

اثرات تجویز خوراکی عصاره گل ختمی (*Althaea officinalis*) بر سلول‌های خونی و برخی آنزیم‌های کبدی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

فهیمة فلاح پور^{۱،*}، مهدی بنایی^{۲*}، نرگس جواد زاده^۳

۱- گروه شیلات، پردیس علوم و تحقیقات خوزستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران کد پستی: ۶۱۳۴۹-۳۷۳۳۳

۲- گروه شیلات، دانشکده محیط‌زیست و منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء (ص) بهبهان، ایران. کد پستی: ۶۳۶۱۶-۴۷۱۸۹

۳- گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران. کد پستی: ۶۱۳۴۹-۳۷۳۳۳

تاریخ پذیرش: ۳ بهمن ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳ شهریور ۱۳۹۵

چکیده

با توجه به ضرورت جایگزین نمودن داروهای شیمیایی با داروهای با منشأ طبیعی، استفاده از گیاهان دارویی در صنعت آبرزی پروری مورد توجه قرار گرفته است. اما با توجه به ناشناخته بودن اثرات زیستی داروهای گیاهی بر آبزیان، انجام آزمایش‌های ارزیابی پیش‌بالینی بر گونه‌های مختلف آبزیان ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، این مطالعه با هدف ارزیابی اثر پیش‌بالینی عصاره گل ختمی (*Althaea officinalis*) بر سلول‌های خونی و برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی کبد ماهی کپور انجام پذیرفت. ۱۵۰ عدد ماهی کپور ($37/65 \pm 4/40$ گرم) با جیره غذایی حاوی ۰/۰ (کنترل)، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد عصاره گل ختمی به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. در روز ۳۰ و ۶۰ آزمایش، سلول‌ها و شاخص‌های خونی و همچنین آنزیم‌های کبدی اندازه‌گیری گردید. اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، مقدار هموگلوبین، MCV، MCH و MCHC، تعداد نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها در طی ۶۰ روز تغذیه ماهی‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره گل ختمی مشاهده نگردید ($P > 0/05$). تجویز ۰/۵ و ۱ درصد عصاره گل ختمی به ترتیب موجب افزایش معنی‌دار لنفوسیت‌ها و کاهش معنی‌داری در منوسیت‌ها در روز ۳۰ و ۶۰ در مقایسه با گروه کنترل آزمایش شد ($P < 0/05$). اگرچه تجویز ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد عصاره گل ختمی تأثیر منفی بر سطح آنزیم‌های کبدی نداشت؛ اما افزایش معنی‌دار سطح آنزیم ALT، AST، ALP و LDH کبدی در ماهی‌هایی تحت تیمار ۱ درصد عصاره، ممکن است نشان‌دهنده ایجاد سمیت سلولی باشد. لذا، بر اساس نتایج این بررسی، سلامت دارویی عصاره گل ختمی (در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد) برای ماهی کپور در مرحله پیش‌بالینی مورد تأیید است.

کلمات کلیدی: ماهی کپور معمولی، گل ختمی، سلول‌های خونی، آنزیم‌های کبدی.

مقدمه

بی‌تردید یکی از ارکان مهم در کنترل، پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های آبزیان، استفاده از گیاهان دارویی است. در دهه‌های اخیر علم فارماکولوژی و دارو درمانی در دامپزشکی به‌ویژه در آبزیان، دستخوش تحولات شگرفی شده و بسیاری از بیماری‌های آبزیان که زمانی کشنده بودند اکنون با استفاده از داروهای جدید به‌راحتی قابل‌پیشگیری و درمان است. در دهه‌های اخیر تلاش شده تا با به‌کارگیری روش‌های فارماکولوژیک و سم‌شناسی مختلف، منابع دارویی مؤثرتر و کم‌عارضه‌تر کشف و به بازار معرفی گردد. استفاده از منابع طبیعی از جمله گیاهان دارویی، با توجه به پیشینه آنها در طب سنتی، یکی از راهکارهای جدید در زمینه تولید و توسعه داروهای جدید با عوارض جانبی کم‌تر است (Banaee, 2010; Asadi *et al.*, 2012).

تاریخچه استفاده از گیاهان دارویی در صنعت آبی‌پروری به چند دهه‌ی پیش باز می‌گردد. با این حال، ارزیابی پیش‌بالینی ترکیبات گیاهی و تأثیر مشتقات گیاهی بر سلامت آبزیان کم‌تر مورد توجه قرار گرفته و اغلب محققین، صرفاً به ارزیابی کلینیکی داروهای گیاهی و تأثیر آنها در درمان و پیشگیری بیماری‌های پرداخته‌اند (Yin *et al.*, 2006; Divyagnaneswari *et al.*, 2007; Ardó *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2009). لذا در برخی موارد تجویز گیاهان دارویی از کارایی لازم در کنترل و درمان بیماری‌های آبزیان برخوردار نبوده است. زیرا بر اساس قواعد علم فارماکولوژی، بایستی پیش از شروع آزمون‌های بالینی، بایستی داروی جدید از نظر ایمنی-زایی و سمیت مورد ارزیابی قرار گیرد. در مرحله پیش

