

اثر عصاره گیاه سالیکورنیا *Salicornia sp.* بر فعالیت آنزیم‌های کبدی و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus* Linnaeus, ۱۷۸۵)

- پریا اکبری*: گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
- اسماء بلوچ‌امین: گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
- زهرا امینی‌خویی: مرکز تحقیقات آب‌های دور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

گیاه سالیکورنیا (*Salicornia sp.*) یکی از گیاهانی است که جنبه‌های دارویی موثری برای آن قائل شده‌اند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره الکلی گیاه سالیکورنیا (*Salicornia sp.*) بر فعالیت آنزیم‌های کبدی (آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP)) و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتین پراکسیداز (GPX)، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و کاتالاز (CAT)) ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) به مدت ۶۰ روز می‌باشد. در این مطالعه، تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی $8/42 \pm 0/43$ گرم در یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار آزمایشی و ۳ تکرار (با تعداد ۲۰ قطعه در هر تکرار) مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمار شاهد (بدون عصاره گیاه) و تیمارهای آزمایشی ۲، ۳ و ۴ به ترتیب دارای ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم عصاره گیاه در هر کیلوگرم عصاره گیاه در غذا بودند. در پایان آزمایش، بیش‌ترین شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی CAT، GPX و کم‌ترین شاخص آنتی‌اکسیدانی MDA و آنزیم‌های ALT، AST و ALP در تیمار حاوی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره الکلی گیاه مشاهده شد که با تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0/05$). لذا با توجه به نتایج به‌دست آمده، به‌منظور کاهش اکسیداسیون لیپید و بهبود سلامت کبد، استفاده از عصاره گیاه سالیکورنیا به‌عنوان مکمل غذایی مهم برای ماهی کفال خاکستری توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: ماهی کفال خاکستری، عصاره گیاه سالیکورنیا، رادیکال‌های آزاد، استرس اکسیداتیو



مقدمه

توسعه آبی‌پروری و افزایش تقاضا برای مصرف آبزیان، باعث افزایش تراکم پرورش در استخرها و در نتیجه افزایش استرس به آبزیان و هم‌چنین افزایش شیوع بیماری‌ها شده است (Byun و همکاران، ۲۰۱۰). استرس اکسیداتیو را به‌عنوان یک فعالیت اکسیداتیو یا تشکیل سریع فرم فعال اکسیژن (Reactive Oxygen species = ROS) می‌گویند که نقش مهمی در شیوع بسیاری از بیماری‌ها دارد. ROS یکی از انواع رادیکال‌های آزاد است که در شرایط نامتعادل واکنش‌های اکسیداسیون و احیای درون سلولی تولید می‌شود که قدرت اکسید کنندگی بالا و توانایی زیادی جهت آسیب زدن به اجزای حیاتی سلول از قبیل لیپیدها، DNA، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها دارند (Agarwal و Sekhon، ۲۰۱۰). موجودات زنده سیستم آنتی‌اکسیدانی پیچیده‌ای جهت مقابله با گونه‌های فعال رادیکال‌های آزاد و کاهش مخرب آن‌ها دارند (Woodside و Young، ۲۰۰۱). سیستم آنتی‌اکسیدانی به‌صورت سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی عمل می‌کنند (Morales و همکاران، ۲۰۰۴). آنزیم‌ها دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل گلوکوتایون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) اشاره کرد که به‌همراه دیگر آنزیم‌ها مجموعه‌ای از دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی را تشکیل می‌دهند و نقش حذف رادیکال‌های آزاد را بر عهده دارند و به‌طور کلی تمامی عوامل آنتی‌اکسیدانی موجود در بدن موجود زنده چه آنزیم‌های درون سلولی و چه ترکیبات مغذی آنتی‌اکسیدانی (عوامل غیر آنزیمی) همگی تحت عنوان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (Total Antioxidant Capacity (TAC) نامیده می‌شوند (Agarwal و Sekhon، ۲۰۱۰). علی‌رغم وجود آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در بدن، سیستم دفاعی بدن به تنهایی قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در بدن نیست به‌همین جهت نیاز به تامین آنتی‌اکسیدان از منابع خارجی دارد که از طریق مواد غذایی تامین می‌شود (Woodside و Young، ۲۰۰۱). بسیاری از گیاهان با داشتن آنتی‌اکسیدان‌های فراوان و چربی‌های امگا ۳ و امگا ۶ باعث مهار پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود و این ویژگی با شکستن ساختار اکسیدکننده موجود توسط سیتوکروم P ۴۲۱ و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد اعمال می‌شود (Agarwal و Sekhon، ۲۰۱۰). هم‌چنین به‌دلیل داشتن خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی و هم‌چنین داشتن ترکیبات بیولوژیک فعال مثل پلی‌ساکاریدهای پیچیده، پروتئین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، کاروتنوئیدها، ویتامین‌ها و مواد معدنی به‌عنوان پتانسیلی برای افزایش بازماندگی، بهبود رشد و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌های ماهی‌های پرورشی مورد توجه هستند (Magnadottir، ۲۰۰۶). گیاه سالیکورنیا *Salicornia sp.* از خانواده اسفنجیان و نمک‌دوست بوده و در خاک‌های شور قابل رشد

