تاثیر تجویز خوراکی پودر بذر گیاه خار مریم (*Silybum mariamum*) بر فاکتورهای بیوشیمیایی و سیستم ایمنی خون بچه ماهیان سیم (*Abramis braba orientalis*)

- **ضحا هاشمی‌کاوردی**: گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، صندوق پستی: ١٦١٦
- **اکرم تهرانی‌فرد***: گروه زیست‌شناسی دریا، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، صندوق پستی: ١٦١٦
- **عباسعلی زمینی**: گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، صندوق پستی: ١٦١٦

تاریخ دریافت: دی ١٣٩٤ تاریخ پذیرش: فروردین ١٣٩٥

چکیده

استفاده از گیاهان دارویی به‌عنوان ترکیبات محرک و تقویت‌کننده سیستم ایمنی ماهی‌ها در طی سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین در این پژوهش تاثیر عملکرد پودر بذر گیاه خار مریم (*Silybum mariamum*) بر فاکتورهای بیوشیمیایی و سیستم ایمنی خون بچه ماهی سیم (*Abramis brama orientalis*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در سال ۱۳۹۳، آزمایشی بر روی بچه ماهیان سیم (با وزن اولیه ۱۲-۱۰ گرمی)، به‌مدت ٦٠ روز با به‌کارگیری ۳ مقدار مختلف عصاره خار مریم ۲۰۰، ٤٠٠، ۸۰۰ میلی‌گرم در ٤ تیمار با ۳ تکرار و یک تیمار به‌عنوان گروه شاهد (فاقد جیره محتوی عصاره خارمریم) صورت پذیرفت. برای آزمون فرضیه‌ها از روش تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شد. نتایج نشان داد، عصاره خارمریم، با افزایش غلظت گلبول‌های سفید، هماتوکریت، نوتروفیل و مونوسیت، لیزوزیم و ایمنوگلوبین و هم‌چنین کاهش آلکالین فسفاتاز ، آسپرتات آمینو ترانسفراز ، پلاسما آلانین آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز در گروه‌های تیمار شده در ٤٠٠ و ۸۰۰ میلی گرم نسبت به گروه شاهد، می‌تواند موجب تقویت سیستم ایمنی ماهی سیم گردد ($p<0/05$). هم‌چنین با توجه به برتری تیمار ۸۰۰ میلی‌گرمی، نسبت به سایر تیمارها، استفاده از مقدارمذکور در جیره غذایی آبزیان به‌منظور افزایش ایمنی ماهی سیم توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: *Silybum mariamum*، *Abramis brama orientalis*، فاکتورخونی، سیستم ایمنی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Tehranifard@Liau.ac.ir

مقدمه

نقش مهم سیستم ایمنی در حفظ سلامت آبزیان و تضمین بقا و رشد آن‌ها در طول دوره پرورش، سبب شده تا محققین به استفاده از انواع ترکیبات شیمیایی و طبیعی محرک و تقویت‌کننده سیستم ایمنی تمایل نشان می‌دهند. با توجه به تکامل بیش‌تر ایمنی غیراختصاصی ماهی نسبت به ایمنی اختصاصی و جایگاه ویژه محرک‌های ایمنی در تحریک ایمنی غیراختصاصی، استفاده از محرک‌های ایمنی در آبزیان ارجحیت بیش‌تری نسبت به حیوانات خونگرم دارد به‌همین دلیل اخیراً استفاده از محرک‌های ایمنی در ماهی به‌منظور افزایش قدرت ایمنی، ایجاد مقاومت در مقابل بیماری‌ها و بهبود فاکتورهای، رشد کاربرد زیادی یافته است، از طرفی عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله ایجاد باکتری‌های مقاوم و مقاومت‌های باکتریایی مشکلات زیست محیطی، تخریب فلور آب و روده، گرانی و مشکلات اجرایی تجویز باعث گرایش بیش‌تر به استفاده از محرک‌های ایمنی به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها شده است (Iwama و Nakanishi، ۱۹۹۶). در دهه‌های گذشته مطالعات گسترده‌ای در ارتباط با استفاده از گیاهان دارویی در مقیاس آزمایشگاهی در تقویت سیستم ایمنی جانوران آزمایشگاهی صورت گرفته و نتایج به‌دست آمده از این تحقیقات نیز به‌خوبی موید نقش مثبت بسیاری از گیاهان دارویی در تقویت سیستم ایمنی جانوران می‌باشد (رضایی‌پور و همکاران، ۱۳۸۲). به‌عنوان مثال، جعفریان و همکاران (۱۳۸۱) نشان دادند که استفاده از عصاره گیاه دارویی گل ارونه در جیره غذایی جانوران آزمایشگاهی می‌تواند موجب تقویت سیستم ایمنی سلولی و هومورال گردد. مصرف گیاه دارویی برای درمان و مقابله با عفونت‌های ویروسی (طاهرزاده و همکاران، ۱۳۸۷؛ رضوی و همکاران، ۱۳۸۵)، باکتریایی (Elgayyar و همکاران، ۲۰۰۱)، قارچی (Gvindachari، ۲۰۰۰) و حتی پیشگیری از شیوع انگل‌های تک‌یاخته (منافی‌فر و همکاران، ۱۳۸۵)، یکی دیگر از رویکردهای جدید استفاده از این ترکیبات در فارماکولوژی است.