بالینی غالباً بسته به کاربرد دارو، سمیت حاد، تحت حاد، مزمن، اثر بر سلول‌های خونی، فاکتورهای بیوشیمیایی، و دیگر جنبه‌های زیستی از قبیل اثر بر هماوری و توان تولیدمثلی، جهش‌زایی و دیگر اثرات سوء احتمالی بر گونه هدف یا گونه مشابه از نظر زیستی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. آزمایش‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی در ارزیابی پیش‌بالینی داروهای جدید از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. با انجام در مطالعات بیوشیمیایی، ما می‌توانیم تأثیرات دارویی بر اندام هدف، به‌ویژه در زمانی که مشاهده‌ی تغییرات در بافت‌ها مشکل است، به اطلاعات نسبتاً کاملی از وضعیت فیزیولوژیک سلول‌ها و بافت‌ها به‌ویژه بافت کبد، به‌عنوان بافت هدف، دست‌یابیم. این اطلاعات می‌تواند در ارزیابی تأثیر دارویی و سم‌شناسی دارویی به‌منظور تعیین غلظت غیر سمی دارو مفید باشد (Banaee *et al.*, 2011). شمارش گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط گلبولی (MCV)، غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) و تغییرات غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC)، شمارش گلبول‌های سفید و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، اطلاعات ارزشمندی از وضعیت سلامت ماهی‌ها در اختیار ما قرار می‌دهد (Ahmadi *et al.*, 2012).

گل ختمی (*Althaea officinalis*) یکی از شناخته‌شده‌ترین گیاه دارویی در طب سنتی است که به دلیل داشتن موسیلاژ، پلی‌ساکاریدهای مختلف، آنتی‌اکسیدان‌ها، فلاونوئیدها، ترپن و تروپونوئیدهای مختلف، استرول‌های گیاهی، اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، اسیدهای آمینه و نیز ترکیبات فنولیک و فرار (Elmastas *et al.*, 2004; Wynn and Fougère, 2007; Sadighara *et al.*, 2012; Tešević *et al.*,

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های ماهیان گرمابی پرورشی در ایران به‌ویژه در استان خوزستان است و در اغلب مزارع پرورشی این منطقه یافت می‌شود. از این‌رو پرورش دهندگان در صورت شیوع بیماری در بین این ماهیان می‌بایست سالانه هزینه قابل توجهی جهت کنترل و درمان بیماری‌های این ماهی صرف کنند. لذا بهره‌گیری از گیاهان دارویی قابل دسترس ممکن است بتواند تا حد زیادی از هزینه‌های درمانی بکاهد. از سویی دیگر نگهداری ماهی کپور معمولی و سازگار نمودن آن با شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با دیگر گونه‌های پرورشی و وحشی موجود در استان خوزستان، بسیار ساده‌تر و راحت‌تر است.

بنابراین، به‌منظور دستیابی به اطلاعات اولیه درباره اثرات احتمالی عصاره گل ختمی بر برخی از جنبه‌های فیزیولوژیک ماهی کپور معمولی، اثرات پیش‌بالینی استفاده از نسبت‌های مختلف عصاره گل ختمی در جیره غذایی بر سلول‌های خونی و برخی آنزیم‌های کبدی ماهی کپور معمولی در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفته تا بدین ترتیب احتمال هرگونه تأثیر سوء ناشی تجویز عصاره گل ختمی بر ماهی‌ها مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

۱۵۰ عدد ماهی کپور معمولی (با میانگین وزن $37/65 \pm 4/40$ گرم و میانگین طول $14/15 \pm 0/8$ سانتی‌متر) از یک مزرعه‌ی خصوصی واقع در شهرستان شوش، استان خوزستان خریداری و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده‌ی منابع طبیعی دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبياء (ص) انتقال داده شد. پس از انتقال،

(2012) دارای ویژگی‌های ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی (Sartoratto et al., 2004; Burt et al., 2005; Astani et al., 2010; Bilia et al., 2014; Kubiça et al., 2014; Abbaszadeh et al., 2014) و نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی (Jun et al., 2014; Ramos et al., 2014; Puri et al., 2014) است. اگرچه مکانیسم عمل ترکیبات فیتوشیمیایی در حذف پاتوژن‌ها ممکن است متفاوت باشد، اما در اغلب موارد ترکیبات موجود در اسانس و عصاره‌های گیاهی بر ساختار دیواره سلولی باکتری‌ها تأثیر می‌گذارند. ویژگی آب‌گریزی و چربی‌دوستی ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در اسانس‌ها زمینه نفوذ آنها در لایه فسفولیپیدی غشای سلولی را فراهم می‌سازد و این امر می‌تواند بر تراوایی غشای سلولی و نیز فعالیت‌های فیزیولوژیکی غشای سلولی اثر گذارد، نفوذ در غشای اندامک‌های درون‌سلولی نظیر میتوکندری و ایجاد اختلال در عملکرد آنها و برهم زدن همستازی سلولی، زمینه مرگ سلولی را مهیا سازند. ویژگی‌های سمی مونوترپنیدها نیز می‌تواند با اثر بر عملکرد فیزیولوژیکی غشای سلولی سبب مرگ سلول‌های باکتریایی شود (محمودی و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین بسیاری از ترکیبات فیتوشیمیایی قادرند با ایجاد اختلال در عملکرد آنزیم‌های متصل به غشای سلولی و ایجاد وقفه در فرایند سنتز بسیاری از ترکیبات پلی‌ساکاریدی دیواره سلولی از رشد و تکثیر سلول‌های باکتریایی پیشگیری نمایند (Hammer et al., 2004).

از این‌رو، با توجه به ترکیبات موجود در عصاره گل ختمی این احتمال وجود دارد که بتوانیم از عصاره گل ختمی به‌عنوان یک داروی گیاهی در درمان و پیشگیری از بیماری‌های شایع در آبزیان استفاده کنیم.