است. این گیاه بدون برگ بوده و ساقه‌های آن بسیار آبدار و شاداب است (Essaidi و همکاران، ۲۰۱۳؛ Choi و همکاران، ۲۰۱۴). گیاه سالیکورنیا غنی از فیبرهای رژیمی و ترکیبات زیست فعال نظیر فیتواسترول‌ها، پلی‌ساکاریدها و ترکیبات فنولی نظیر فلاونوئیدها و اسیدفنولیک هستند و به‌دلیل وجود ترکیبات فلاونوئیدی خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد (Kharrati-Koopae و همکاران، ۲۰۱۶). ترکیبات فنلی ممکن است به‌عنوان خاتمه‌دهنده واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد و یا به‌عنوان شلاتور یون‌های فلزی فعال‌کننده ردوکس که باعث پراکسیداسیون می‌گردند عمل کنند. لذا توجهات اخیر به ترکیبات فنلی به‌ویژه فلاونوئیدها به‌دلیل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالا و نقش مفید آن‌ها در سلامتی افزایش یافته است (Valko و همکاران، ۲۰۰۴). Choi و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی ویژگی‌های فیزیکی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی *Salicornia herbacea* نشان دادند که این گیاه دارای اسیدهای چرب غیراشباع اسیدلینولیک (۴۲/۷۳ درصد) و اسید اولئیک (۱۹/۸۱ درصد) است و روغن گونه مذکور مقادیر قابل ملاحظه‌ای آنتی‌اکسیدان آلفاتوکوفرول دارد که باعث افزایش مقاومت روغن در برابر شرایط محیطی می‌گردد. تحقیقات مختلفی برای بررسی تاثیرهای مشتقات گیاهی مختلف بر فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مختلف ماهی صورت گرفته است. Antache و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی اثر تعدادی فیتوبیوتیک‌ها نظیر رزماری (*Rosmarinus officinalis*)، سنجد تلخ (*Hippophae rhamnoides*) و زنجبیل (*Zingiber officinale*) بر استرس اکسیداتیو ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تحت سیستم پرورشی با بازچرخش آب نشان دادند که استفاده از یک درصد سنجد تلخ بر کیلوگرم غذا منجر به کاهش مالون‌دی‌آلدئید و افزایش آنتی‌اکسیدان کل و گلوکوتایون پراکسیداز در ماهی تیلاپیای نیل گردید. Sönmez و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نوجوان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با اسانس آویشن معمولی (*Thymus vulgaris*)، نعناع وحشی (*Mentha spicata*) و مریم گلی (*Salvia officinalis*) گزارش کردند که استفاده از غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم اسانس مریم گلی و آویشن معمولی منجر به بهبود کارایی رشد، کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید و حداقل تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، گلوکوتایون پراکسیداز، سوپر اکسیداز دیسموتاز، گلوکوتایون ردوکناز و گلوکوتایون ترانسفراز) بافت کبد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شد. Kavitha و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی فعالیت حفاظتی کبد عصاره خارخاسک (*Tribulus terrestris*) در مقابل سمیت استامینوفن در ماهی تیلاپیای موزامبیکا (*Oreochromis mossambicus*) نشان دادند که استفاده از ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره خارخاسک بر کیلوگرم غذا منجر به تنظیم

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط پرورش: این تحقیق در سالن مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار به مدت ۶۰ روز و در آذرماه ۱۳۹۶ انجام گرفت. ماهیان مورد استفاده در این مطالعه، از مرکز تکثیر میگوئی دکتر اژدری واقع در کنارک تامین شدند. پس از ۲ هفته سازگاری، تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی کفال خاکستری با میانگین طولی $6/45 \pm 0/40$ سانتی‌متر و میانگین وزنی $8/42 \pm 0/43$ گرم در ۱۲ مخزن فایبرگلاس با حجم ۶۰ لیتر به صورت تصادفی قرار گرفتند. هوادهی مخزن‌ها به طور مداوم با استفاده از سنگ‌های هواده متصل به پمپ هواده مرکزی انجام شد. مخازن روزانه پیش از غذادهی برای خروج مواد دفعی ۷۰ درصد حجم آب آن سیفون می‌شد. در طول دوره، پارامترهای آب اندازه‌گیری شد. به طور میانگین در کل دوره درجه حرارت آب $28/0 \pm 45/78$ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول $8/01 \pm 0/92$ میلی‌گرم بر لیتر و pH آب $7/9 \pm 0/6$ بود. در طی دوره آزمایش فتوپریود به صورت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بود.

