین روند افزایشی نشان دادند و در تیمار ۳۰۰ میلی گرم کاهش یافت به‌طوری که بیشترین درصد نوتروفیل و مونوسیت مربوط به تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین بود که با سایر تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با پودر هسپریدین تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ($P>۰/۰۵$). کمترین و بیشترین درصد ائوزینوفیل نیز به‌ترتیب مربوط به تیمار شاهد و ۱۰۰ میلی‌گرم پودر هسپریدین بود. تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با پودر هسپریدین تفاوت معنی‌داری نشان نداد ولی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند.

جدول ۳- اثر سطوح مختلف پودر هسپریدین جیره بر شاخص‌های خونی (خطای استاندارد±میانگین) بچه‌ماهی کپور معمولی در روز ۵۶ انجام آزمایش

شاخص‌ها	میزان پودر هسپریدین (میلی‌گرم در کیلوگرم غذا)			
	صفر	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰
هموگلوبین (گرم بردسی لیتر)	۶/۰±۳۱/۷۲^{a}	۷/۰±۱۵/۴۹^{a}	۸/۰±۶۳/۳۱^{b}	۷/۰±۲۶/۸۴^{a}
هماتوکریت (درصد)	۲۳/۱±۴۲/۴۹^{a}	۲۷/۱±۴۸/۶۸^{b}	۳۲/۱±۵۱/۱۸^{c}	۲۸/۱±۸۳/۶۵^{b}
گلبول‌های قرمز خون (تعداد در میکرولیتر × ۱۰^{۶})	۱/۰±۲۴/۰۴^{a}	۱/۰±۳۲/۰۳^{a}	۱/۰±۸۱/۰۸^{b}	۱/۰±۴۹/۱۱^{c}
گلبول‌های سفید خون (تعداد در میکرولیتر × ۱۰^{۳})	۲۲/۵±۹۷/۳۹^{a}	۲۳/۴±۵۷/۵۲^{b}	۲۴/۳±۰۸/۷۴^{cd}	۲۳/۵±۸۵/۸۱^{c}
درصد لنفوسیت	۷۸/۹±۸۲/۷۲^{b}	۷۲/۹±۶۲/۳۴^{a}	۶۹/۸±۶۵/۲۴^{a}	۷۱/۸±۸۴/۱۲^{a}
درصد نوتروفیل	۱۶/۶±۵۴/۸۳^{a}	۲۰/۷±۱۱/۱۲^{b}	۲۲/۵±۱۳/۴۹^{b}	۲۰/۸±۸۱/۲۳^{b}
درصد مونوسیت	۴/۲±۲۱/۷۳^{a}	۵/۲±۸۵/۵۷^{ab}	۶/۱±۹۷/۸۵^{b}	۶/۲±۲۴/۹۳^{b}
درصد ائوزینوفیل	۰/۰±۴۳/۰۷^{a}	۱/۰±۴۲/۰۸^{b}	۱/۰±۲۵/۰۵^{b}	۱/۰±۱۱/۰۹^{b}

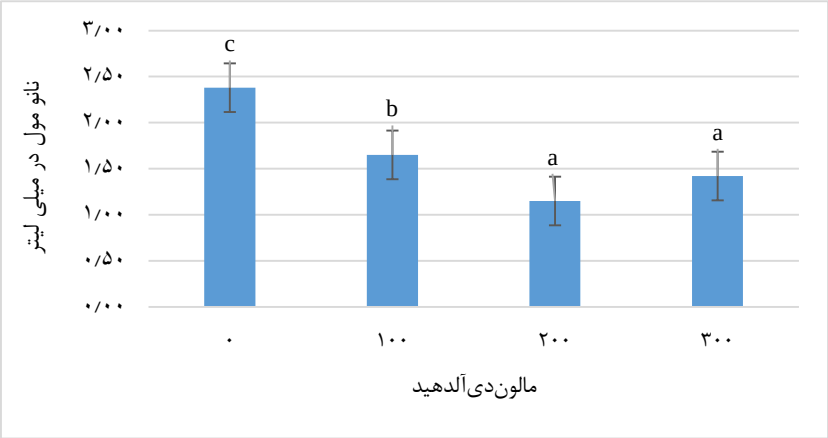
حروف کوچک متفاوت (a, b, c) در هر سطر نشانگر تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین تیمارهای مختلف می‌باشد.



شکل ۱- اثر سطوح مختلف پودر هسپریدین جیره بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز (خطای استاندارد±میانگین) سرم خون بچه ماهی کپور معمولی در روز ۵۶ انجام آزمایش