یکی از گیاه پرارزش دارویی خارمریم یا ماریتیغال است. گیاهی یک تا دو ساله از تیره کاسنی با نام علمی *Silybum mariamum* و نام انگلیسی Milk thistle که از ۲۰۰۰ سال پیش به‌دلیل خواص درمانی خاص مورد توجه انسان بوده است. در میوه‌های خارمریم فلاونوییدهای مختلفی ساخته و ذخیره می‌شود که مقدار آن‌ها متفاوت و به شرایط اقلیمی محل رویش و نوع گیاه بستگی دارد (David و همکاران، ۲۰۰۱). به مجموع این فلاونوییدها سیلی مارین گفته می‌شود. گیاه سیلی مارین خود مجموعه‌ای از مواد شامل silybin، silychristin و silydianin می‌باشد. سیلی مارین فیتوزوم‌های موجود در بذر گیاه خارمریم از طریق اثر بر فعالیت‌های مربوط به هسته سلول و تأثیر بر میکروزوم سلولی کبدی، می‌تواند رادیکال‌های آزاد ناشی از مصرف سموم قارچی را کاهش و فعالیت سلولی جهت سنتز پروتئین را افزایش دهند. این فیتوزوم‌ها علاوه بر تثبیت غشاء با حذف نمودن رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، موجب اعمال این نقش حفاظتی می‌شوند (احمدی و همکاران، ۱۳۸۹). مهم‌ترین کاربرد تایید شده این گیاه استفاده از آن در درمان مسمومیت‌های کبدی و ترمیم سلول‌های آسیب دیده کبدی اظهار کرد. با توجه به گستره آسیب‌های اقتصادی و بهداشتی ناشی از مسمومیت‌ها و بیماری‌های متفاوت در ارتباط با جامعه انسانی وصنعت آبزی‌پروری که در ایران نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، می‌توان این ماده را به‌عنوان کنترل‌کننده این موارد معرفی نمود (احمدی و همکاران، ۱۳۸۹). هدف از این مطالعه و بررسی تاثیر عصاره گیاه خار مریم بر سیستم ایمنی ماهی سیم (*Abramis brama orientalis*) به‌دلیل در حال انقراض بودن این ماهی بوده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در مهرماه ۱۳۹۳، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار که هر تیمار دارای ۳ تکرار بوده و در مدت زمان ۲ ماه به اجرا درآمد. بدین منظور تعداد ۶۰۰ قطعه بچه‌ماهی سیم سالم از نظر ظاهری، از استخر خاکی مرکز شهید انصاری رشت بارگیری شده و به محل اجرای پروژه (سالن پرورش) در همان مرکز انتقال یافت. هم‌چنین ۱۲ عدد ونیرو در ابعاد ۰/۵×۲×۲ مترمکعب مهیا شده و در هر ونیرو ۵۰ عدد ماهی با اوزان ۱۲-۱۰ گرمی معرفی گردید. از ۴ تیمار مذکور، یک تیمار به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شده که انحصاراً خوراک SFK به بچه‌ماهی خورانده شده و ۳ تیمار دیگر با معیارها و دزهای از قبل تعیین شده از پودر بذر گیاه خار مریم (سیلی مارین) با توجه به افزودن خوراک SFK مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه سیلی مارین و خوراک حاوی سیلی مارین: تهیه غذا به‌صورت تازه و به‌صورت هفتگی و با افزودن مکمل سیلی مارین به نسبت ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا با پودر تجاری و تهیه مجدد پلت غذایی انجام گردید (Chen و همکاران، ۲۰۰۳). بدین منظور، پودر خالص سیلی مارین از شرکت زردبند یاسوج تهیه گردید. برای تهیه خوراک حاوی سیلی مارین ۳۰۰ گرم

خوراک مخصوص ماهی سیم بر روی یک سینی گسترانیده شد. میزان ۱ گرم پودر سیلی مارین (غلظت نهایی ۰/۵ درصد) با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مخلوط و توسط اسپری روی خوراک پاشیده شد. این عمل بعد از به‌هم زدن خوراک چندین بار تکرار شد. برای حفظ بهتر سیلی مارین در خوراک در هنگام تغذیه ماهی، میزان ۱٪ محلول ژلاتین به‌همان روش روی خوراک اسپری گردید. سپس به‌مدت ۴ ساعت خوراک در ۴۰درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، تا کاملاً خشک گردد. بعد از خشک شدن خوراک، در کیسه‌های نایلونی مشکی بسته‌بندی شده، لیبل گذاری و تا زمان استفاده در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. خوراک شاهد نیز به‌همین روش ولی با آب فاقد سیلی مارین تیمار گردید.

نمونه‌گیری و آزمایش: پس از شروع آزمایش، به‌طور تصادفی از هر ونیرو ۳ماهی و در مجموع از هر تیمار ۹ ماهی در روزهای ۱۴ و ۲۸ صید و پس از بی‌هوش کردن ماهی با عصاره پودر گل میخک (۱:۵۰۰۰)، از ساقه دمی آن‌ها با استفاده از سرنگ آغشته به EDTA خون‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری فاکتورهای خونی از روش ذیل استفاده گردید. گلبول‌های سفید و قرمز با محلول Lewis و لام نئوبار شمارش شده است. هموگلوبین (Hb) با واحد گرم در دسی‌لیتر با استفاده از محلول درایکلین (سیانومت هموگلوبین) در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد، اندازه‌گیری شده است. هماتوکریت با سانتریفیوژ Nuve در دوره ۱۴۰۰۰ rpm اندازه‌گیری شده است. اندیس گلبولی یعنی حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین گلبولی (MCHC) با استفاده از فرمول‌های استاندارد موجود محاسبه گردید.

تعداد گلبول‌های قرمز/۱۰×هماتوکریت(درصد)=MCV

تعداد گلبول‌های قرمز(میلیون در میلی‌متر مکعب)/ ۱۰×هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)=MCH

هماتوکریت(درصد)/۱۰×هموگلوبین(گرم در دسی لیتر) =MCHC

آنزیم AST، ALT با کیت زیست‌شیمی و آنزیم ALP با کیت پارس آزمون روش فتومتریک با واحد بین‌المللی (u) در یک گرم بافت اندازه‌گیری شده است. برای کالیبره کردن آن از کالیبراتور و کنترل تجاری استفاده شده است. فعالیت لیزوزیم با استفاده از روش Cleton (۲۰۰۱) بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم Micrococcus lysodeikticus اندازه‌گیری شده است (Zandecki و همکاران، ۲۰۰۷). میزان ایمنوگلوبین براساس روش Siwici و Andevson (۱۹۹۳) اندازه‌گیری شده است.

آزمون آماری: به‌منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Kolmogorov-smirnov استفاده شد. درصورت نرمال بودن داده‌ها به‌منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way Anova) و پس از انجام آزمون برابری واریانس‌ها (Test of Homogeneity of Variances) جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. جهت مقایسه ۲ گروه (مقایسه بین مراحل ۱ و ۲ فاکتورهای خون) از آزمون Independent Samples T- Test استفاده شده است.

نتایج

فاکتورهای خونی: نتایج آزمایشات خون شناسی نمونه‌های اخذ شده از تیمارهای مختلف در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز، آنتی‌بادی هپاتیت، متوسط هموگلوبین در سلول قرمز و ائوزینوفیل تحت تاثیر تجویز جیره‌های حاوی پودر خارمریم قرار نگرفت ($p>0/05$). از طرفی گلبول سفید، هماتوکریت، متوسط هموگلوبین، نوتروفیل در گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان داد، به‌طوری‌که تعداد گلبول‌های سفید، هماتوکریت، متوسط هموگلوبین و نوتروفیل در تیمار ۸۰۰ میلی‌گرمی به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود ($p<0/05$).