تهیه گیاه سالیکورنیا *Salicornia sp.* و آماده‌سازی عصاره:

گیاه سالیکورنیا از خور تیس چابهار جمع‌آوری و شناسایی شد (Patell, ۲۰۱۶). سپس بعد از خشک شدن آن‌ها در فضای آزاد، آسیاب شد و کاملاً به حالت پودر تبدیل شد ۵۰ گرم از پودر حاصل با ۴۰۰ سی‌سی الکل متانول ۹۶٪ مخلوط و با دستگاه هم‌زن کاملاً به هم زده شد. و با دستگاه سوکسله عصاره‌گیری انجام شد و عصاره‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شد (Harikrishnan و همکاران، ۲۰۱۳).
تیمارها: این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت ۴ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. افزودنی مورد نظر در سطوح ۰ (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره گیاه سالیکورنیا در هر کیلوگرم غذای تجاری شرکت هووراش بوشهر (قطر ۱/۲ میلی‌متر)، حاوی (۳۹٪ پروتئین، ۷٪ چربی، ۸٪ خاکستر و ۵٪ رطوبت اضافه‌شده) ماهیان مورد آزمایش با این جیره‌ها تغذیه شدند (Sönmez و همکاران، ۲۰۱۵). سطوح مختلف مکمل به غذای کنسانتره ابتدا مقدار غذا را برای کل دوره ۶۰ روز برای هر تیمار محاسبه شد و بر حسب نوع تیمارهای آزمایشی سطوح مختلف عصاره افزودنی پس از توزین با ترازوی حساس آزمایشگاهی (۰/۰۰۱ گرم) در ۲۰ سی‌سی آب مقطر حل و به صورت یکسان بر روی غذای تجاری اسپری شد و تیمار شاهد به همین روش بدون عصاره گیاه آماده شد (Choi و همکاران، ۲۰۱۵). پس از ۴۸ ساعت جیره‌های خشک جمع‌آوری و در نایلون‌های مجزا در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مقدار غذای روزانه با توجه به درصد وزن بدن (توده زنده) محاسبه شد و در نوبت صبح و عصر به میزان ۳ درصد وزن بدن در اختیار ماهیان قرار گرفت (Choi و همکاران، ۲۰۱۵).

فعالیت‌های آنزیم‌های آمینوترانسفراز کبد و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. Akrami و همکاران (۲۰۱۵) با افزودن سطوح مختلف پودر پیاز (*Allium cepa*) در جیره غذایی فیل‌ماهی (*Huso huso*) نشان دادند که در تیمار حاوی ۱ درصد پودر پیاز سطح آنزیم‌های AST و LDH کاهش معنی‌دار و فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز افزایش معنی‌داری را نشان داد. لازم به ذکر است در کبد، آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز (ASP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) وجود دارند و حضور ALT و AST در خون نشانه افزایش نفوذپذیری یا نکروزه شدن سلول‌های کبدی است. ALP در شرایط پاتولوژیک در خون رها می‌شود بنابر این میزان این آنزیم‌ها در خون یکی از شاخص‌های عملکرد کبد است (Soochan و همکاران، ۲۰۱۲). اندام کبد دارای عملکرد بیوشیمیایی مختلفی نظیر پردازش مواد غذایی، دفع سموم و تولید اسیدهای صفراوی است. کبد نقش محوری در تغذیه و متابولیسم ویتامین‌ها دارد. ساخت پروتئین‌های حیاتی مثل آلبومین و فاکتورهای انعقادی در کبد صورت می‌گیرد (Hall, ۲۰۱۰). هم‌چنین کبد نقش مهمی در عملکرد سیستم ایمنی دارد (Bhardwaj و همکاران، ۲۰۱۰). یکی از مهم‌ترین اعمال کبد نقش آن در سم‌زدایی مواد آلوده کننده محیطی و داروهای شیمیایی است (Hall, ۲۰۱۰). به‌طور کلی عملکرد بیوشیمیایی مختلفی توسط کبد انجام می‌گیرد که تمام این اعمال توسط آنزیم‌ها صورت می‌گیرند. تغییر در میزان این آنزیم‌ها جهت ارزیابی عملکرد کبد مورد استفاده قرار می‌گیرد. هنگامی که نفوذپذیری غشای سلول‌های کبدی به دلیل آسیب‌های وارده افزایش می‌یابد، آنزیم‌های AST و ALT میزان بیش‌تری در خون رها می‌شوند (Bhardwaj و همکاران، ۲۰۱۰). از جمله آنزیم‌های دیگر کبد، آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) است که بیش‌ترین میزان فعالیت آن در pH قلیایی مشاهده می‌شود این آنزیم به‌میزان زیاد در کبد و کلیه یافت می‌شود و مقدار آن در شرایط پاتولوژیک و در ضایعات کبدی افزایش می‌یابد (Dadras و همکاران، ۲۰۱۶؛ Rosenkranz, ۲۰۰۹). با توجه به این‌که اطلاعات در خصوص کاربرد گیاه سالیکورنیا در ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) و دیگر گونه‌های ماهی در دفاع آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های کبدی صورت نگرفته است و از آن‌جایی که گیاه سالیکورنیا به دلیل ترکیب طبیعی فلاونوئیدی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی است (Kharrati-Koopae و همکاران، ۲۰۱۶) و در ایران با توجه به مشکلات کم‌آبی و خشک‌سالی، به‌خوبی رشد می‌کند (Akhani, ۲۰۰۷). این تحقیق با هدف بررسی تاثیر عصاره الکلی گیاه سالیکورنیا (*Salicornia sp.*) بر فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنتی‌اکسیدانی ماهی کفال خاکستری انجام گرفت.