۱۲ ماهی به طور تصادفی در ۱۲ مخزن فایبر گلاس (۲۰۰ لیتری) مجهز به هواده با تعویض روزانه ۴۰ درصدی آب توزیع گردید. پیش از شروع آزمایش، ماهی‌ها به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاهی ($24 \pm 2^\circ\text{C}$ دمای آب، دوره‌ی نوری ۱۶ L/۸ D، اکسیژن $1 \pm 6 \text{ mg/L}$ ، $\text{pH}: 7/6 \pm 0/2$) سازگار گردیدند. در طی دوره‌ی سازگاری ماهی‌ها با جیره‌ی تجاری کپور (تهیه شده از شرکت بیضا ۲۱ شیراز) به صورت دو بار در روز و معادل ۲٪ وزن بدن تغذیه شدند.

عصاره گیری از گیاه گل ختمی (*Achillea officinalis* L.)

جهت تهیه عصاره، ۱۰۰ گرم از پودر گل ختمی وزن گردید و با ۳۰۰ سی سی الکل اتیلیک و ۳۰۰ سی سی آب مقطر (به نسبت ۱ به ۱) مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت بر روی دستگاه شیکر قرار داده شد. سپس، عصاره هیدرو الکلی به وسیله کاغذ صافی، صاف گردید. سپس با قرار دادن عصاره هیدرو الکلی در انکوباتور با دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی گراد، عصاره تغلیظ و در نهایت عصاره خشک تهیه گردید (Nafisi Bahabadi et al., 2014).

آزمایش نهایی

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تیمار آزمایشی و ۱ گروه کنترل و هر گروه با سه تکرار شامل ماهی‌های تحت تیمار غذای تجاری غنی شده با عصاره هیدرو الکلی گل ختمی در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد به ازای هر کیلو گرم غذای تجاری (۱۲ ماهی به طور تصادفی در ۱۲ مخزن فایبر گلاس (۲۰۰ لیتری) مجهز به هواده با تعویض روزانه ۴۰ درصدی

آب) انجام گرفت. ماهی‌ها روزانه ۲ بار و معادل ۲٪ وزنی با جیره‌های غذایی فوق تغذیه شدند. پس از گذشت ۳۰ و ۶۰ روز از آغاز آزمایش، ۹ ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی صید و پس از بی‌هوش نمودن آنها با محلول پودر گل میخک (۱:۵۰۰)، از ساقه‌ی دمی آنها با استفاده از سرنگ‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقاد هیپارین خون‌گیری صورت گرفت. پس از آسان کشی ماهی‌ها، آنها کالبدشکافی و بافت کبد جداسازی و با سرم فیزیولوژی شستشو گردید. نمونه‌ها با استفاده از هموژنایز دستی همراه با مخلوطی از بافر فسفات (PBS, pH: ۷/۲) و محلول تریتون X-100 (۰/۱٪) با دمای ۴ درجه سانتی گراد و به نسبت ۱ به ۱۰ به مدت ۱ دقیقه هموژن گردید. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، مایع سطحی با سمپلر جمع‌آوری و تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کبدی در دمای ۲۵- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های خونی

شمارش سلول‌های قرمز (RBC) و سفید (WBC) خون به روش هموسیتمتری و با استفاده از لام ثوبار و پیت ملانژور قرمز و محلول کریستال و یوله انجام گرفت. برای تهیه محلول رنگ‌آمیزی، از ۱ میلی‌لیتر سیرات سدیم ۲ درصد، ۲ میلی‌لیتر محلول و یوله دوژانسن ۱ درصد در محلول رینگر، ۱ میلی‌لیتر برلیانت کرزیل بلو ۰/۱ درصد در محلول رینگر، ۳ قطر فرمالین خنثی استفاده شد. میانگین تعداد گلبول‌های قرمز شمارش شده در ضریب ۱۰۰۰۰ و میانگین تعداد گلبول‌های سفید شمارش شده در ضریب ۵۰۰ ضرب و تعداد گلبول‌ها محاسبه گردید. مقدار هماتوکریت

(Hct) و به روش میکروهماتوکریت و با استفاده از لوله موین میکروهماتوکریت و سانتیفریوژ ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه اندازه گیری شد. غلظت هموگلوبین (Hb) نیز به روش سیانومت هموگلوبین و با استفاده از محلول درابکین تهیه شده از شرکت زیست شیمی و با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis (مدل ۲۱۰۰ یونیکو آمریکا) در طول موج ۵۴۶ نانومتر سنجش گردید (Vázquez and Guerrero, 2007).

شاخص های مهم سلول های قرمز خون نظیر حجم متوسط گلبولی (MCV)، غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) و تغییرات غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) نیز مطابق با فرمول های ذیل تعیین گردید (Vázquez and Guerrero, 2007).

$$MCV = \frac{Hct}{RBC (10^6)} \times 10;$$

$$MCH = \frac{Hb}{RBC (10^6)} \times 10;$$

$$MCHC = \frac{Hb}{Hct} \times 100.$$

در شمارش افتراقی گلبول های سفید نیز، گسترش خونی تهیه و پس از تثبیت با الکل اتیلیک با گیمسا رنگ آمیزی گردید (Vázquez and Guerrero, 2007). به منظور کاهش احتمال خطای آزمایش در حین شمارش گلبول های سفید و قرمز و نیز مطالعه ی شاخص های گلبول ها قرمز خونی، اندازه گیری شاخص های خونی در طی ۳ مرتبه انجام شد.