شاخص‌های ایمنی: تغییرات سطح ایمنوگلوبین در پلاسمای ماهیانی که با مکمل غذایی تغذیه شده‌اند در نمونه‌برداری‌های صورت گرفته در روزهای ۱۴ و ۲۸ پس از شروع آزمایش در ماهی تحت تیمار در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود ($p<0/05$). با توجه به جدول ۲ میزان ایمنوگلوبین و لیزوزیم در تیمار ۸۰۰ و ۴۰۰ میلی گرمی بالاتر از سایر تیمارها بود (شکل۱).

جدول ۱: مقایسه شاخص‌های خونی (میانگین± انحراف معیار) بین تیمارهای مختلف

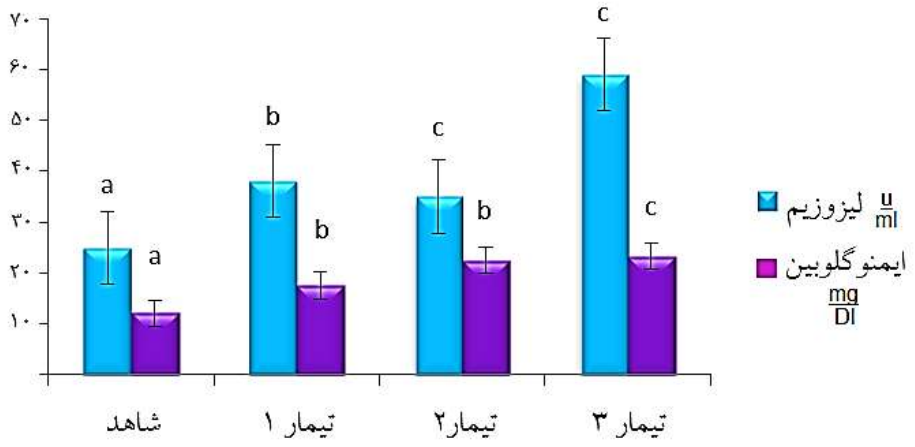
تیمار فاکتور	تیمار شاهد	تیمار ۲ (۲۰۰ میلی‌گرم)	تیمار ۳ (۴۰۰ میلی‌گرم)	تیمار ۴ (۸۰۰ میلی‌گرم)
گلبول سفید ×۱۰^{۳} میلی‌مترمکعب	۴۷۰۰ ±۵۷۷/۳۵^{a}	۷۱۰۰ ±۷۰۷۱ ^{b}	۸۰۰۰ ±۱۴۱/۲ ^{c}	۷۵۰۰ ±۴۵/۹ ^{b}
گلبول قرمز ×۱۰۶ میلی‌مترمکعب	۸۹۸۰۰۰±۲۱۲۱/۳۲^{a}	۸۷۵۰۰۰ ±۳۵۳۵ ^{a}	۹۵۵۰۰۰ ±۳۵۳۵ ^{a}	۹۹۸۰۰۰ ±۳۵۳۵ ^{a}
هموگلوبین خون (گرم / دسی‌لیتر)	۵/۲ ±۰/۱۱^{a}	۵ ±۰/۱۴^{a}	۵/۵ ±۰/۱۳^{a}	۶ ±۰/۱۴^{a}
هماتوکریت (٪)	۲۵ ±۰/۵^{b}	۲۳ ±۰/۶^{a}	۲۷ ±۰/۷^{c}	۲۸ ±۰/۷^{d}
آنتی بادی هپاتیت IU / لیتر	۲۷۸ ±۰/۲۳^{a}	۲۶۷ ±۸/۱۱^{a}	۲۸۲ ±۱۳/۷۳^{a}	۲۸۰ ±۱۳/۶۲^{a}
متوسط هموگلوبین fL	۵۸/۳ ±۱/۱۵^{a}	۵۷/۱ ±۱/۵۵^{a}	۵۷ ±۲/۷۴^{a}	۶۰/۱ ±۳/۹۴^{b}
متوسط‌هموگلوبین درسلول قرمز (گرم/دسی‌لیتر)	۲۳/۳ ±۰/۵۲^{a}	۲۳/۲۳ ±۱/۱۳^{a}	۲۳/۴۰ ±۰/۸^{a}	۲۳/۵ ±۰/۳۰^{a}
نوتروفیل (٪)	۲۲ ±۰/۷^{a}	۲۸ ±۰/۷^{c}	۲۶/۵ ±۰/۷^{b}	۲۹/۵ ±۰/۷^{d}
لنفوسیت (٪)	۷۳/۳۳ ±۰/۳۳^{c}	۶۹/۳۳ ±۰/۶۳^{b}	۶۹/۲۳ ±۰/۵۱ ^{b}	۶۶ ±۰/۸۵^{a}
مونوسیت (٪)	۴ ±۰/۶۷^{b}	۳ ±۰/۶۶^{a}	۵ ±۰/۶۷ ^{c}	۴ ±۰/۶۷^{b}
ائوزینوفیل (٪)	۱ ±۰^{a}	۱/۵ ±۰/۳۳^{a}	۱/۵ ±۰/۳۳^{a}	۱ ±۰^{a}

*حروف غیرهم‌نام کوچک در ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

جدول۲ : مقایسه میزان شاخص‌های ایمنی در شاهد و تیمارهای مختلف

شاخص	شاهد	تیمار ۱ (۲۰۰ میلی‌گرم)	تیمار ۲ (۴۰۰ میلی‌گرم)	تیمار ۳ (۸۰۰ میلی‌گرم)
ایمنوگلوبین (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱۲/۰۵±۰/۴۴^{a}	۱۷/۵±۰/۲۷^{b}	۲۲/۵±۰/۲۸^{c}	۲۳/۳±۰/۳۹^{c}
لیزوزیم (واحد/میلی‌لیتر)	۲۵±۰/۴۴^{a}	۳۸±۰/۲۷^{b}	۳۵±۰/۲۸^{b}	۵۹±۰/۳۹^{c}

*حروف غیرهم‌نام کوچک در ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.