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی‌های تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی در شکل ۱ ارائه شده است. فعالیت‌های CAT، SOD و GPx در ماهی‌های تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی مکمل (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم هسپریدین در کیلوگرم جیره) به‌طور معنی‌داری بیشتر از ماهی‌های تغذیه‌شده با جیرهٔ کنترل (تیمار ۱) بود ($P<۰/۰۵$). فعالیت کاتالاز در ماهی‌های تغذیه‌شده با جیرهٔ تیمار ۳ در مقایسه با سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($P<۰/۰۵$)؛ به‌طور خاص، فعالیت کاتالاز در تیمار ۳ در مقایسه با تیمارهای ۱، ۲ و ۴ به‌ترتیب ۳۸/۲۹ درصد، ۱۹/۶۹ درصد و ۱۶/۸۱ درصد افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تیمار ۳ در مقایسه با سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری که در مقایسه با تیمار شاهد ۲۷/۳۶ درصد افزایش یافت؛ مقادیر سوپراکسید دیسموتاز در ماهی‌های تغذیه‌شده با تیمارهای ۲ و ۴ به‌ترتیب ۱۸/۰۷ درصد و ۱۳/۳۹ درصد بیشتر بود. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در ماهیانی که با جیره‌های حاوی مکمل پودر هسپریدین تغذیه شده بودند، به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از ماهیانی بود که با جیرهٔ شاهد تغذیه شده بودند ($P<۰/۰۵$)، در حالی‌که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی ۲، ۳ و ۴ وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در ماهیان تیمار ۳ به‌میزان ۲۰/۴۵ درصد بیشتر از تیمار شاهد بود. میزان مالون دی‌آلدئید نمونه‌های سرم ماهیان تغذیه شده با رژیم‌های غذایی آزمایشی حاوی مقادیر مختلف هسپریدین (تیمارهای

۲، ۳ و ۴) به‌طور قابل‌توجهی کمتر از جیرهٔ غذایی کنترل (تیمار ۱) بود ($P<0/05$). علاوه بر این، کمترین میزان مالون دی‌آلدئید در ماهی‌های تغذیه شده با رژیم‌های غذایی تیمارهای ۳ و ۴ مشاهده شد در حالی‌که بیشترین میزان در ماهی‌های گروه کنترل بود. ماهی‌های تغذیه شده با رژیم غذایی تیمار ۲ مقادیر متوسطی نسبت به بقیهٔ گروه‌های غذایی نشان دادند. در میزان مالون دی‌آلدئید نمونه‌های سرم ماهیان تیمار ۳ نسبت به تیمار شاهد کاهش ۴۸/۳۲ درصدی را نشان داد (شکل ۲).



شکل ۲- اثر سطوح مختلف پودر هسپریدین جیره بر میزان مالون دی‌آلدئید سرم خون (خطای استاندارد ± میانگین) بچه‌ماهی کپور معمولی در روز ۵۶ انجام آزمایش

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

استفاده از محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی با توجه به آثار جانبی کمتر بر موجود زنده و محیط‌زیست، عدم ایجاد مقاومت دارویی، ارزان بودن، پایدار و در دسترس بودن، در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای در تحقیقات آبزی‌پروری یافته است. این نتایج یک الگوی دوز مناسب با پاسخ روشن برای هسپریدین در بچه‌ماهی کپور معمولی را طی ۵۶ روز ترسیم می‌کند به‌ترتیبی که سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره، نقطz بهینه‌ای بود که همزمان رشد، کارایی تغذیه، سلامت کبد، ایمنی ذاتی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را بیشینه کرد؛ افزایش دوز به ۳۰۰ میلی‌گرم مزیت افزوده‌ای ایجاد نکرد و برخی پاسخ‌ها تعدیل شدند. چنین الگویی با منطق فیزیولوژیک پلی‌فنول‌های گیاهی در آبزی‌پروری هم‌راستاست چرا که دوزهای میانی معمولاً محور بیان ژن‌های دخیل در استرس اکسیداتیو مانند Keap1/Nrf2 را فعال و همچنین ژن وابسته به التهاب NFκB را مهار می‌کنند، در نتیجه هموستاز ردااکسی و عملکرد بافتی پایدار می‌شود؛ اما دوزهای بالا می‌توانند با بازخوردهای منفی تنظیم‌کننده، منجر به کاهش پذیرش خوراک یا افزایش صرف انرژی جهت دفع ترکیبات متابولیکی هسپریدین گردد، که این فرآیندها خود بخشی از اثربخشی هسپریدین را ازبین ببرد (Harikrishnan *et al.*, 2011; Reverter *et al.*, 2014; Bellezza *et al.*, 2018). همچنین ترکیبات فیتوشیمیایی هسپریدین به‌عنوان یک پلی‌فنول گیاهی، منجر به بهبود فعالیت‌های متابولیک بدن می‌گردند که روند کاتابولیسم گلیکوژن و گلوکز به‌سمت تأمین انرژی مورد نیاز فعالیت‌های طبیعی بدن پیش می‌رود و این امر می‌تواند افزایش رشد را در پی داشته باشد (Banaee *et al.*, 2011). شاخص‌های رشد در همهٔ تیمارهای حاوی هسپریدین نسبت به شاهد بالاتر بود و بیشترین وزن نهایی در ۲۰۰ میلی‌گرم مشاهده شد؛ نرخ رشد روزانه و نرخ رشد ویژه بین تیمارهای حاوی مکمل هسپریدین با هم تفاوت معنی‌دار نداشتند، اما همگی از شاهد بهتر بودند؛ ضریب تبدیل غذایی نیز در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین بهبود نسبی نشان داد. از نظر فیزیولوژیکی نیز بهبود رشد بدون تفکیک آماری بین ۳۰۰–۱۰۰ میلی‌گرم هسپریدین نشان‌دهندهٔ رسیدن به سقف کارایی در این دامنه است؛ نقطهٔ مطلوب در ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین به احتمال زیاد حاصل همزمانی کاهش صرف انرژی در مقابله با استرس اکسیداتیو، بهبود عملکرد دیوارهٔ روده و تسهیل هضم و جذب ریزنوترینت‌های مغذی، کارایی استفاده از مواد مغذی و تخصیص انرژی به رشد را افزایش می‌دهد (در ماهی سالمون کوهو (*Oncorhynchus kisutch*)، پلی‌فنول‌های چای رشد و کارایی تغذیه را همراه با بهبود شاخص‌های بیوشیمی