میلی‌لیتر معرف رنگی (۰/۰۳۹۶ گرم دی‌نیترو فنیل هیدرازین، ۲۰۰ میلی‌لیتر و اسید کلریدریک نرمال) به آن‌ها اضافه شد. محتویات کووت‌ها را مجدداً مخلوط کرده و ۲۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده و ۱۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۴ نرمال به آن اضافه کرده و به‌خوبی مخلوط گردید. بعد از ۵ دقیقه جذب نوری لوله بلانک در طول موج ۵۰۵ نانومتر روی ۰/۲۵ تنظیم شد و جذب نوری کووت تست قرائت گردید. جهت سنجش از منحنی کالیبراسیون استفاده شد. سنجش آسپارات آمینوترانسفراز براساس روش Liu و همکاران (۲۰۱۶) صورت گرفت. به‌استثنای سوبسترا همانند سنجش آلانین آمینوترانسفراز بود. سوبسترای آن شامل ۰/۰۲۹۲ گرم اسید آلفا کتوگلو تاریک، ۱/۷۸ از دی‌ال آلانین، ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر و حجم محلول با بافر فسفات (۷/۴ pH) به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز طبق روش Winterbourn (۱۹۷۵)، با استفاده از کیت ارزیابی این آنزیم براساس دستورالعمل سازنده آن (راندوکس، انگلیس) اندازه‌گیری شد و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک در طول موج ۵۶۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. یک واحد از سوپر اکسید دیسموتاز مقداری است که موجب مهار ۵۰ درصد از واکنش احیاء ۲-۴ یدوفنیل ۳-۴ نیترو فنل ۵- فنیل ترازولیوم تحت شرایط آزمایش می‌شود و مقدار آنزیم در بافت به‌صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. سنجش فعالیت کاتالاز نیز طبق تجزیه آب اکسیژنه با کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه و به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین در عصاره آنزیمی بیان شد در آن بافر فسفات سدیم ۲۰ میلی‌مولار با پی اچ ۷ و ۲۰ میکرو لیتر هیدروژن پراکسید ۳۰ درصد به‌عنوان پذیرنده الکترون مورد استفاده قرار گرفت (Dazy و همکاران، ۲۰۰۸). سنجش فعالیت آنزیم گلو تاتیون پراکسیداز مطابق روش Lawrence و Burk (۱۹۷۶) با استفاده از کیت ارزیابی این آنزیم بر اساس دستورالعمل سازنده آن (راندوکس، انگلیس) اندازه‌گیری شد و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک در طول موج ۴۴۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت و مقدار آنزیم در بافت به‌صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. سنجش مالون دی‌آلدئید توسط روش Baluchnejad mojarad و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت. به سوپرناتانت حاصل تری کلرو استیک اسید ۱ درصد و تیوبار بیتوریک اسید ۰/۶ درصد اضافه شد و سپس در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۰ دقیقه آنکو باسیون شد و پس از سرد شدن در مجاورت یخ، در دور ۱۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و نمونه‌ها با جذب نوری ۵۳۵ نانومتری قرائت شد و نتایج بر حسب واحد مالون دی‌آلدئید بر حسب میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

نمونه برداری کبد در پایان دوره آزمایش: به‌منظور تعیین فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنتی‌اکسیدانی در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)، ۴۸ ساعت قبل از نمونه برداری غذادهی قطع شد تا دستگاه گوارش آن‌ها از مواد غذایی تخلیه گردد (Tripathi و Das، ۱۹۹۱). به‌صورت تصادفی از ۹ قطعه ماهی هر تیمار پس از بی‌هوشی با عصاره گل میخک (۲ گرم بر لیتر)، با استفاده از یک سوزن بلند قطع نخاع شد و سریعاً در مجاورت یخ (به‌منظور به‌حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی) کالبدشکافی آن‌ها صورت گرفت سپس کبد با دقت جدا شد (Chong و همکاران، ۲۰۰۲). بعد بلافاصله در شرایط انجماد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد بافت کبد با نسبت (۱:۱۰ حجم/ وزن) در بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، KCL ۱۰۰ میلی‌مولار و EDTA یک میلی‌مولار با pH: ۷/۴ هموزن شد. نمونه هموزن شده به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سوپر ناتانت برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Canli و Atli، ۲۰۱۰).

تعیین فعالیت آنزیم‌های کبدی: براساس تست آلکالین فسفاتاز، ابتدا دو لوله آزمایش انتخاب کرده و به هر یک ۱ میلی‌لیتر سوپسترای بافری (۱۰۰ میلی‌گرم پارانیتروفنیل فسفات دی‌سدیم، ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲۵ میلی‌لیتر بافر گلیسین ۰/۱ نرمال (pH ۱۰/۶، ۰/۲ کلرید منیزیم، ۷/۵ گرم گلیسین، ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۸۵ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم نرمال) ریخته و در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به یکی از دو لوله، ۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر (لوله بلانک) و به دیگری ۰/۱ میلی‌لیتر سرم (لوله تست) اضافه شد. محتویات لوله‌ها به‌خوبی مخلوط شد و دقیقاً ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس آن‌ها را از بن ماری خارج کرده و ۱ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۰۲ نرمال را به آن‌ها اضافه کرده و به‌خوبی مخلوط شدند. جذب نوری لوله‌های تست (A1) در مقابل بلانک در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ به آن‌ها اضافه و به‌خوبی مخلوط شد و جذب نوری آن‌ها دوباره قرائت گردید (A2) و مقدار A1-A2 از روی منحنی کالیبراسیون به دست آمد (Liu و همکاران، ۲۰۱۶). سنجش آلانین آمینوترانسفراز براساس روش Liu و همکاران (۲۰۱۶) با کمی تغییرات صورت گرفت. ۱ میلی‌لیتر سوپسترا (۰/۰۵۸۴ گرم اسید آلفا گلو تاریک، ۵/۳۲ گرم اسید دی-ال آسپارتیک، ۴۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ نرمال، بافر فسفات، کلروفرم) به دو کووت اضافه و درجه حرارت کووت‌ها به ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. ۰/۲ میلی‌لیتر سرم را به داخل کووت تست و ۲۰ میلی‌لیتر آب را به داخل کووت بلانک ریخته و محتویات کووت را به‌خوبی مخلوط کرده و یک ساعت در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. کووت‌ها را از بن ماری خارج نموده ۱