شکل ۱: نمودار مقایسه میزان ایمنوگلوبین و لیزوزیم در شاهد و تیمارهای مختلف

پارامترهای آنزیمی: با توجه به جدول ۳، اگرچه میزان آنزیم ALP در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه شاهد روند کاهشی داشته، ولی تفاوت معنی‌داری در گروه شاهد و سایر تیمارها مشاهده نشده است (p>۰/۰۵). از طرفی با افزایش عصاره خارمریم در جیره، میزان آنزیم AST در تیمارها، نیزکاهش یافته است به‌طوری‌که تیمار ۸۰۰ میلی‌گرمی از بیش‌ترین و تیمار شاهد از کم‌ترین مقدار از این آنزیم برخوردار بود. مقدار ALT و LDH، در شاهد و تیمارهای آزمایشی روند متفاوتی داشته است ولی در کل مقدار آن در تیمارهای تحت جیره عصاره خار مریم کم‌تر از گروه شاهد مشاهده شد.

جدول۳: مقایسه میزان پارامترهای آنزیمی در شاهد و تیمارهای مختلف.

شاخص	شاهد	تیمار ۱ (۲۰۰ میلی‌گرم)	تیمار ۲ (۴۰۰ میلی‌گرم)	تیمار ۳ (۸۰۰ میلی‌گرم)
آلکالین فسفاتاز (ALP) (واحد/لیتر)	۶۵/۳۵±۰/۴۴^{a}	۵۹±۰/۲۷^{a}	۶۰/۲۳±۰/۲۸^{a}	۵۹/۴۲±۰/۳۹^{a}
آسپرتات آمینو ترانسفراز (AST) (واحد/لیتر)	۸۹/۰۲±۰/۱۸^{d}	۷۳±۰/۲۷^{c}	۶۵/۲۳±۰/۲۸^{b}	۵۹/۱۱±۰/۳۹^{a}
پلاسما آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) (واحد/لیتر)	۴±۰/۱۸^{d}	۲±۰/۲۷^{a}	۳±۰/۲۸^{b}	۳±۰/۳۹^{b}
لاکتات دهیدروژناز (LDH) (گرم/مول)	۱۲۱۴±۳۱/۱۸^{d}	۸۴۲±۲۱/۲۷^{c}	۷۲۲±۱۸/۲۰^{a}	۸۱۲±۲۲/۴^{b}

*حروف غیرهم‌نام کوچک در ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

بحث

گیاه خار مریم به‌عنوان بهترین تقویت‌کننده سیستم ایمنی شناخته شده است. در تحقیق حاضر، تجویز عصاره گیاه خار مریم باعث تحریک برخی خصوصیات ایمنی غیراختصاصی ماهی سیم گردید. در خصوص سایر شاخص‌های خون‌شناسی نیز نتایج موافق و مخالف تحقیق حاضر به وفور یافت می‌شود. در مورد تاثیر عصاره‌های گیاهی بر تعداد گلبول‌های سفیدخون به‌عنوان نتایج موافق به تحقیق Harikrishnan و همکاران (۲۰۰۳) در مورد تاثیر عصاره گیاه خار مریم *Silybum marianum* در ماهی کپورمعمولی و مطالعه Harikrishnan (۲۰۰۹) در ماهی طلایی (*Carassius auratus*) به عنوان نتایج مخالف با تحقیق حاضر به تحقیق رضایی و همکاران (۱۳۹۲) در مورد تاثیر گیاه مورخوش بر ماهی پنگوسی، Watanuki و همکاران (۲۰۰۶) در ماهی کپور و Tatina و همکاران (۲۰۱۰) درتاس‌ماهی اشاره نمود. در تحقیقی که تاثیر عصاره گیاه مورخوش بر سیستم ایمنی ماهی پنگوسی مورد بررسی قرار گرفت، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف از نظر فاکتورهای رشد، ضریب رشد ویژه، کارایی غذا و شاخص رشد روزانه در طی دوره ۴۵ روزه مشاهده نشد. در حالی‌که بیش‌ترین میزان هماتوکریت و لیزوزیم در تیمار سوم (غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم عصاره) مشاهده شد که مشابه تحقیق حاضر بود. ولی در تحقیق فوق الذکر فاکتورهای پروتئین کل، آلبومین و درصد نوتروفیل در تیمار شاهد بیش‌ترین مقدار را داشت (رضایی و همکاران،۱۳۹۲) که با تحقیق حاضر مغایرت داشت.

در این تحقیق، میزان گلبول‌های سفید خون ماهیان در پایان آزمایش، در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری را نشان داده است (p<۰/۰۵). در صورتی‌که میزان متغیر فوق در گروه شاهد به‌طور قابل ملاحظه‌ای کم‌تر از سایر گروه‌های آزمایشی بود.

هم‌چنین اختلاف معنی‌داری در مقدار گلبول‌های قرمز، هموگلوبین خون، در تیمار شاهد و سایر گروه‌ها مشاهده نشده است (p>۰/۰۵) از سوی دیگر، درصد هماتوکریت و متوسط هموگلوبین خون ماهیان بین تیمارها و شاهد در پایان آزمایش معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۵)، به‌طوری‌که غلظت هماتوکریت و متوسط هموگلوبین، در تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود.

تعداد نوتروفیل، در تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها به‌خصوص گروه شاهد بود (p<۰/۰۵). مونوسیت خون ماهیان بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵). از طرفی میزان مونوسیت خون ماهیان در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری را نشان داده است

(p<۰/۰۵). در صورتی‌که غلظت متغیر مذکور، در گروه ۲۰۰ میلی‌گرم کم‌تر از سایر گروه‌ها بود.

علیشاهی و همکاران (۱۳۹۰) به مطالعه در زمینه تاثیر عصاره خارمریم بر پاسخ‌های ایمنی ماهی کپور پرداختند و بیان نمودند، عصاره مذکور، سبب افزایش غلظت گلبول‌های سفید و هماتوکریت خون می‌شود. طبق گزارشات Siluraj و همکاران (۲۰۰۵)، تجویز گلوکان LPS باکتری به ماهی کپورمعمولی سبب افزایش گلبول‌های سفید خون می‌شود. هم‌چنین Herikrishnan و همکاران (۲۰۰۳) نیز بیان نمودند، افزودن مکمل گیاهی به خوراک ماهی طلائی سبب افزایش غلظت گلبول‌های سفید خون می‌شود. طبق مطالعات انجام توسط مورکی و همکاران (۱۳۹۱)، اضافه نمودن پودر دارچین در جیره غذایی ماهی گرین ترور (*Andinocara rivulatus*) در شمارش کلی گلبول سفید، درصد لنفوسیت و کاهش درصد نوتروفیل اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان داده است.