و دفاع آنتی‌اکسیدانی افزایش دادند و الگوی مزیت دوزهای میانی را تأیید کردند (Yu *et al*., 2024). در ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*)، کورکومین و ترکیبات گیاهی مشابه رشد و FCR را در سطوح بهینه بهبود دادند و در سطوح بالاتر افت نسبی رسیدند (Hemat *et al*., 2017; Dev *et al*., 2024)، مکمل‌های کوئرستین و رزوراترول نیز در دوزهای میانی جیرهٔ غذایی ماهی کپور معمولی باعث کارایی تغذیه و بهبود شاخص‌های رشد شدند (Jasim *et al*., 2022; Wu *et al*., 2022). در مطالعهٔ حاضر نتایج حاصل از رشد، احتمالاً ناشی از امحاء عوامل سمی غذا توسط هسپریدین بوده که منجر به بهبود فعالیت‌های متابولیک، عملکرد کبد و تقویت شاخص‌های ایمنی ماهی گردیده است، در نتیجه تحریک رشد را باعث شده‌اند (Jian & Wu, 2004). همچنین در طی دورz آزمایش، میزان بازماندگی در تیمار شـاهد و تیمـارهای تغذیـه شده با هسپریدین ۱۰۰ درصد بود و هیچ تلفاتی در حین آزمایش مشاهده نشد. این امر نشان‌دهندهٔ بهینه بودن شرایط پرورش شامل کیفیت آب، تغذیه و غیره است. نتایج این تحقیق نشان داد که سطح ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین در کیلوگرم جیره بهترین اثر را بر رشد، کارایی تغذیه، سلامت کبد، ایمنی و دفاع آنتی‌اکسیدانی بچه‌ماهی کپور معمولی داشت. این یافته‌ها با مطالعه Albaqami و Alqahtani (۲۰۲۵) بر روی تیلاپیا نیل همخوان است که نشان داد مکمل هسپریدین موجب بهبود رشد، کاهش آنزیم‌های کبدی و ارتقای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. طبق یافته‌های مطالعهٔ حاضر، کاهش معنی‌دار AST، ALT، ALP و LDH در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین در هر کیلوگرم غذا، با برگشت نسبی در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم هسپریدین در هر کیلوگرم غذا، بیانگر محافظت کبدی در دوز بهینه و تعدیل آن در دوز بالاتر است. به‌ترتیبی که عملکرد آنتی‌اکسیدانی هسپریدین منجر به محافظت از کبد و کاهش التهاب سلول‌های کبد می‌گردد، که به‌طور بالقوه از طریق تعامل با میکروبیوتای روده و بهبود سطح آنزیم‌های کبدی انجام می‌شود. در واقع پلی‌فنول هسپریدین یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌باشد که میزان بهینهٔ هسپریدین جیرهٔ غذایی، خنثی کردن رادیکال‌های آزاد (ROS) و مهار التهاب، کاهش پراکسیداسیون چربی‌ها، تثبیت در غشای سلولی و بهبود عملکرد میتوکندری، نفوذپذیری غشای سلولی و نشت آنزیم‌های کبدی را کاهش می‌دهد، پروفایل لیپیدی و کارکرد میتوکندری را تثبیت می‌کنند و از طریق فعال‌سازی ژن‌های محافظت کننده از سلول مرتبط به Nrf2 (مانند HO-1 وNQO1) و مهار سیگنال‌های NFκB، ظرفیت سم‌زدایی را بالا می‌برند که در واقع محور توضیحی فوق، اثرات رایج ترکیبات پلی‌فنولی است (Lateef and Qureshi, 2016; Bellezzaa et al., 2018).

برتری ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین در یک کیلوگرم غذا نسبت به ۳۰۰ میلی‌گرم بیانگر پنجرهٔ کارآمدی است که در آن سیگنال‌های رداکسی و ایمنی هم‌افزا می‌شوند؛ در دوزهای بالاتر، بازخورد منفی (Negative Feedback) مسیرهای رداکسی، کاهش پذیرش خوراک، یا افزایش بار متابولیسم و دفع پلی‌فنول‌ها می‌تواند مزایا را تعدیل کند (Harikrishnan *et al*., 2011; Dawood *et al*., 2018; Reverter *et al*., 2014; Bellezza *et al*., 2018). کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی با پلی‌فنول‌های چای در ماهی سالمون کوهو (Yu *et al*., 2024)، با کورکومین بارگذاری شده با نانوذرات اکسید روی در ماهی تیلاپیا (Yazdani *et al*., 2023) و با رزوراترول و کوئرستین در ماهی کپور معمولی (Wu *et al*., 2022; Jasim *et al*., 2022) به‌صورت همسو با مطالعz حاضر گزارش شده است؛ که همگی بهبود پروفایل اکسیداتیو التهابی و متابولیسم لیپید را همراه دارند. بدین‌ترتیب همگی کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی را در دوزهای بهینه نشان داده‌اند؛ همزمان، کاهش MDA و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، امضای زیستی و شاخص بالینی مناسبی جهت تشخیص آسیب‌های وارده به کبد محسوب شوند، که اثر حفاظت کبدی پلی‌فنول هسپریدین را تقویت می‌کند.