در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش در جدول ۱ داده شده است. کمترین میزان فعالیت آنزیم مالون دی آلدئید (MDA) در تیمار ۲ مشاهده شد که اختلاف معنی داری را با تیمار شاهد و تیمار ۴ نشان داد ($P < 0.05$). فعالیت آنزیم MDA در تیمارهای ۲ و ۳ اختلاف معنی داری را نشان ندادند ($P > 0.05$). در حالی که بیشترین فعالیت آنزیمهای CAT و GPX در تیمارهای حاوی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم عصاره گیاه سالیکورنیا بر کیلوگرم غذا مشاهده شد و اختلاف معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد ($P < 0.05$). بین کلیه تیمارها از نظر فعالیت آنزیم SOD اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

بحث

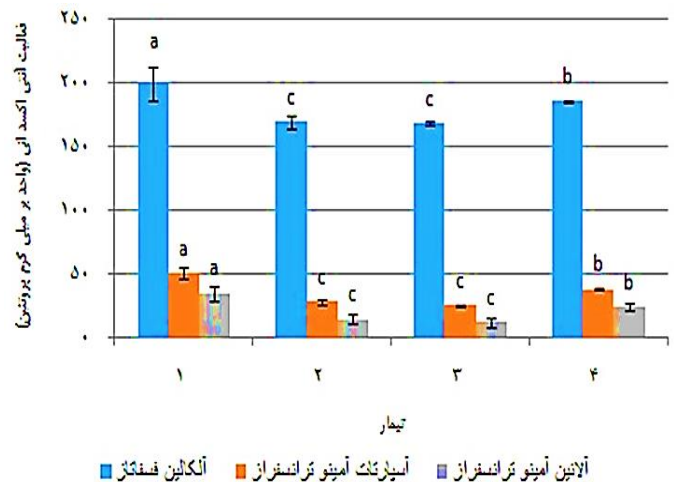
در سالهای اخیر استفاده از گیاهان دارویی به دلیل عوارض کمتر و دارا بودن ترکیبات فعال با خاصیت آنتی اکسیدانی، همواره مورد توجه بوده است. Kato و Osawa (۲۰۰۵) نشان دادند که منابع گیاهی می توانند بافتها را از آسیبهای ناشی از وجود رادیکالهای آزاد حفظ کنند. مطالعه حاضر به بررسی اثر سطوح مختلف عصاره گیاه سالیکورنیا بر فعالیت آنزیمهای کبدی و آنتی اکسیدانی ماهی کفال خاکستری پرداخته است. از آنجایی که مطالعه‌ای در زمینه اثر عصاره گیاه سالیکورنیا بر فعالیت آنزیمهای کبدی و آنتی اکسیدانی ماهی کفال خاکستری و یا دیگرگونه ماهیان برای مقایسه با نتایج این تحقیق مشاهده نشده است. بنابراین نتایج این تحقیق، با نتایج تحقیقات صورت گرفته بر روی استفاده از عصاره گیاهان دارویی مختلف در آبزیان مورد مقایسه قرار گرفت. در مطالعه حاضر فعالیت آنزیمهای آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز و آسپاراتات آمینو ترانسفراز در تیمارهای حاوی سطوح مختلف عصاره الکلی گیاه سالیکورنیا کاهش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد و کمترین میزان فعالیت آنزیمهای کبدی مربوط به تیمارهای حاوی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم عصاره گیاه سالیکورنیا بر کیلوگرم غذا بود. (Vahedi (۲۰۱۵) با تجویز سطوح مختلف ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد عصاره زنجبیل (*Zingiber officinale*) به جیره فیل ماهی (*Huso huso*) نشان داد که مقدار آنزیمهای آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در تیمار ۱/۵ و ۱ درصد عصاره زنجبیل نسبت به گروه شاهد به دست آمد. Akrami و همکاران (۲۰۱۵) با افزودن سطوح مختلف پودر پیاز (*Allium cepa*) در جیره غذایی فیل ماهی (*Huso huso*) نشان دادند که در تیمار حاوی ۱ درصد پودر پیاز سطح آنزیمهای AST و LDH کاهش معنی دار و فعالیت آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز افزایش معنی داری را نشان داد که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی داشتند.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (One Way Analysis Of Variance = ANOVA) و مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح معنی دار ۵٪ استفاده شد. با استفاده از تست کالموگراف اسمیرنوف نرمال بودن داده‌ها و از تست لون برابری واریانسها استفاده شد تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS و پیرایش ۱۹ صورت گرفت و جهت محاسبات آماری از نرم‌افزار Excel و پیرایش ۲۰۱۰ استفاده شد.