فاکتورهای بیوشیمیایی

سطح پروتئین تام پلاسما بر اساس واکنش بایوره و در طول موج ۵۴۰ نانومتر، اندازه گیری گردید (Johnson et al., 1999). سطح فعالیت آنزیم های آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز

پلاسما بر اساس مقدار مصرف NADPH و تبدیل آن به NAD^+ در طول موج ۳۴۰ نانومتر، لاکتات دهیدروژناز پلاسما بر اساس تبدیل پیروات به لاکتات در طول موج ۳۴۰ نانومتر، آلکالین فسفاتاز بر اساس تبدیل نیتروفنیل فسفات به نیتروفنول و فسفات و در طول موج ۴۰۵ نانومتر تعیین و بر اساس میزان جذب نوری OD و فرمول ارائه شده در دستورالعمل کیت ها محاسبه گردید (Moss and Henderson, 1999). اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی با استفاده از کیت های تهیه شده از شرکت پارس آزمون و با دستگاه اسپکتروفتومتری UV/Vis (مدل ۲۱۰۰ یونیکو آمریکا) صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آمار

نرمال بودن داده ها نیز بر اساس آزمون Kolmogorov-Smirnov Normality Test با استفاده از نرم افزار SPSS 22 انجام شد. به منظور بررسی اثر غلظت عصاره و دوره زمانی تجویز، تجزیه تحلیل داده ها به روش آنالیز واریانس دو طرفه (two way ANOVA) انجام گرفت. مقایسه میانگین ها نیز بر اساس آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ ($\alpha = 0.05$) صورت گرفت.

نتایج

اختلاف معنی داری در تعداد گلبول های قرمز (RBC)، هموگلوبین (Hb)، حجم متوسط گلبولی (MCV) و غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) در طی ۶۰ روز تغذیه ماهی ها با غلظت های مختلف عصاره گل ختمی در مقایسه با ماهی های گروه کنترل مشاهده نگردید ($P > 0.05$).

جدول ۱: تغییرات شاخص‌های گلبول‌های قرمز خون ماهی‌های کپور تحت تأثیر نسبت‌های مختلف عصاره گل ختمی

شاخص‌های گلبول‌های قرمز	نسبت‌های مختلف عصاره گل ختمی	روز ۳۰	روز ۶۰
گلبول قرمز ($\times 10^6$ سلول)	کنترل	$1/74 \pm 0/64^a$	$1/50 \pm 0/38^a$
	۰/۲۵ درصد	$1/43 \pm 0/50^a$	$1/60 \pm 0/37^a$
	۰/۵ درصد	$1/28 \pm 0/39^a$	$1/32 \pm 0/39^a$
	۱ درصد	$1/25 \pm 0/55^a$	$1/42 \pm 0/59^a$
هماتوکریت (%)	کنترل	$33/23 \pm 8/44^{abc}$	$35/69 \pm 6/61^{bc}$
	۰/۲۵ درصد	$27/73 \pm 4/72^a$	$32/29 \pm 3/58^{abc}$
	۰/۵ درصد	$29/09 \pm 6/39^{ab}$	$38/48 \pm 5/03^c$
	۱ درصد	$32/18 \pm 1/60^{abc}$	$33/62 \pm 2/78^{abc}$
هموگلوبین (g/dl)	کنترل	$7/53 \pm 1/61^a$	$6/64 \pm 2/09^a$
	۰/۲۵ درصد	$6/96 \pm 1/89^a$	$8/00 \pm 2/69^a$
	۰/۵ درصد	$7/74 \pm 1/77^a$	$6/55 \pm 1/57^a$
	۱ درصد	$7/05 \pm 1/32^a$	$6/88 \pm 1/52^a$
میانگین هموگلوبین سلولی (MCH) (پیکو گرم)	کنترل	$5/11 \pm 2/78^a$	$4/63 \pm 1/48^a$
	۰/۲۵ درصد	$5/34 \pm 1/97^a$	$5/27 \pm 2/15^a$
	۰/۵ درصد	$6/56 \pm 2/47^a$	$5/41 \pm 2/20^a$
	۱ درصد	$6/53 \pm 2/57^a$	$5/80 \pm 3/04^a$
میانگین حجم سلولی (MCV) (فمتولیت)	کنترل	$2/17 \pm 1/04^a$	$2/57 \pm 0/91^a$
	۰/۲۵ درصد	$2/26 \pm 1/17^a$	$2/19 \pm 0/80^a$
	۰/۵ درصد	$2/43 \pm 0/78^a$	$3/09 \pm 0/79^a$
	۱ درصد	$3/03 \pm 1/30^a$	$2/89 \pm 0/79^a$
میانگین غلظت هموگلوبین سلول (MCHC) (%)	کنترل	$23/30 \pm 4/59^{ab}$	$18/59 \pm 4/45^{ab}$
	۰/۲۵ درصد	$25/91 \pm 8/37^{ab}$	$25/42 \pm 10/09^{ab}$
	۰/۵ درصد	$28/02 \pm 9/73^b$	$17/40 \pm 4/84^a$
	۱ درصد	$22/03 \pm 4/63^{ab}$	$20/78 \pm 5/69^{ab}$

داده‌های ارائه شده در این جدول شامل (انحراف از معیار-میانگین) است. اختلاف بین میانگین گروه‌های مختلف آزمایشی با حروف الفبا مشخص شده است.