ایمنی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های فیزیولوژیک برای مقابله با عوامل بیماری‌زا و حفظ هموستازی بدن است. یکی از بخش‌های مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی در ماهی‌ها، میزان فعالیت لیزوزیم سرم می‌باشد (Sakai, 1999) که افزایش فعالیت آن بعد از تجویز محرک‌های ایمنی، واکسن‌ها و برخی پروبیوتیک‌ها در ماهی گزارش گردیده است (Alishahi *et al*., 2011). بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان لیزوزیم با افزایش تعداد سلول‌های بیگانه‌خوار افزایش می‌یابد (Sahoo *et al*., 2005). نتایج مطالعهٔ حاضر حاکی از افزایش معنی‌دار فعالیت لیزوزیم و سطح ایمنوگلوبولین‌ها با مکمل هسپریدین در مقایسه با تیمار شاهد بود و اوج فعالیت آنها در تیمار در ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین در کیلو گرم غذا بود. ایمونوگلوبولین‌ها در همهٔ تیمارهای مکملی نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار داشتند؛ اوج عددی آن در تیمارهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بود.

هموگلوبین، هماتوکریت و RBC در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم به‌طور معنی‌دار بهتر از شاهد بودند؛ هموگلوبین در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین جیره غذایی نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌دار نشان داد؛ هماتوکریت تا ۲۰۰ میلی‌گرم صعودی بود و در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم کاهش یافت. WBC کل و الگوی افتراقی نشان دادند نوتروفیل و مونوسیت تا ۲۰۰ میلی‌گرم افزایش (بیشینه) و در ۳۰۰ میلی‌گرم کاهش یافتند؛ بیشترین درصد لنفوسیت در تیمار شاهد مشاهده شد، و مکمل‌سازی جیرهٔ غذایی با هسپریدین در سایر تیمارهای آزمایشی منجر به کاهش معنی‌دار درصد لنفوسیت گردید. نوتروفیل و مونوسیت تا ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین افزایش و در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم هسپریدین کاهش نشان دادند (بیشترین درصد نوتروفیل و مونوسیت در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین). افزایش لیزوزیم و ایمونوگلوبولین و تغییر الگوی افتراقی گلبول‌های سفید به‌سمت نوتروفیل و مونوسیت، نشان‌دهندهٔ تقویت ایمنی غیر اختصاصی و ظرفیت فاگوسیتوز است. ارتقای سطح هموگلوبین، هماتوکریت و گلبول قرمز، حمل اکسیژن و توانایی مقابله با تنش را بهبود می‌دهد. الگوی دوز–پاسخ (اوج در ۲۰۰؛ تعدیل در ۳۰۰) بازتابی از نقطهٔ بهینه ایمونومدولاسیون است که در آن تحریک مفید بدون برهم‌زدن هموستاز حفظ می‌شود. با توجه به اینکه نوتروفیل از عوامل تولید لیزوزیم می‌باشند، در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید بیشترین درصد نوتروفیل‌ها نیز مربوط به ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین بود که احتمالاً این خود دلیل افزایش سطح لیزوزیم در تیمار مذکور می‌باشد. ایجاد عفونت یا استرس در بدن به تغییر تعداد گلبول‌های سفید خون یا سرکوب فعالیت‌های آن منجر می‌شود. تعداد گلبول‌های سفید در مطالعهٔ حاضر در محدودهٔ مناسب برای کپور ماهیان ۲۲۹۷۰–۲۴۰۸۰ در میکرولیتر بود (Tripathi *et al*., 2004). افزایش لیزوزیم، گلبول‌های سفید و پارامترهای ایمنی غیر اختصاصی با کورکومین و پلی‌فنول‌های چای به‌ترتیب در ماهی تیلاپیا و ماهی سالمون کوهو گزارش شده است (Amer *et al*., 2022; Yu *et al*., 2024)، و در تغذیهٔ ماهی کپور معمولی با کوئرستین و رزوراترول جیره غذایی نیز نتایج مشابه بود (Li *et al*., 2022; Jasim *et al*., 2022)، که نتایج مطالعات مذکور با نتایج مطالعهٔ حاضر همسو بود. الگوی دوز وابستگی (مزیت در میانه دوز و افت در دوزهای بالا) در ایمونومدولاسیون پلی‌فنول‌ها نیز مکرراً تأیید شده است (Reverter *et al*., 2014).