نتایج

فعالیت آنزیمهای کبدی: تغییرات میانگین (\pm خطای معیار)

فعالیت آنزیمهای آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز و آسپاراتات آمینو ترانسفراز کبد ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش در شکل ۱ داده شده است. طبق شکل ۱، فعالیت آنزیمهای آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز و آسپاراتات آمینو ترانسفراز در تیمارهای حاوی سطوح مختلف عصاره الکلی گیاه سالیکورنیا کاهش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد ($P < 0.05$). در حالی که تیمارهای ۲ و ۳ اختلاف معنی داری را در فعالیت آنزیمهای اندازه گیری شده با یکدیگر نشان ندادند ($P > 0.05$). کمترین میزان فعالیت آنزیمهای کبدی مربوط به تیمارهای ۲ و ۳ بود.



شکل ۱: میانگین و خطای معیار فعالیت آنزیمهای آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز، آسپاراتات آمینو ترانسفراز کبد ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است. تیمار ۱ تا ۴ به ترتیب حاوی ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم عصاره گیاه سالیکورنیا بر کیلوگرم است.

فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان: تغییرات میانگین (\pm خطای معیار)

فعالیت آنزیمهای سوپراکسیداز دیسموتاز، گلووتاتیون پراکسیداز، مالون دی آلدئید و کاتالاز ماهی کفال خاکستری



جدول ۱: مقایسه میانگین (میانگین \pm خطای معیار) فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (واحد بر میلی‌لیتر)	تیمار			
	۱	۲	۳	۴
سوپر اکسیداز دیسموتاز (SOD)	۱/۱۲ \pm ۰/۱۲ ^{ns}	۱/۴۶ \pm ۰/۲۳	۱/۲۶ \pm ۰/۱۴	۱/۱۸ \pm ۰/۱۹
گلوکاتیون پراکسیداز (GPX)	۶۳/۴۰ \pm ۴/۱۲ ^c	۱۴۱/۶۸ \pm ۱۲/۶۲ ^a	۹۴/۳۰ \pm ۱۳/۸۷ ^{ab}	۸۴/۰۶ \pm ۱۱/۰۸ ^b
مالون دی‌آلدئید (MDA)	۰/۴۷ \pm ۰/۰۴ ^a	۰/۲۷ \pm ۰ ^c	۰/۳۶ \pm ۰/۰۷ ^{bc}	۰/۴۱ \pm ۰/۰۳ ^{ab}
کاتالاز (CAT)	۰/۶۴ \pm ۰/۰۴ ^c	۱/۲۰ \pm ۰/۲۰ ^a	۱/۰۸ \pm ۰/۲۷ ^{ab}	۰/۹۴ \pm ۰/۰۴ ^b

وجود حروف غیر همسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$) تیمار ۱ تا ۴ به ترتیب حاوی ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۵۰۰ میلی‌گرم عصاره گیاه سالیکورنیا بر کیلوگرم است. ns. نشانه عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در شاخص مورد نظر است ($P > 0.05$).

(PhOH) با دادن سرب هیدروژن به رادیکال‌ها از اکسیداسیون لپیدها و دیگر مولکول‌ها جلوگیری می‌کنند. واسطه‌های رادیکال فنوکسی (PhO) نسبتاً پایدار هستند و به‌عنوان خاتمه‌دهنده واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند (Kang و همکاران، ۲۰۱۱؛ Crespy و Williamson، ۲۰۰۴؛ Valko و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های GPX و CAT در تیمارهای تغذیه شده با عصاره سالیکورنیا نشان می‌دهد که احتمالاً وجود ترکیبات فنلی موجود در گیاه باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد گردیده است (Lynn و همکاران، ۲۰۰۶؛ Valavanidis و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به بررسی فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنتی‌اکسیدانی به‌نظر می‌رسد که سطح موثر عصاره گیاه سالیکورنیا در جیره غذایی ماهی کفال خاکستری، سطوح ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا می‌باشد. البته لازم به ذکر است که برای پی بردن به این که این اثر مربوط به چه ترکیب یا ترکیباتی از گیاه است. به مطالعات فارماکولوژیکی و بیوشیمیایی گسترده‌ای در جهت استخراج و خالص‌سازی این ترکیبات، مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری ریاست و پرسنل محترم مرکز تحقیقات شیلات چابهار که امکانات این پژوهش را فراهم آوردند و کارشناسان محترم آزمایشگاه تخصصی پاتوبیولوژی صدف چابهار و شرکت میزان سنجش پاسارگاد تهران تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Agarwal, A. and Sekhon, L., 2010. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Human Fertility. Vol. 13, pp: 217-225.
- Akhani, H., 2007. Diversity, biogeography, and photosynthetic pathways of *Argusia* and *Heliotropium* (Boraginaceae) in South-West Asia with an analysis of phytogeographical units. Botanical Journal of the Linnean Society. Vol. 155, pp: 401-425.