آزمایش در مقایسه با ماهیان گروه کنترل در روز ۳۰ تغییر معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$)؛ اما تغییرات آن به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) کم‌تر از مقدار هماتوکریت در ماهیان گروه کنترل در روز ۶۰ بود. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در شاخص غلظت متوسط

تغذیه ماهی‌ها با جیره واجد عصاره گل ختمی نیز تأثیر معنی‌دار ($P < 0/05$) بر تعداد گلبول‌های سفید (WBC) نسبت به گروه کنترل در دوره زمانی آزمایش نداشت. اگرچه مقدار هماتوکریت خون ماهیان تحت تأثیر غلظت ۰/۲۵ درصدی عصاره ختمی در روز ۳۰

هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) ماهی‌ها در روز ۳۰ نسبت‌های مختلف عصاره گل ختمی تغذیه شدند در ۶۰ و وجود ندارد. جدول (۲) ارائه شده است.

نتایج شمارش افتراقی گلبول‌های سفید در ماهی‌های گروه کنترل و ماهی‌هایی که با جیره حاوی

جدول ۲: تغییرات شاخص‌های گلبول‌های سفید خون ماهی‌های کپور تحت تأثیر نسبت‌های مختلف عصاره گل ختمی

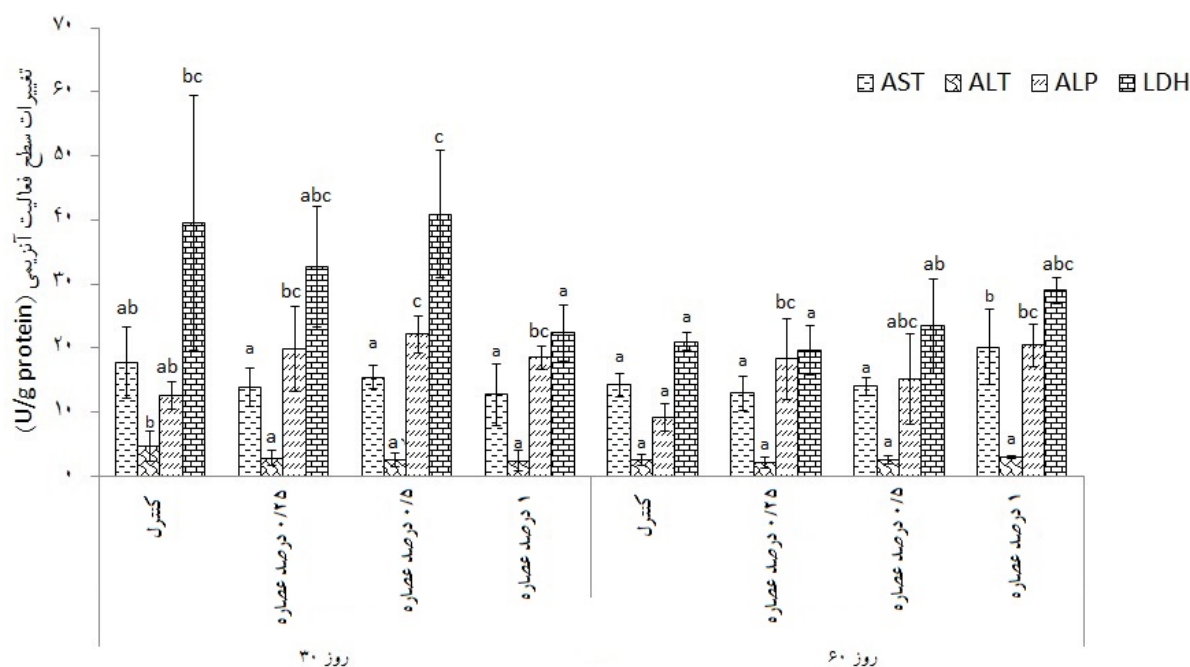
شاخص‌های گلبول‌های سفید	نسبت‌های مختلف عصاره گل ختمی	روز ۳۰	روز ۶۰
گلبول سفید	کنترل	۱۱/۱۳±۳/۱۶ ^{ab}	۱۰/۶۱±۲/۴۷ ^{ab}
(۱۰۰۰۰× سلول)	۰/۲۵ درصد	۱۰/۵۱±۶/۰۷ ^{ab}	۱۴/۱۸±۴/۵۸ ^b
	۰/۵ درصد	۷/۷۳±۲/۶۷ ^a	۱۴/۸۴±۴/۵۴ ^b
	۱ درصد	۱۲/۳۸±۴/۹۸ ^b	۱۲/۸۵±۲/۵۹ ^b
لنفوسیت (%)	کنترل	۶۶/۰۷±۱/۰۸ ^a	۶۶/۲۴±۱/۰۷ ^a
	۰/۲۵ درصد	۶۷/۶۱±۱/۰۸ ^{ab}	۶۹/۰۲±۱/۰۷ ^{abc}
	۰/۵ درصد	۷۱/۹۰±۱/۰۵ ^{bc}	۷۱/۹۰±۱/۰۵ ^{bc}
	۱ درصد	۷۲/۸۱±۱/۰۸ ^c	۷۳/۵۷±۱/۰۷ ^c
نوتروفیل (%)	کنترل	۱۹/۳۰±۱/۲۳ ^a	۲۰/۰۵±۱/۲۳ ^a
	۰/۲۵ درصد	۱۶/۴۴±۱/۲۸ ^a	۱۷/۴۲±۱/۲۸ ^a
	۰/۵ درصد	۱۷/۷۹±۱/۲۲ ^a	۱۷/۲۹±۱/۲۰ ^a
	۱ درصد	۱۶/۷۶±۱/۱۸ ^a	۱۶/۸۵±۱/۱۶ ^a
مونوسیت (%)	کنترل	۱۱/۴۸±۱/۴۵ ^c	۱۰/۸۸±۱/۴۲ ^{bc}
	۰/۲۵ درصد	۱۳/۴۳±۱/۳۲ ^c	۱۱/۶۴±۱/۲۹ ^c
	۰/۵ درصد	۸/۱۳±۱/۲۷ ^a	۹/۰۷±۱/۲۰ ^{ab}
	۱ درصد	۸/۲۵±۱/۴۸ ^{ab}	۸/۲۵±۱/۴۱ ^{ab}
بازوفیل (%)	کنترل	۱/۱۳±۱/۴۵ ^a	۱/۰۸±۱/۲۶ ^a
	۰/۲۵ درصد	۱/۰۷±۱/۲۴ ^a	۱/۰۷±۱/۲۴ ^a
	۰/۵ درصد	۱/۰۸±۱/۲۶ ^a	۱/۰۸±۱/۲۶ ^a
	۱ درصد	۰/۱۱±۰/۴۷ ^a	۰/۱۱±۰/۴۷ ^a
ائوزینوفیل (%)	کنترل	۱/۸۲±۱/۶۲ ^a	۱/۸۲±۱/۹۲ ^a
	۰/۲۵ درصد	۱/۳۷±۱/۸۱ ^a	۱/۳۷±۱/۸۱ ^a
	۰/۵ درصد	۱/۵۸±۱/۸۳ ^a	۱/۳۲±۱/۵۴ ^a
	۱ درصد	۱/۵۴±۱/۷۳ ^a	۱/۲۹±۱/۷۵ ^a