ایمنوگلبولین‌ها جزء آنتی‌بادی‌های طبیعی هستند که در غیاب محرک آنتی‌ژنیک خارجی تولید می‌شوند و محافظت فوری و گسترده‌ای را در برابر عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌کنند و به‌عنوان یکی از بخش‌های حیاتی سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی است. استفاده از محرک‌های ایمنی باعث تغییر در سطوح ایمنوگلبولین سرم خون می‌شود (Nayak *et al*., 2007). ایمنوگلبولین‌ها دسته‌ای از گلیکوپروتئین‌ها هستند که در سرم و مایعات بافتی تمام مهره‌داران یافت شده و کاهش سطح آنها می‌تواند منجر به تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها شود (Alishahi *et al*., 2011). وجود ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی نظیر فلاونوئید و پلی فنول‌ها در پودر هسپریدین، می‌تواند توجیه‌کنندهٔ افزایش برخی از فاکتورهای سیستم ایمنی نظیر ایمنوگلبولین کل سرم در بچه ماهی کپور معمولی باشد (Buzdağlı *et al*., 2022). پلی‌فنول‌ها با کاهش استرس اکسیداتیو و تعدیل سایتوکاین‌ها، عملکرد فاگوسیتی و آنزیم‌های لیزوزومی را تقویت و تعادل لکوسیتی را به‌سمت دفاع غیر اختصاصی کارآمدتر سوق می‌دهند؛ کاهش آسیب اکسیداتیو به اریتروسیت‌ها، حمل اکسیژن را بهبود می‌دهد (Harikrishnan *et al*., 2011; Dawood *et al*., 2018). همچنین، نتایج حاضر با گزارش Qi و همکاران (۲۰۲۴) در مورد اثر مکمل‌های گیاهی بر رشد و ایمنی ماهیان و سخت‌پوستان مشابه است؛ آنها نشان دادند که ترکیبات گیاهی می‌توانند به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری عمل کنند و ایمنی غیر اختصاصی را تقویت نمایند.

وظیفه اصلی سلول‌های قرمز خون یا اریتروسیت‌ها، حمل و انتقال گاز در سراسر بدن است. تعداد گلبول‌های قرمز در یک گونه ماهی به وضع بهداشت و سلامت ماهی بستگی دارد (Harikrishnan *et al*., 2003). لذا به نظر می‌رسد که می‌توان از این فاکتور به عنوان یک شاخص جهت تأیید وضعیت بهداشت و سلامت ماهیان در تیمارهای مختلف تا پایان دوره آزمایش استفاده نمود. در کپور سالم، تحت شرایط دمایی مناسب، تعداد اریتروسیت‌ها بین ۱۸۰۰۰۰۰ –۱۱۰۰۰۰۰ عدد می‌باشد (Soltani *et al*., 2010). افزایش معنی‌دار Hb، Hct و RBC در تیمار آزمایشی ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین نشان‌دهندهٔ تأثیر مثبت عصاره بر شاخص‌های خونی در ماهی کپور است که احتمالاً می‌تواند ناشی از اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره 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 (Singh & Kumar, 2011). 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 (Lanping *et al*., 2000). با توجه به در نظر گرفتن اثرات 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 گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت با مصرف جیرهٔ حاوی پودر هسپریدین، اثرات آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنول‌های هسپریدین می‌باشد. مشاهدات Shafiei و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی تأثیر عصاره پوست انار بر فاکتورهای خونی ماهی انگشت قدکپور معمولی با این پژوهش همخوانی دارد. طبق نتایج تحقیق حاضر، اعداد به‌دست آمده برای تعداد گلبول‌های قرمز خون نزدیک به محدودهٔ مناسب برای کپور ماهیان است (Tripathi *et al*., 2004). همچنین هیچ گونه تغییر شکل و اندازهٔ غیرعادی که ناشی از دوز اضافی پودر هسپریدین (تیمار ۴) باشد نیز در سلول‌های خونی مشاهده نشد. فعالیت SOD، CAT و GPx در همهٔ تیمارهای حاوی مکملی هسپریدین بالاتر از شاهد بود؛ به‌ترتیبی که بیشترین مقدار فعالیت آنزیم‌های دخیل در دفاع آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیو در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم هسپریدین مشاهده شد. مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به‌طور معنی‌دار در تیمارهای ۲ و ۴ کمتر از شاهد بود و در تیمار ۳ کاهش معنی دار ۴۸/۳۲ درصدی نسبت به شاهد ثبت شد؛ میزان GPx بین تیمارهای مکملی هسپریدین تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد، اما همگی نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بودند. هم‌افزایی افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌علاوه کاهش MDA می‌تواند نشانگر فعال‌سازی محور Nrf2 و کاهش پراکسیداسیون چربی‌ها باشد؛ این اثر مستقیماً به تثبیت و بهبود غشای سلولی، کاهش نشت آنزیم‌های کبدی و ارتقای کارایی متابولیک پیوند می‌خورد (Dev *et al*., 2024). نبود تفاوت معنی‌دار GPx بین دوزهای مکملی هسپریدین در کنار برتری نسبت به شاهد، سقف کارایی آنزیمی در دامنهٔ دوز آزمایش را تأیید می‌کند (Dawood *et al*., 2018). الگوی افزایش CAT/SOD/GPx و کاهش MDA در ماهیان تغذیه‌شده با پلی‌فنول‌های چای (Yu *et al*., 2024)، کورکومین و کوئرستین (Hemat *et al*., 2017; Li *et al*., 2022; Jasim *et al*., 2022;)، و رزوراترول (Wu *et al*., 2022) به‌صورت همسو با مطالعهٔ حاضر گزارش شده است. مرورهای جامع نیز تقویت آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زاد و کاهش آسیب اکسیداتیو را مکانیسم غالب اثر پلی‌فنول‌ها می‌دانند (Reverter *et al*., 2014; Dev *et al*., 2024). با مرور مطالع Hu Z و همکاران (۲۰۲۵) دربارهٔ آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در آبزی‌پروری تأکید می‌کند که پلی‌فنول‌ها مانند کورکومین، کوئرستین و رزوراترول نیز الگوهای مشابهی از بهبود رشد، کاهش پراکسیداسیون چربی‌ها و تقویت ایمنی مانند مطالعهٔ حاضر را نشان می‌دهند. همسویی کاهش آنزیم‌های کبدی و MDA با افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بهبود هماتولوژی، یک روایت زیستی یکپارچه را ترسیم می‌کند، یعنی کاهش بار استرس منجر به تثبیت عملکرد بافتی و نهایتاً آزادسازی ظرفیت رشد و بهبود کارایی تغذیه می‌گردد.