در این تحقیق، تجویز عصاره سیلی مارین تاثیر معنی‌داری از لحاظ فاکتورهای گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و ائوزینوفیل، بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد نشان نداده، از دلایل این امر می‌توان به نبودن زمان لازم برای مقدار کافی غلظت‌های فاکتورهای خون تحریک شده تحت تاثیر سیلی مارین، اشاره نمود (توکلی و اخلاقی، ۱۳۸۸). ولی مقدار غلظت‌های مذکور بیش‌تر از گروه شاهد مشاهده شد، با توجه به مطلب فوق، عصاره خار مریم تاثیر مفیدی بر افزایش گلبول قرمز و هموگلوبین و ائوزینوفیل داشته است.

از طرفی تجویز این عصاره اختلاف معنی‌داری را از لحاظ فاکتور گلبول‌های سفید،هماتوکریت و متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز بین گروه شاهد و تیمارهای آزمایشی ایجاد نموده است. در واقع، عصاره خار مریم می‌تواند گلبول‌های سفید را فعال کند و با فعال نمودن لنفوسیت‌ها در نهایت باعث فعال شدن ماکروفاژها شود.

Falah Hosseini و همکاران (۲۰۰۴) گزارش نمودند، مصرف خوراک سیلی مارین ممکن است از طریق کاهش سنتز کلسترول در سلول کبدی و افزایش سرعت فرآیند تغییر و تبدیل کلسترول سبب کاهش سطح این فاکتور بیوشیمیایی در خون و صفرا گردد. سلول‌های پارانشیم بافت کبد مسئول سنتز پروتئین‌های پلاسما هستند که شامل فاکتورهای خونی نظیر گلبول‌های سفید و گلوبولین‌ها می‌باشند. بنابراین سیلی مارین با تحریک پروتئین‌سازی، می‌تواند روند ترمیم و نوسازی بافت‌های آسیب دیده، هم‌چون بافت کبد را تسریع نماید (Soto، ۲۰۰۴؛ Sonnenbichler و همکاران، ۱۹۸۴). هر گونه تغییری در فاکتورهای ایمنی خون، به‌عنوان یک شاخص بالینی در پایش سلامت سیستم ایمنی بدن جانوران مورد استفاده قرار گیرد (Jon، ۲۰۰۷).

وجود ترکیبات مختلف فنلی، ترپنوئیدی و غیره در اسانس گیاهان دارویی خار مریم می‌توانند تا حدودی توجیه کننده افزایش فاکتورهای سیستم ایمنی ماهی سیم در تحقیق حاضر باشد. البته نتیجه نهایی نیاز به بررسی دقیق‌تر ترکیبات موثر و مکانیسم اثر آن بر فیزیولوژی بدن ماهی دارد.

افزایش پروتئین به‌ویژه گلوبولین سرم شاخص مناسبی برای وضعیت دفاع ایمنی ماهی می‌باشد (Siwicki، ۱۹۹۴). در تحقیق حاضر، میزان ایمنوگلوبین خون ماهیان بین تیمارها و شاهد تفاوت معنی‌داری را داشته است (p<۰/۰۵). هم‌چنین میزان ایمنوگلوبین، در شاهد و تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم نسبت به تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم از میزان کم‌تری برخوردار بوده، ولی بین تیمارهای ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). سطح لیزوزیم نیز، اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف آزمایشی نشان داده - تجزیه و تحلیل حاصل از آزمون واریانس یک‌طرفه نشان داده- سطح لیزوزیم در تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها بود. مقدار لیزوزیم در ماهی‌ها نشان‌دهنده میزان فعالیت سیستم ایمنی ذاتی در این جانداران می‌باشد. از آن‌جا که سیستم ایمنی ذاتی در مقابله با پاتوژن‌ها در ماهی‌ها اولین خط دفاعی در این جانداران می‌باشد پس از اهمیت بیش‌تری در ماهی‌ها در مقایسه با سایر مهره‌داران برخوردار است. افزایش میزان لیزوزیم‌ها در ماهی‌ها می‌تواند سبب افزایش مقاومت این جانداران در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و منفی گردد. لیزوزیم‌ها نقش opsonic دارند و سبب فعال شدن کمپلمان و فاگوسیتوز می‌شوند. لیزوزیم‌ها در بافت لنف، موکوس، پلاسما و یا سایر مایعات بدن ماهی‌ها وجود دارد (Saurabh و همکاران، ۲۰۰۸).

گزارشاتی از افزایش ایمنوگلوبین و لیزوزیم سرم به‌دنبال استفاده از محرک‌های ایمنی گیاهی وجود دارد (Vasudeva Rao و همکاران، ۲۰۰۴). عالیشاهی و همکاران (۱۳۹۰)، گزارش کردند، میزان لیزوزیم و ایمنوگلوبین خون ماهی کپور بین تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داده است. نجف‌پورمقدم و همکاران (۱۳۹۲)، در بررسی‌های خود در ماهی استرلیاد به این نتیجه رسیدند که فعالیت لیزوزیم سرم، میزان پروتئین کل، میزان ایمونوگلوبین سرم، آلبومین، تحت تاثیر تجویز عصاره سرخارگل، به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از شاهد بوده است (p>۰/۰۵)، هم‌چنین بیان شده، تیمار ۲ گرمی برتری بیش‌تری نسبت به تیمار ۱ و ۱/۵ گرمی داشته است.

در مطالعات دیگری نیز از گیاهان در تغذیه ماهی استفاده شده است، از جمله Pratheepa و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی تاثیر عصاره برگ گیاه (*Aegle marmelos*) بر روی ماهی کپورمعمولی، سوداگر و حاجی‌بیگلو (۱۳۸۹) در بررسی تاثیر عصاره ۱۱ گیاه دارویی مختلف روی پاسخ ایمنی غیراختصاصی و مقاومت نسبت به باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپور معمولی، Austin (۲۰۰۹) در بررسی تاثیر پودر گیاه زنجبیل بر سیستم ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان، Rao و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی تاثیر دانه گیاه *Achyranthes aspera* بر روی ماهی *Labeo rohita*، Chen و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی تاثیر ۴ گیاه چینی (*Rheum officinale, Andrographis paniculata, Isatis indigotica, Lonicera japonica*) در کپور معمولی نشان دادند که در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره گیاهان مذکور میزان لیزوزیم سرم در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافته است. Kumar (۲۰۰۶) اثر دانه‌های زیره سیاه *Nigella sativa* بر پاسخ ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین ۳۴ گرمی بررسی کردند که میزان پروتئین کل سرم و سطح ایمنوگلوبولین کل در گروه‌های مورد آزمایش به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه شاهد بود. ولی‌پور و همکاران (۱۳۹۲) گزارش نمودند، عصاره الکی بره موم زنبور عسل تاثیر مثبتی در میزان لیزوزیم و ایمنوگلوبین ماهی کپور معمولی داشته است.