داده‌های ارائه شده در این جدول شامل (انحراف از معیار غمیانگین) است. اختلاف بین میانگین گروه‌های مختلف آزمایشی با حروف الفبا مشخص شده است.

نتایج نشان داد که استفاده از ۰/۵ و ۱ درصد عصاره گل ختمی در جیره سبب افزایش معنی‌داری لنفوسیت‌ها در طول دوره آزمایش گردید ($P < 0/05$). برعکس تجویز ۰/۵ و ۱ درصد عصاره گل ختمی موجب کاهش معنی‌دار منوسیت‌ها در روز ۳۰ آزمایش شد ($P < 0/05$) در حالی که اختلاف معنی‌داری در تعداد منوسیت‌های ماهیانی که با جیره واجد ۰/۵ و ۱ درصد عصاره گل ختمی تغذیه شدند در مقایسه با

در تعداد نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها در ماهی‌های تحت آزمایش مشاهده نگردید.

منوسیت‌های ماهیان گروه کنترل در روز ۶۰ مشاهده نگردید. بر اساس نتایج به دست آمده، تغییر معنی‌داری



تجزیه نسبت‌های مختلف عصاره گل ختمی در روزهای ۳۰ و ۶۰

شکل ۱: تغییرات سطح آنزیم‌های کبدی ماهی‌های تحت تیمار نسبت‌های مختلف عصاره گل ختمی

داده‌های ارائه شده در این نمودار شامل (انحراف از معیار-تیمیانگین) است. اختلاف بین میانگین گروه‌های مختلف آزمایشی با حروف الفبا مشخص شده است.

ماهی‌ها در روز ۳۰ گردید. در حالی که در روز ۶۰، افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) سطح آنزیم کبدی ALP در ماهی‌های تحت تیمار ۱ درصد عصاره گل ختمی مشاهده گردید.

اگرچه سطح آنزیم کبدی LDH در ماهی‌های تحت تیمار ۱ درصد عصاره گل ختمی در روز ۳۰ به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کم‌تر از گروه کنترل است، اما در روز ۶۰، تجویز ۱ درصد عصاره گل ختمی سبب افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) سطح LDH کبدی ماهی‌ها در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل گردید.

اگرچه تغییر معنی‌داری در سطح آنزیم AST کبدی ماهی‌های تحت تیمار غلظت‌های مختلف عصاره گل ختمی در روز ۳۰ مشاهده نگردید ($P > 0.05$)؛ اما سطح آنزیم کبدی در ماهی‌هایی که با جیره غذایی حاوی ۱ درصد عصاره تغذیه شده‌اند به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) بیش‌تر از گروه کنترل در روز ۶۰ است.

سطح آنزیم ALT کبدی ماهی‌های تحت تأثیر تجویز عصاره گل ختمی به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل در روز ۳۰ کاهش یافت. تجویز ۰/۵ درصد عصاره گل ختمی سبب افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) سطح آنزیم کبدی ALP

بحث

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره گل ختمی تأثیری بر تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (Htc)، حجم متوسط گلبولی (MCV) و غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) در طول دوره آزمایش نداشت.

تغییر معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید (WBC) در ماهیان تغذیه شده با جیره واجد عصاره گل ختمی در طی ۶۰ روز مشاهده نگردید. با این وجود در افزایش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز، مقدار هماتوکریت و نیز تعداد لوکوسیت‌ها و ترمبوسیت‌های ماهی کپور معمولی، پس از تغذیه با سیر گزارش شده است (Martins *et al.*, 2002). افزایش تعداد لکوسیت‌ها در ماهی هیبرید تیلایپای تحت تیمار عصاره سیر مشاهده گردید (Ndong and Fall, 2007).

افزایش معنی‌داری لنفوسیت‌ها در ماهی‌های تحت تیمار ۰/۵ و ۱ درصد عصاره گل ختمی ممکن است نشان‌دهنده تأثیر عصاره این گیاه در افزایش سنتز لنفوسیت‌ها در بافت‌های لنفوئیدی نظیر بخش قدامی کلیه و طحال باشد. این امر ممکن است در افزایش ایمنی سلولی و نیز افزایش کارایی ایمنی اکتسابی مؤثر باشد (Secombes *et al.*, 2005). به عبارتی دیگر، افزایش تعداد لنفوسیت‌ها به منظور افزایش ایمنی همورال اختصاصی، تولید آنتی‌بادی توسط لنفوسیت‌های B و ایمنی سلولی لنفوسیت‌های T از اهمیت به سزایی برخوردار است.