۵. نتیجه‌گیری نهایی

مکمل‌سازی جیرهٔ بچه‌ماهی کپور معمولی با هسپریدین، به‌ویژه در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، به‌طور همزمان منجر به بهبود عملکرد رشد، کارایی تغذیه، سلامت کبد، ایمنی غیر اختصاصی و دفاع آنتی‌اکسیدانی گردید؛ افزایش دوز به ۳۰۰ میلی‌گرم مزیت افزوده‌ای نداشت و در برخی شاخص‌ها تعدیل ایجاد شد. نتایج این مطالعه نشان داد که برتری استفاده از دوز ۲۰۰ میلی گرم هسپریدین در هر کیلو گرم جیرهٔ غذایی بچه‌ماهی کپور معمولی نسبت به سایر تیمارها، عمدتاً از طریق تقویت هموستاز ردااکسی (فعال‌سازی Nrf2 و افزایش CAT/SOD/GPx)، مهار التهاب (کاهش NF-κB)، بهبود پوشش دیوارهٔ روده و بهبود غشای سلولی باغث بهینه‌سازی پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی می‌گردد. از منظر عملی، هسپریدین را می‌توان به‌عنوان افزودنی کارکردی قابل اتکا برای افزایش کارایی و تاب‌آوری در شرایط پرورش متراکم به‌کار گرفت؛ با این تأکید که بهینه‌سازی دوز برحسب گونه، مرحلهٔ رشدی و شرایط مزرعه با مطالعات بلندمدت، چالش بیماری، تحلیل میکروبیوم و ارزیابی پایداری در فرآوری خوراک تکمیل شود. مقایسه‌های سربه‌سر با سایر پلی‌فنول‌ها (کورکومین، کوئرستین، رزوراترول، کاتچین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها) نیز برای طراحی جیره‌های ترکیبی و هم‌افزا توصیه می‌شود. این یافته‌ها با بدنهٔ شواهد موجود دربارهٔ سایر پلی‌فنول‌ها هم‌خوان است، که افزودنی هسپریدین به‌عنوان یک فلاونوئید گیاهی می‌تواند در کنار سایر پلی‌فنول‌ها جایگاه مهمی در تغذیهٔ آبزیان داشته باشد. با توجه به

توسعهٔ کمی پرورش ماهیان گرمابی در کشور و محدودیت‌های استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و ضرورت استفاده از ظرفیت‌های مختلف در افزایش بهره‌وری در پرورش آبزیان، استفاده از محرک‌های رشد و ایمنی به‌عنوان راهکاری در توسعهٔ کیفی این صنعت ضروری به‌نظر می‌رسد. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که پودر هسپریدین باعث بهبود شاخص‌های خونی، تحریک ایمنی و رشد بچه ماهی کپور در محدودهٔ وزنی بررسی شده می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند که از دانشگاه خلیج فارس بوشهر و دانشگاه زابل برای فراهم کردن امکانات لازم برای انجام این مطالعه تشکر کنند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان گزارش نشده است.

References

Abdel-Latif, H.M.R., Soliman, A.A., Sewilam, H., Almeer, R., Doan, H.V., Alagawany, M., Dawood, M.A.O., 2020. The influence of raffinose on the growth performance, oxidative status, and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Reports* 18(100457), 1-5. DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100457

Acerete, L., Balasch, J.C., Espinosa, E., Josa, A., Tort, L., 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluvitilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *The Journal of Aquaculture* 273(1-4), 167-178.

Ahmadifar, A., Mohammadzadeh, S., Kalhor, N., Yousefi, M., Shahriari Moghadam, M., Naraballobh, W., Ahmadifar, M., Hoseinifar, S.H., Doan, H.V. 2022. Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruit extract improves growth performance, disease resistance, and serum immune-and antioxidant-related gene expression of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 558(738372), 1-10. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738372.

Ahmadifar, E., Shahriari Moghadam, M., Sheikhzadeh, N., 2019. The effect of persimmon leaf extract (*Diospyros kaki*) as feed additive on some blood parameters and non-specific immune response in Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Sciences* 7(11), 27-36. (In Persian)

Akbary, P., Ghareghani poor, M., Fereidouni, M.S., 2015. Effects of *Zataria multiflora* boiss and *Mentha pulegium* extracts on phagocytosis, lysozyme, respiratory burst and blood cells of rainbow trout. *Journal of Veterinary Research* 70(4), 447-454. (In Persian)

Akiyama, S., Katsumata, S. I., Suzuki, K., Ishimi, Y., Wu, J., Uehara, M., 2010. Dietary hesperidin exerts hypoglycemic and hypolipidemic effects in streptozotocin-induced marginal type 1 diabetic rats. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 46(1):87-92. DOI: 10.3164/jcbn.09-82

Albaqami, N.M., Alqahtani, A.N., 2025. Analysis of the dose–response dietary effects of hesperidin on growth, blood biomarkers, antioxidant homeostasis, immune/inflammatory signaling, and resistance to *Fusarium oxysporum* infection in *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia). *Aquaculture International* 33, 674.