ایمنوگلبولین‌ها یا آنتی بادی‌ها دسته‌ای از گلیکوپروتئین‌ها می‌باشند که در سرم و مایعات بافتی تمام مهره‌داران یافت می‌شوند. آنتی‌بادی‌ها توسط پلاسموسیت‌ها تولید می‌شوند و پلاسموسیت‌ها نیز از لنفوسیت‌های B مشتق می‌شوند (Stites، ۱۹۹۱). ایمنوگلبولین‌ها نقش مهمی در مقابله با بیماری‌های عفونی باکتریایی ایفا می‌کنند. لذا کاهش سطح فعالیت آن‌ها می‌توان منجر به تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها گردد.

عصاره سیلی مارین با تحریک پروتئین‌سازی و فعال نمودن گلبول‌های سفید، باعث انتشار لیزوزیم و ایمنوگلوبین در بافت‌های مختلف و گردش خون می‌شود در کنار این ترشحات موکوسی، آبشش‌ها، بافت‌های کلیه، طحال و دستگاه گوارش و سرم خون ماهیان یافت می‌شود و قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد شده و باعث افزایش دستگاه ایمنی ماهی سیم می‌شود (سلطانی، ۱۳۸۷).

البته برخی از گزارشات نیز علی‌رغم ویژگی‌های تحریک ایمنی در برخی فرآورده‌های گیاهی، عدم تاثیر معنی‌دار این عصاره‌ها بر میزان لیزوزیم و گلوبولین سرم را گزارش نموده‌اند.

در پژوهش حاضر، سطح آلکالین فسفاتاز تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمارهای آزمایشی نداشت ($p>0/05$). از طرفی دیگر، سطح ALP در مرحله نهایی به‌طور قابل ملاحظه‌ای کم‌تر از مرحله اول آزمایش داشته و این اختلاف معنی‌دار بود ($p<0/05$). سطح آسپارتات آمینو ترانسفراز، در تیمارهای مرحله پایانی اختلاف معنی‌داری را نشان داده است و سطح AST در تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم، کم‌تر از سایر تیمارها مشاهده شد.

میزان پلاسما آلانین آمینو ترانسفراز نیز اختلاف معنی‌داری را در تیمارهای مرحله نهایی نشان داده است ($p<0/05$). میزان ALT در تیمار ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم کم‌تر از سایر گروه‌ها بوده و سطح متغیر مذکور در شاهد، بالاتر از سایر گروه‌ها مشاهده شده است. میزان لاکتات دهیدروژناز اختلاف معنی‌داری را بین مرحله اول و نهایی نشان نداده ولی در مرحله نهایی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد. سطح LDH در تیمار ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرمی کم‌تر از سایر گروه‌ها بود ($p<0/05$).

مدنی و همکاران (۱۳۸۵)، اذعان داشتند سیلی مارین موجب حفاظت سلول‌های کبدی در برابر اثرات اکسیدانی تیواستامید می‌شود. احتمالاً این اثر به‌واسطه وجود ترکیبات فلاونوئیدها است. رادیکال‌های آزاد ناشی از متابولیسم تیواستامید همانند سایر رادیکال‌های آزاد از راه‌های مختلف پراکسیداسیون لیپیدها، آنزیم‌های سرم خون، واکنش‌های RNA و پروتئین‌های غشایی موجب آسیب سلول می‌شوند.

Pyo و همکاران (۲۰۰۴) گزارش نمودند، این ترکیبات هم‌چنین به‌واسطه خاصیت آنتی اکسیدانی قادر هستند رادیکال‌های آزاد موجود در محیط را خنثی کرده و از اثرات مخرب آن‌ها جلوگیری به‌عمل آورند.

بنایی و همکاران (۱۳۸۹)، بیان نمودند سیلی مارین با تثبیت ساختار غشای سلولی سطح فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینو ترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدرژناز تنظیم می‌کند.

Ramadan و همکاران (۲۰۰۲) گزارش نمودند، آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدرژناز توسط سلول‌های پوششی مجرای کیسه صفرا تولید می‌شود و در اختلالات کبدی و انسداد مجرای صفرا، سطح آن‌ها به‌طور ناگهانی در پلاسما افزایش می‌یابد. در نتیجه استفاده از این مشتق گیاهی به‌علت داشتن خصوصیان آنتی اکسیدانی و نقش آن در حذف رادیکال آزاد و هم‌چنین حفظ خصوصیت نفوذپذیری و تراوایی

غشای سلولی موجب تعدیل سطح فعالیت آنزیمی کبد ALP، AST و ALT در جانوران مورد آزمایش می‌شود.

سیلی مارین سبب کاهش سطوح اسیدهای چرب اشباع کبد ناشی از مصرف سم آفلاتوکسین می‌شود. باعث کاهش آسپرتات آمینو ترانسفراز AST، پلاسما آلانین آمینو ترانسفراز ALT، کلسترول، تری گلیسرید، کلسیم، فسفر و لاکتات دهیدروژناز LDH، اسیداوریک و آلکالین فسفاتاز ۱۳ در سرم خون بیماران کبدی می‌شود. در واقع عصاره خارمریم، مخلوطی از سیلی بین، سیلی کریستین و سیلی دیانین است. از لحاظ دارویی، سیلی مارین و سیلی بین جز ترکیبات محافظ سلولی به‌ویژه سلول‌های کبدی محسوب می‌شود (احمدی و همکاران، ۱۳۸۸). جذب‌کننده‌های طبیعی مانند سیلی مارین فیتوزوم‌های موجود در بذر گیاه خارمریم مانع از مسمومیت کبدی، کم‌خونی، چربی خون و عفونت‌های ویروسی می‌شود.

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین استدلال کرد که ترکیبات موجود در کمپلکس سیلی مارین به‌ویژه ترکیبات آنتی اکسیدانی، می‌توانند با از بین بردن رادیکال‌های آزاد و هم‌چنین تقویت سیستم ایمنی از اثرات سوئی که بر سیستم ایمنی ماهی سیم پرورشی وارد می‌شود، پیشگیری نماید. در واقع، آنتی اکسیدان‌ها از غشای سلول‌های فاگوسیتوز کننده در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌نمایند (Ditzman، ۲۰۰۲).