به‌نظر می‌رسد وجود پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها از مواد زیست فعال موجود در گیاه سالیکورنیا و گیاهان دیگر هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته و به‌عنوان مکانیسم حفاظتی در برابر استرس در پیشگیری از عفونت نقش دارند (Kang و همکاران، ۲۰۱۱). سیستم‌های دفاعی آنزیمی نظیر سوپراکسیداز دیسموتاز، گلوکاتیون پراکسیداز، کاتالاز و مالون دی‌آلدئید و غیر آنزیمی مثل ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در مواد غذایی نظیر ویتامین‌ها، پلی‌فنل‌ها و کاروتن‌ها از مهم‌ترین و اصلی‌ترین سیستم‌های تدافعی بدن، جهت تنظیم میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) تحت شرایط استرس می‌باشند (Stahl و Sies، ۱۹۹۵). پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل از فرم‌های فعال اکسیژن هستند که در شرایط نامتعادل اکسیداسیون و احیای درون سلولی می‌توانند آسیب‌های شدیدی به مولکول‌های درشت سلولی نظیر پروتئین‌ها، چربی و DNA وارد نمایند (Bezек و Juránek، ۲۰۰۵). در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسیداز دیسموتاز، گلوکاتیون پراکسیداز، کاتالاز و مالون دی‌آلدئید مورد بررسی قرار گرفت به‌صورتی که بیش‌ترین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز و کم‌ترین فعالیت آنزیم مالون دی‌آلدئید در تیمارهای حاوی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره گیاه سالیکورنیا بر کیلوگرم غذا مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد. بین کلیه تیمارها از نظر فعالیت آنزیم SOD اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. Sönmez و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نوجوان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با اسانس آویشن معمولی (*Thymus vulgaris*)، نعناع وحشی (*Mentha spicata*) و مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) گزارش کردند که استفاده از غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم اسانس مریم‌گلی و آویشن معمولی منجر به بهبود کارایی رشد، کاهش سطح مالون دی‌آلدئید (شاخص پراکسیداسیون لپیدی) شد که با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی داشتند. این به‌نظر می‌رسد که تاثیر عصاره سالیکورنیا در کاهش غلظت MDA می‌تواند به واسطه ترکیبات فنلی به‌ویژه فلاونوئیدها باشد. آنتی‌اکسیدان‌های فنلی

۱۴. **Dazy, M.; Jung, V.; Ferard, J. and Masfarau, J., 2008.** Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: Role of plant antioxidant enzymes and possible implication in site restoration. *Chemosphere*. Vol. 74, pp: 57-63
۱۵. **Essaidi, I.; Brahmi, Z.; Snoussi, A.; Haj Koubaier, H.B.; Casabianca, H.; Abe, N.; El Omri, A.; Chaabouni, M.M. and Bouzouita, N., 2013.** Phytochemical investigation of Tunisian *Salicornia herbacea* L., antioxidant, antimicrobial and cytochrome P450 (CYPs) inhibitory activities of its methanol extract. *Food Control*. Vol. 32, pp: 125-133.
۱۶. **Harikrishnan, R.; Nisha, M.R. and Balasundaram, C., 2003.** Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*. Vol. 221, pp: 41-50.
۱۷. **Hall, J.E., 2010.** Textbook of medical physiology, 12 th ed. New York, Saunders press. pp: 999-1006.
۱۸. **Juránek, I. and Bezek, S., 2005.** Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury? *General Physiology and Biophysics*. Vol. 24, pp: 263-278.
۱۹. **Kang, S.; Kim, D.; Lee, B.H.; Kim, M.R.; Chiang, M. and Hong, J., 2011.** Antioxidant Properties and Cytotoxic Effects of Fractio Glasswort (*Salicornia herbacea*) Seed Extracts on Human Cells. *Food Science and Biotechnology*. Vol. 20, No. 1, pp: 115-122.
۲۰. **Kavitha, P.; Ramesh, R.; Bupesh, G.; Stalin, A. and Subramanian, P., 2011.** Hepatoprotective activity of Tribulus terrestris extract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish (*Oreochromis mossambicus*). In *Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*. Vol. 47, pp: 698-706.
۲۱. **Kharrati-Koopae, H.; Heydarian, Z.; Shekarforoush, S.Sh.; Golmakani, M.T.; kharrati-kopaei, M. and Gorji Makhosous, S., 2016.** The antibacterial activities of six organic solvent extracts of *Salicornia iranica* against *Salmonella typhimurium*. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*. Vol. 8, pp: 25-26.
۲۲. **Lawrence, R.A. and Burk, R.F., 1976.** Glutathione peroxidase activity in selenium deficiency rat liver biochemical and biophysics research communitations. Vol. 71, pp: 952-958.
۲۳. **Liu, F.; Shi, H.; Guo, Q.; Yu, Y.; Wang, A.; Lv, F. and Shen, W., 2016.** Effects of astaxanthin and emodin on the growth, stress resistance and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 51, pp: 125-135.
۲۴. **Lynn, A.; Collins, A.; Fuller, Z.; Hillman, K. and Ractcliff, B., 2006.** Cruciferous vegetables and colo- rectal cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*. Vol. 65, pp: 135-144.
۲۵. **Magnadottir, B., 2006.** Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 20, pp: 137-151.
۳. **Akrami, R.; Gharaeib, A.; Razeghi Mansour, M. and Galeshi, A., 2015.** Effects of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innate immune response and hematobiochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754) juvenile. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 45, pp: 828-834.
۴. **Antache, A.; Crister, V.; Iulia, R.; Grecu, I.R.; Ion, S.P. and Mocanu, M.C., 2013.** The Influence of Rosemary Sea Buckthorn and Ginger on Oxidative Stress at *Oreochromis niloticus* Reared in a Recirculating Aquaculture System. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*. Vol. 70, pp: 110-116.
۵. **Atli, G. and Canli, M., 2010.** Response of antioxidante system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 73, pp: 1884-1889.
۶. **Bhardwaj, S.; Srivastava, M.K.; Kapoor, U. and Srivastava, A., 2010.** 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: morphological, biochemical and histopathological evaluations. *Food Chemistry and Toxicology*. Vol. 48, pp: 1185-1190.
۷. **Baluchnejad mojarad, T.; Roghani, M. and Mafakheri, M., 2010.** Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress. *Neuroscience letter*. Vol. 480, pp: 206-210.
۸. **Byun, D.S.; Kwon, M.N.; Hong, J.H. and Jeong, D.Y., 1994.** Effects of flavonoids and α -tocopherol on the oxidation of n-3 polyunsaturated fatty acids. Antioxidizing effect of catechin and α -tocopherol in rat with chemically induced lipid peroxidation. *Bulletin of Korean Fish Society*. Vol. 27, pp: 166-172.
۹. **Choi, D.; Lim, G.S.; Piao, Y.L.; Choi, O.Y.; Cho, K.A. and Park, C.B., 2014.** Characterization, stability, and antioxidant activity of *Salicornia herbacea* seed oil. *Korean Journal of Chemical Engineering*. Vol. 31, pp: 2221-2228.
۱۰. **Chong, A.S.C.; Hashim, R.M.; Chow-Tang, L. and Ali, A.B., 2002.** Partial characterization and activities of protease from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture*. Vol. 203, pp: 321-331.
۱۱. **Crespy, V. and Williamson, G., 2004.** A Review of the Health Effects of Green Tea Catechins in in vivo Animal Models. *International Research Council on Food Nutrition and Cancer*. Vol. 134, pp: 3431-3440.
۱۲. **Dadras, H.; Hayatbakhsh, M.R.; Shelton, W.L. and Golpour, A., 2016.** Effects of dietary administration of Rose hip and Safflower on growth performance, haematological, biochemical parameters and innate immune response of Beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 59, pp: 109-114.
۱۳. **Das, K.M. and Tripathi, S.D., 1991.** Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Aquaculture*. Vol. 92, pp: 21-32.