Alishahi. M., Soltani, M., Mesbah, M., Esmaeilli Rad, A., 2011. Effects of dietary *Silybum marianum* extract on immune parameters of the Common carp. *Journal of Veterinary Research* 66(3), 255-263. (In Persian)

Allsopp, M., Johnston, P., Santillo, D., 2008. Challenging the Aquaculture Industry on Sustainability. Greenpeace Research Laboratories Technical Note. Green peace Research Laboratories, University of Exeter, UK. 24 p.

Amer, S.A., El-Araby,D.A., Tartor, H., Farahat, M., Goda, N.I.A., Farag, M.F.M., Fahmy, E.M., Hassan, A.M., Abo El-Maati, M.F., Osman, A., 2022. Long-Term Feeding with Curcumin Affects the Growth, Antioxidant Capacity, Immune Status, Tissue Histoarchitecture, Immune Expression of Proinflammatory Cytokines, and Apoptosis Indicators in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Antioxidants* 11, 937. DOI: 10.3390/antiox11050937.

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. *Fish Physiology Biochemistry*. 37: 887-896.

Bansal, K., Bhati, H., Vanshita., Bajpai, M., 2024. New insights into therapeutic applications and nanoformulation approaches of hesperidin: An updated review. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine* 10, 100363. DOI: 10.1016/j.prmcm.2024.100363

Bellezzaa, I., Giambancoa, I., Minellia, A., Donato, R., 2018. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. BBA - Molecular Cell Research, 1865, 721-733. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010

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

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitation of protein utilizing the principal of protein– dye binding. *Annals of Clinical Biochemistry* 72, 248-254.

Buzdağlı, Y., Eyipınar, C.D., Kacı, F.N., Tekin, A., 2023. Effects of hesperidin on anti-inflammatory and antioxidant response in healthy people: a meta-analysis and meta-regression. *International Journal of Environmental Health Research* 33(12), 1390-1405. DOI: 10.1080/09603123.2022.2093841

Dawood, M. A. O., Koshio, S., Esteban, M.A., 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture* 10(4), 950-974. DOI: 10.1111/raq.12209

Dev, A.K., Thakur, R., Yadav, S., 2024. Deciphering the importance of herbal immunostimulants in aquaculture, using citation network analysis: A futuristic sustainable approach. *Comparative Immunology Reports* 6, 200129. DOI: 10.1016/j.cirep.2023.200129

Dimpfel, W., 2006. Different anticonvulsive effects of hesperidin and its aglycone hesperetin on electrical activity in the rat hippocampus in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58(3), 375-379.

Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Robertson, B.S., Van Muiswinkel, W.B. (eds.). Techniques *in Fish Immunology*, SOS publication, Fair Haven, NJ, USA. pp. 101-103.

FAO. 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom, Italy, www.fao.org/publications. 264 p.

Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J.D., Singla, A.K., 2001. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research* 15(8), 655-669.

Ghasemi Pirbaluti, A., Pir Ali, E., Pishkar, G.R., Jalali, S.M.A., Raisi, M., Jafarian D.M., Behzad, H., 2010. Effect of some medicinal plants essential oils on the immune system of rainbow trout. *Quarterly Herbs* 2, 149-155. (In Persian)

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

Guzmán-Gutiérrez, S.L., Navarrete A., 2009. Pharmacological exploration of the sedative mechanism of hesperidin identified as the active principle of Citrus sinensis flowers. *Planta Med* 75, 295-301.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M. S. 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317, 1-15. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.03.039

Harikrishnan, R., Nisha, M.R., Balasundaram, C., 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221, 41-50.

Hemat, K., Mahmoud Adham A., Al-Sagheer Fayez, M., Reda Samir A., Mahgoub Mohamed, S.A., 2017. Dietary curcumin supplement influence on growth, immunity, antioxidant status, and resistance to Aeromonas hydrophila in *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 475: 16-23. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.03.043.

Hu, X., Ma, W., Zhang, D., Tian, Z., Yang, Y., Huang, Y., Hong, Y., 2025. Application of natural antioxidants as feed additives in aquaculture: A review. *Biology* 14(1), 87. DOI: 10.3390/biology14010087

Iwama, G., Nakanishi, T., 1996. Innate immunity in fish. In: The Fish Immune System. *Academic Press*, London, UK. pp: 73-114.

Jasim, S. A., Al-Mosawi, R. H., Khalikov, K., Abdelbasset, W. K., Ahmad, I., Shoukat, S., Jawad, M. A., Hafsan, H., Fakri Mustafa, Y., Norbakhsh, M., 2022. Dietary quercetin improved growth, body composition, haematology, immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research* 53, 6910-6920. DOI: 10.1111/are.16156

Jian, J., Wu, Z., 2004. Influences of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity of *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology* 16, 185-191.

Johnson, E.J., 2002. The role of carotenoids in human health. *Nutrition in Clinical Care* 5(2), 56-65.