بنابراین عصاره خارمریم، با افزایش غلظت گلبول‌های سفید، هماتوکریت، نوتروفیل و مونوسیت، لیزوزیم و ایمنوگلوبین و هم‌چنین کاهش AST،ALP، LDH و ALT در گروه‌های تیمار شده در ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم نسبت به گروه شاهد، می‌تواند موجب تقویت سیستم ایمنی گردد.

نتایج مطالعه حاضر موید این است که عصاره خار مریم تاثیر مثبتی در سیستم ایمنی ماهی سیم داشته و مهم‌ترین کاربرد تایید شده این گیاه را می‌توان به استفاده از آن در درمان مسمومیت‌های کبدی و ترمیم سلول‌های آسیب دیده کبدی اظهار کرد. هم‌چنین با توجه به گستره آسیب‌های اقتصادی و بهداشتی ناشی از مسمومیت‌ها و بیماری‌های متفاوت در ارتباط با جامعه انسانی وصنعت آبزی‌پروری که در ایران نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، می‌توان این ماده را به‌عنوان کنترل‌کننده این موارد معرفی نمود.

منابع

۱. **احمدی، ک.؛ وثوقی، ع.؛ میرواقفی، ع.؛ عطایی‌مهر، ب. و بنایی، م.، ۱۳۸۹.** تاثیر عصاره خوراکی خارمریم بر برخی فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله بیولوژی دریا. سال ۲، شماره ۷، صفحات ۱۹ تا ۲۶.

۲. **بنایی، م.؛ میرواقفی، ع.؛ رفیعی، غ.ر. و سورداگومیل، آ.، ۱۳۸۹.** تاثیر تجویز خوراکی سیلی مارین بر روی فاکتورهای بیوشیمیایی خون قزل‌آلای رنگین‌کمان. نشریه شیلات و مجله منابع طبیعی ایران. دوره ۶۶، شماره ۴، صفحات ۲۷۱ تا ۲۸۶.

۳. **مورکی، ن.؛ روزی، ی.؛ س.ج، ذریه‌زهرا. و ش، صافی.، ۱۳۹۱.** بررسی اثر کاربرد پودر دارچین بعنوان مکمل رشد در جیره غذایی ماهی گرین ترور (*Andinocara rivulatu*) بر شاخص‌های هماتولوژی. اولین کنفرانس ملی راهکارهای دستیابی به توسعه پایدار. تهران، وزارت کشور، صفحات ۱ تا ۸.

۴. **نجف‌پورمقدم، م.؛ سلاطی، پ.؛ کیوان‌شکوه، س.؛ یاوری، و. و پاشایی‌زانوسی، ح.، ۱۳۹۳.** تاثیر عصاره خوراکی گیاه دارویی سرخارگل بر برخی فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی ماهی استرلیاد. هشتمین همایش دامپزشکان علوم بالینی ایران. دانشگاه شیراز .

۵. **رضایی‌پور، ر.؛ کمالی‌نژاد. م.؛ کاظمی‌فروز، ف. و فدایی، ش.، ۱۳۸۲.** بررسی اثرات چهار گیاه دارویی بر سیستم ایمنی سلولی. مجله علوم پزشکی. سال ۱. شماره ۲، صفحات ۷۳ تا ۷۸.

۶. **رضایی، م.ه.؛ سوری‌نژاد، ا.؛ سلطانیان، س. و یوسف‌زادی، م.، ۱۳۹۲.** تاثیرعصاره گیاه مورخوش درجیره غذایی برشاخص‌های رشد، خون‌شناسی و ایمنی‌شناسی گربه ماهی. مجله بوم شناسی آبزیان. سال ۳، شماره ۸، صفحات ۱ تا ۱۹.

۷. **مدنی، ح.؛ عسگری، ص.؛ نادری، غ. و طالب‌الحسینی، م.، ۱۳۸۵.** اثر حفاظتی کبدی عصاره پلی فنلی خارمریم *Silybum marianum* و همیشه بهار *Callendula officinalis* در موش صحرایی. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۱۹، شماره ۲، صفحات ۱۵۷ تا ۱۶۳.

۸. **مناف‌فر، ر.؛ ملکی، ر.؛ آتشبار، ب. و آق، ن.، ۱۳۸۵.** استفاده از عصاره دانه گیاه *Azadirachta indica* علیه مژکداران تک سلولی مهاجم در محیط پرورش متراکم جلبک تک سلولی *Dunaliella tertiolecta*. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. شماره ۷۱، صفحات ۸۸ تا ۹۲.

۹. **Ahmad, A.; Pillai, K.K.; Najmi, A.K. and Pal, S.N., ۲۰۰۲.** Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. J. Ethnopharmacology. Vol. ۷۹, pp: ۳۵-۴۱.

۱۰. **Alishahi, M.; Ranjbar, M.M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R.; Mesbah, M. and Razi jalali, M., ۲۰۱۰** .

Effects of dietary Aloe Vera on specific and nonspecific immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). J. Vet. Res. Vol. ۴, pp: ۸۵-۹۱.

۱۱. David, J.; C, M.; Jaree, P.; James, H.L.; Somkiat, K.; Kim, D.T. and Alexandra, A., ۲۰۰۱. Immunostimulation of striped snakehead Channa striata against epizootic ulcerative syndrome .Aquaculture. Vol. ۱۹۵, pp: ۱-۱۵.

۱۲. Dietzmann, J.; Thiel, U.; Ansorge, S.; Neumann, K.H. and Tager, M., ۲۰۰۲. Thiolinducing and immunoregulatory effects of flavonoids in peripheral blood mononuclear cells from patients with end-stage diabetic nephropathy. Free Radic. Biol. Med. Vol. ۳۳, pp: ۱۳۴۷-۱۳۵۴.

۱۳. Chen, X.; Wu, Z.; Yin, J. and Li, L., ۲۰۰۳. Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus gibelio*. J. Fish Sci China. Vol. ۱۰, pp: ۳۶-۴۰.

۱۴. Elgayyar, M.; Draughon, F.A.; Golden, D.A. and Mount, J.R., ۲۰۰۱. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J. Food Prot. Vol. ۶۴, pp: ۱۰۱۹ -۱۰۲۴.