۲۶. **Morales, A.E.; Pérez-Jiménez, A.; Hidalgo, M.C.; Abellán, E. and Cardenete, G., 2004.** Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 139, pp: 153-161.
۲۷. **Osawa, T. and Kato, Y., 2005.** Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 1043, pp: 440-451.
۲۸. **Patel, S., 2016.** Salicornia: evaluating the halophytic extremophile as a food and a pharmaceutical candidate. *Biotechnology*. Vol. 6, pp: 2-10.
۲۹. **Rosenkranz, G.K., 2009.** Modeling laboratory data from clinical trials. *Computational Statistics and Data Analysis*. Vol. 53, pp: 812-819.
۳۰. **Sies, H. and Stahl W., 1995.** Vitamins E and C, beta carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 62, pp: 1315-1321.
۳۱. **Sönmez, A.Y.; Bilen, S.; Alak, G.; Hisar, O.; Yamk, T. and Biswas, G., 2015.** Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish Physiology and Biochemistry*. Vol. 41, pp: 165-175.
۳۲. **Soochan, D.; Keough, V.; Wanless, I. and Molinari, M., 2012.** Intra and extra-hepatic cystadenoma of the biliary duct. Review of literature and radiological and pathological characteristics of a very rare case. *BMJ Case Report*. Vol. 4, pp: 2012-2014.
۳۳. **Vahedi, A., 2015.** Investigation of oral administration of ginger extract (*Zingiber officinale*) on growth performance, blood index and metabolic enzymes in *Huso huso*. Thesis of M.S.c Azad University of Azad Shahr. 67 p.
۳۴. **Valavanidis, A.; Valchogianni, T. and Fiotakis, C., 2009.** 8- hydroxy-2- deoxyguanosine 98-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part*. Vol. 27, pp: 120-139.
۳۵. **Valko, M.; Rhodes, C.J.; Monco, J.; Izakovic M. and Mazur, M., 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico- Biological Interaction*. Vol. 160, pp: 1-40.
۳۶. **Young I.S. and Woodside, J., 2001.** Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*. Vol. 54, pp: 176-186.
۳۷. **Winterbourn, C.; Hawkins, R.; Brian, M. and Carrell, R.W., 1975.** Estimation red cell superoxidase dismutase activity, *Journal of Laboratory medicine*. Vol. 85, No. 2, pp: 337-340.
۳۸. **Zarifmanesh, T. and Zorreich Zahra, J., 2012.** Use of Phytobiotics in development of Aquaculture. First National Conference on Sustainable Development Strategies. 7 p.