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

Lateef, T., Qureshi, A., 2016. *Centratherum anthelminticum* and *Withania coagulans* Improves Lipid Profile and Oxidative Stress in Triton X-100 induced Hyperlipidemic Rabbits. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 8(6), 933-940.

Lazado, C.C., Caipang, C.M.A., Estante, E.G., 2015. Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions *Fish and Shellfish Immunology* 45, 2-12.

Li, K., Wangmi, Y., Zheng, Z., Jinag, R., Xie, N., 2009. Replacing fish meal with rendered animal protein ingredients in diets for Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*, reared in net pens. *Journal of the World Aquaculture Society* 40, 67-75.

Liu, F., Qu, Y., Geng, C., Wang, A., Zhang, J., Chen, K., Liu, B., Tian, H., Yang, W., Yu, Y., 2020. Effects of hesperidin on the growth performance, antioxidant capacity, immune responses and disease resistance of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Fish and Shellfish Immunology* 99, 154-166. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.02.014

Middleton, E.J., Kandaswami, C.H., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews* 52(4), 673-751.

Moradi, M., Falahatkar, B., Sattari, M., Alishahi, M., 2018. Effect of different levels of hydroalcoholic extract of *Viscum album* on growth and hematological indices in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Journal of Aquaculture Sciences* 6(9), 1-12. (In Persian)

Nayak, S., Swain, P., Mukherjee, S., 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major Carp, *Labeo rohita* (Ham). *Fish and Shellfish Immunology* 23, 892- 896.

Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017-1024.

Predy, V.R., Reilly, M.E., Mantlc, O., Peters, T.J., 1998. Oxidative damage in liver diseases. *JIFCC* 10, 16-20.

Qi, C., Xu, Q., Ming, J., Song, F., Zhou, C. 2024. Effect of dietary supplementation on the growth and immunity of fish and shellfish. *Fishes* 9(5), 176. DOI: 10.3390/fishes9050176

Quesada, S.P., Paschoal, J.A., Reyes, F.G.R., 2013. Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones A review. *Food Science* 78, 1321-1333.

Řehulka, J., 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 190, 27-47.

Reverter, M., Bontemps, N., Lecchinia, D., Banaigs, B., Sasal, P., 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433, 50-61. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.048

Roohbakhsh, A., Parhiz, H., Soltani, F., Rezaee, R., Iranshahi, M., 2015. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Sciences* 124, 64-74. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.12.030.

Sahoo, P.K., Kumarij, J., Mishra, K., 2005. Nonspecific immune responses in juveniles of Indian Major Carp. *Journal of Applied Ichthyology* 21, 151-155.

Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-92.

Shafiei, F., Soofiani, N.M., Ebrahimi, E., Nematollahi, A., Mohebbi, A., 2016. Effect of alcoholic extract of pomegranate peel (*Punica granatum* L.) on blood parameters of common carp *(Cyprinus carpio)* fingerling. *Fisheries Science and Biotechnology* 5(2), 59-72. (In Persian)

Sharif Zadeh S.A., Khara H., Ghobadi S.H. 2016. Effect of riboflavin vitamin on growth, resistance of blood parameters and immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Development* 10(2), 57-63.

Singh, G., Kumar, P., 2011. Evaluation of antimicrobial efficacy of flavonoids of *Withania somnifera*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 73(4), 473-478.

Siwicki, A.K.; Anderson, D.P., Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 14, 125-139.

Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A., Zargar, A., 2010 Effect of *Zataria multiflora* essential oil on innate immune responses of common carp. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 5(3), 191-199.

Swain, P.S., Dash, P.K., Sahoo, P., Routray, S.K., Sahoo, S.D., Gupta, P.K., Meher, N., 2006. Nonspecific immune parameters of brood *Labeo rohita* and their seasonal variations. *Fish and Shellfish Immunology* 22, 38-43.

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

Tripathi, P., Dubey, N.K. 2004. Exploitation of Natural Products as an Alternative Strategy to Control Postharvest Fungal Rotting of Fruit and Vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 32: 235-245.

Vitcheva, V., Simeonova, R., Kondeva-Burdina, M., Mitcheva, M. 2015. Selective Nitric Oxide Synthase Inhibitor 7-Nitroindazole Protects against Cocaine-Induced Oxidative Stress in Rat Brain. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2015, Article ID 157876, 8 pages. DOI: 10.1155/2015/157876.

Wu, D., Li, J., Fan, Z., Wang, L., Zheng, X. 2022. Resveratrol ameliorates oxidative stress, inflammatory response and lipid metabolism in common carp (*Cyprinus carpio*) fed with high-fat diet. *Frontiers in Immunology* 13, 965954. DOI: 10.3389/fimmu.2022.965954

Yazdani, Z., Shamsaie Mehrgan, M., Hosseini Shekarabi, S. P., Khayatzadeh, J., Homayouni Tabrizi, M. 2023. Dietary green-synthesized curcumin-mediated zinc oxide nanoparticles promote growth performance, haemato-biochemical profile, antioxidant status, immunity, and carcass quality in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Reports* 32, 101717. DOI: 10.1016/j.aqrep.2023.101717

Yu, H., Sattanathan, G., Yu, L., Li, L., Xiao, Y., 2024. Nutritional tea polyphenols enhance growth, feed efficiency, antioxidant capacity and immunity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Animals* 14(14), 2104. DOI: 10.3390/ani14142104