۱۵. Falah Hosseini, H.; Hemati, A.R. and Alavian, S.M., ۲۰۰۴. A Review of Herbal Medicine: *Silymarin marianum*. *Journal of Medicinal Plants*. Vol. ۳, No. ۱۱, pp: ۱۴-۲۴. (*Persian language*).

۱۶. Fanouraki, E.; Divanach, P. and Pavlidis, M., ۲۰۰۷. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture. Vol. ۲۶۵, pp: ۲۹۴-۳۰۴.

۱۷. Gvindachari, T.R.; Suresh, G.; Gopalakrishnan, G.; Masilamani, S. and Banumathi, B., ۲۰۰۰. Ninomiya, Antifungal activity of some tetranortriterpenoids. Fitoterapia. Vol. ۷۱, pp: ۳۱۷-۳۲۰.

۱۸. Harikrishnan, R.; Nisha, M.R. and Balasundaram, C., ۲۰۰۳. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. Vol. ۲۲۱, pp: ۴۱-۵۰.

۱۹. Harikrishnan, R.; Balasundaram, C. and Heo, M.S., ۲۰۰۹. Herbal supplementation diets effects on hematology and innate immunity in goldfish. Fish and Shellfish Immunology. Vol. ۲۸, pp: ۲۱۱-۲۲۵.

۲۰. John, P.J., ۲۰۰۷. Alteration of Certain Blood Parameters of Freshwater Teleost *Mystus vittatus* after Chronic Exposure to Metasystox and Sevin. Fish Physiology Biochemistry. Vol. ۳۳, pp: ۱۵-۲۰.

۲۱. Kumar jha, A.; Pal, A.K.; Sahu, N.P.; Kumar, S. and Mukherjee, S.C., ۲۰۰۷. Haemato-immunological responses to dietary Yeast RNA∞-۳ fatty acid and Carotene in Catl catla Juvenils. Fish Shell fish Immunol. Vol. ۲۳, pp: ۹۱۷-۹۱۸.

۲۲. Iwama, G. and Nakanishi, T., ۱۹۹۶. The fish immune system. Academic Press, London. Chapter ۳, innate Immunity in fish. pp: ۷۳-۱۱۴.

۲۳. Misra, C.K.; Kuamr, D.B.; Mukherjee, S.C. and Pattnaik, P., ۲۰۰۶. Effect of long term administration of dietary â-glucan on immunity, growth and survival of Labeo rohito fingerlings. Aquaculture. Vol. ۲۵۵, pp: ۸۲-۹۴.

۲۴. Pyo, Y.H.; Lee, T.C.; Logendra, L. and Rosen, R.T., ۲۰۰۴. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (Beta vulgaris subspecies cycla) extracts. Food Chemistry. Vol. ۸۵, pp: ۱۹-۲۶.

۲۵. Ramadan, L.A.; Roushy, H.M.; Abu Senna, G.; Amin, N.E. and El-deshw, O.A., ۲۰۰۲. Radioprotective effect of silymarin against radation inuced hepatotoxicity. *Pharmacological Research.* Vol. ۴۵, No. ۶, pp: ۴۴۷-۴۵۴.

۲۶. Rao, Y.Y.; Das, B.K.; Iyotymayee, P. and Chakrabarti, R., ۲۰۰۶. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. ۲۰, pp: ۲۶۵-۲۷۳.

۲۷. Rehulka, J.; Minark, B.; Adamec, V. and Rehulka, E., ۲۰۰۵. Investigation of physiological and pathological levels of total plasma protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult. Res. Vol. ۳۶, pp: ۲۲-۳۲.

۲۸. Saurabh, S. and Sahoo, P.K., ۲۰۰۸. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research. Vol. ۳۹, pp: ۲۲۳-۲۳۹.

۲۹. Selvaraj, V.; Sampath. K. and Sekar. V., ۲۰۰۵. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (Cyprinus carpio) infected with Aeromonas hydrophilia. Fish Shellfish Immunol. Vol. ۱۹, pp: ۲۹۳-۳۰۶.

۳۰. Siwicki, A.K.; Anderson, D.P. and Rumsey, G.L., ۱۹۹۴. Dietary intake of Immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology Immunopathology. Vol. ۴۱, pp: ۱۲۵-۱۳۹.

۳۱. Sonnenbichler, J.; Goldberg, M.; Hane, L.; Vogl, S. and Zetl, L., ۱۹۸۴. Stimulatory effect of silibinin on DNA synthesis in partially hepatectomized rat livers: Non-response Hepatoma an Other Malign Cell Lines. *Biochem. Pharmacol.* Vol. ۳۵, pp: ۵۳۸-۵۴۱.

۳۲. Soto, C.; Mena, R.; Luna, J.; Cerbón, M.; Larrieta, E.; Vital, P.; Uría, E.; Sánchez, M.; Recoba, R.; Barrón, H.; Favari, L. and Lara, A., ۲۰۰۴. *Silymarin*

induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. *Life Sciences*. Vol. ۷۵, pp: ۲۱۶۷-۲۱۸۰.

۳۳. **Stites, D.P., ۱۹۹۱.** Basic and clinical immunology. Lange Medical Book. USA. Biomed. Pharmacother, chapter. Vol. ۵۷, pp: ۱۴۵-۱۵۵.

۳۴. **Tatina, M.; Bahmani, M.; Soltani, M.; Abtahi, B. and Gharibkhani, M., ۲۰۱۰.** Effects of different levels of dietary Vitamins C and E on some of hematological and biochemical parameters of sterlet (*Acipenser ruthenus*). J. of Fisheries and Aquatic Science. Vol. ۵, pp: ۱-۱۱.

۳۵. **Vasudeva Rao, Y.; Romesh, M.S. And Chakrabarti, R., ۲۰۰۴**. Potentiation of antibody production in Indian major carp *Labeo rohita*, *rohu*, by *Achyranthes aspera* as an herbal feed ingredient. Aquaculture. Vol. ۲۳۸, pp: ۶۷-۷۳.

۳۶. **Watanuki, H.; Ota, K.; Malina, A.C.; Tassakka, A.R. and Kato, T., ۲۰۰۶**. Immunostimulant effects of dietary Spirulina platensis on carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture. Vol. ۲۵۸, pp: ۱۵۷-۱۶۳.

۳۷. **Zandecki, M. and Spurious, A., ۲۰۰۷**. Counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. International Journal of Laboratory Hematology. Vol. ۲۹, No. ۱, pp: ۲۱-۴۱.