این در حالی است که تجویز ۰/۵ و ۱ درصد عصاره گل ختمی موجب کاهش معنی‌دار منوسیت‌ها شد. کاهش درصد منوسیت‌ها ممکن است پاسخی باشد

به افزایش سطح ترکیبات سمی موجود در عصاره ختمی نظیر فورفورال (Veličković *et al.*, 2011) و بازگشت مجدد نسبت منوسیت‌ها به سطح نرمال نیز ممکن است ناشی از متابولیسم سریع این سموم در کبد باشد. نتایج به دست آمده همچنین حاکی از این است که استفاده از عصاره گل ختمی در جیره غذایی ماهی‌ها تأثیری بر تغییر تعداد نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها نداشته است.

آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) از مهم‌ترین آنزیم‌های کبدی می‌باشند که در انتقال گروه‌های آمینی از آلفا آمین به آلفا کتو اسیدها نقش دارد. این آنزیم‌ها نقش مهمی در مراحل نهایی تجزیه پروتئین جهت تولید ATP ایفا می‌کند و افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها، نقش مؤثری در استفاده از اسیدهای آمینه در فرایند اکسیداسیون یا گلوکوزن بازی می‌کند (Murray *et al.*, 2012). افزایش سطح آنزیم AST کبدی در ماهی‌هایی که با جیره غذایی حاوی ۱ درصد عصاره گل ختمی تغذیه شده‌اند، در روز ۶۰، ممکن است نشان‌دهنده افزایش نرخ تجزیه پروتئینی در بافت کبد به منظور تأمین انرژی جهت مقابله با تأثیر سمیت سلولی ناشی از وجود برخی ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در عصاره گل ختمی نظیر فورفورال باشد. فورفورال یکی از ترکیبات موجود اسانس گل ختمی است که پس از اکسید شدن در کبد به ماده سمی پیروموسیک اسید تبدیل می‌شود (Veličković *et al.*, 2011). بنابراین فورفورال ممکن است به طور غیرمستقیم سبب ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب به سلول‌های کبدی ماهی‌ها گردد. افزایش AST و ALT در ماهی تیلایپایی (Soltan *et al.*, 2008) و قزل‌آلای رنگین کمان که به

ترتیب با مخلوط از گیاهان و ۱٪ بومادران در جیره (Nafisi Bahabadi *et al.*, 2014) تغذیه شدند، مشاهده گردید. این امر ممکن است مربوط به اختلال در عملکرد کبد ناشی از وجود مواد ضد تغذیه‌ای در ترکیبات گیاهان بوده باشد (Soltan *et al.*, 2008). درحالی که تجویز سیلی مارین به ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان (Banacee *et al.*, 2011)، و یا استفاده از عصاره سیر و پیاز در جیره گربه‌ماهی (Al-Salahy, 2002) سبب کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های AST و ALT گردید.

آلکالین فسفاتاز (ALP)، آنزیمی است که در اپی تلوم مجاری صفراوی و سلول‌های کبدی یافت می‌شود. آنزیم آلکالین فسفاتاز کبد نقش مهمی در متابولیسم گلیکوژن ایفا می‌کند و می‌تواند آنزیم‌های فسفوریلاز را غیرفعال نماید، بنابراین می‌تواند سنتز گلیکوژن را در کبد تحریک نماید. لذا، ممانعت از فعالیت این آنزیم در کبد با تجزیه گلیکوژن جهت تأمین انرژی مورد نیاز تحت شرایط استرس‌زا در ارتباط بوده و یا سبب کاهش نرخ فسفوریلاسیون یا از فسفوریلاسیون اکسیداتیو در زنجیره تنفسی جلوگیری می‌نماید (Murray *et al.*, 2012). افزایش سطح آنزیم ALP در ماهی‌های تحت تیمار عصاره گل ختمی در روز ۳۰ و نیز ماهی‌های تحت تیمار ۱ درصد عصاره در روز ۶۰ ممکن است به دلیل وجود ارگوسترول در عصاره گل ختمی باشد (Tešević *et al.*, 2012). زیرا ارگوسترول نقش به سزایی در افزایش فعالیت ALP کبدی دارد. افزایش سطح ALP در قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تیمار ۱٪ عصاره بومادران نیز مشاهده گردید (Nafisi Bahabadi *et al.*, 2014). درحالی که وجود یون‌های مختلف از جمله کلسیم موجود در

عصاره سبب تنظیم سطح آنزیم ALP کبدی می‌گردد (Ebrahimi, 2005). استفاده از عصاره سیلی مارین در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب کاهش سطح ALP گردید (Banacee *et al.*, 2011).

آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH)، یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های کبدی بوده و آنزیمی گلیکولایزیک^۱ محسوب می‌شود که به مقدار قابل توجهی نیز در دیگر بافت‌ها نیز یافت می‌شود. سطح این آنزیم در شرایط هیپوکسی و بروز آسیب‌های شدید به بافت‌های مختلف بدن، تغییر می‌کند. آسیب‌های پاتولوژیکی وارده به کبد و ایجاد شرایط هیپوکسی در خون، ممکن است از فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری جلوگیری به عمل آید که این امر موجب کاهش سطح تولید ATP می‌گردد. در نتیجه، مهار فسفوریلاسیون اکسیداتیو پیامدهای مرگباری را در پی خواهند داشت. در چنین شرایطی دیگر اکسیداسیون مجدد NADH با اکسیژن از طریق زنجیره تنفسی میسر نیست. لذا پیروات به وسیله NADH و طی واکنش بیوشیمیایی که به وسیله آنزیم لاکتات دهیدروژناز کاتالیز می‌شود، به لاکتات احیا می‌گردد. بدین ترتیب، از طریق اکسیداسیون مجدد NADH به وسیله لاکتات، فرایند گلیکولیز در غیاب اکسیژن ادامه می‌یابد (Murray *et al.*, 2012). افزایش سطح LDH کبدی ماهی‌ها تحت تیمار ۱ درصد عصاره گل ختمی در روز ۶۰ ممکن است حاکی از بروز مسمومیت سلولی ناشی از وجود برخی ترکیبات فیتوشیمیایی در عصاره ختمی است. با افزایش دوره زمان تجویز دارو، تأثیر مسمومیت سلولی بر فعالیت آنزیم LDH مشهودتر است. درحالی که کاهش سطح LDH کبدی در روز ۳۰

^۱ Glycolytic enzyme

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان از مسئولین محترم و مدیر گروه شیلات دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان که شرایط لازم جهت انجام این تحقیق را برای ما تسهیل نمودند و همچنین معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات خوزستان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱. محمودی، ر.، تاجیک، ح.، فرشید، ا.ع.، احسانی، ع.، زارع، پ.، مرادی، م.، ۱۳۹۰. تعیین ترکیبات شیمیایی و اثرات ضد میکروبی اسانس پونه کوهی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس. مجله ارمان دانش، ۵ (۶۵)، ۴۰۰-۴۱۲.
2. Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A.R., Abbaszadeh, A., 2014. Antifungal efficacy of thymol, carvacol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal of Medical Mycology*, 24(2), 51-56.
3. Abdelwahab, A.M., El-Bahr, S.M., 2012. Influence of black Cumin seeds (*Nigella sativa*) and Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) mixture on performance and serum biochemistry of Asian Sea Bass, *Late calcarifer*. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4(5), 496-503.
4. Ahmadi, K., Banaee, M., Vosoghei, A.R., Mirvaghefi, A.R., Ataeimehr, B., 2012. Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract (*Silybum marianum*) on some immune parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Actinopterygii, Salmoniformes, Salmonidae). *Acta Ichthyologica Piscat*, 42 (2), 113-120.
5. Al-Salahy, M.B., 2002. Some physiological studies on the effect of onion and garlic juices on the fish, *Clarias lazera*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 27, 129-142.
6. Ardó, L., Yin, G., Xu, P., Váradi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., Jeney, G., 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 275 (1-4), 26-33.

ممکن است به دلیل وجود ویتامین‌ها به‌ویژه ویتامین C موجود در عصاره نسبت داد (Ebrahimi, 2005). کاهش سطح LDH در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تیمار سیلی‌مارین و بومادران گزارش شده است (Banaee et al., 2011; Nafisi Bahabadi et al., 2014).

تأثیر عصاره گل ختمی بر فعالیت آنزیم‌های کبدی با تأثیر عصاره گیاهان دیگر نظیر *Curcuma longa* (Abdelwahab and El-Bahr, 2012)، *Cyperus rotundus* (Suresh Kumar and Mishra, 2005) و *Careya arborea* قابل مقایسه است. عدم تغییر سطح آنزیم‌های کبدی ماهیان کپور تحت تأثیر نسبت‌های مختلف عصاره گل ختمی نیز ممکن است ناشی از تأثیر فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره گل ختمی بر عملکرد فیزیولوژیکی غشای سلول‌ها در بافت کبد، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها و افزایش پایداری غشای سلولی گردد (Sadighara et al., 2012).

اندازه‌گیری روند تغییرات فعالیت آنزیم‌های کبدی و شاخص‌های خون‌شناسی ماهی‌های کپور تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گل ختمی نشان داد که عصاره این گیاه از نظر سلامت دارویی در غلظت‌های ۲/۵ و ۵/۵ درصد در مرحله پیش‌بالینی مورد تأیید است ولی غلظت ۱ درصد عصاره گل ختمی ممکن است سبب بروز سمیت سلولی در ماهی گردد. تأثیر سمیت سلولی با افزایش طول دوره تجویز عصاره گل ختمی مشهودتر است.

17. Johnson, A.M., Rohlf, E.M., Silverman, L.M., 1999. Proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 477-540.
18. Jun, H.J., Lee, J.H., Kim, J., Jia, Y., Kim, K.H., Hwang, K.Y., Yun, E.J., Do, K.R., Lee, S.L., 2014. Linalool is a PPAR α ligand that reduces plasma TG levels and rewires the hepatic transcriptome and plasma metabolome. *Journal of Lipid Research*, 55, 1098-1110.
19. Kubiça, T.F., Alves, S.H., Weiblen, R., Lovato, L.T., 2014. In vitro inhibition of the bovine viral diarrhea virus by the essential oil of *Ocimum basilicum* (basil) and monoterpenes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 209-214.
20. Martins, M.L., Moraes, F.R., Miyazaki, D.M., Brum, C.D., Onak, E.M., Fenerick, J.J., Bozzo, F.R., 2002. Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatu* (*Monogenea*: Dactylogyridae) infection in cultivated pacu, *Piaractus mesopotamicus* (*Osteichthyes*: Characidae) in Brazil and its haematological effects. *Parasite*, 9, 175-180.
21. Moss, D.V., Henderson, A.R., 1999. Clinical enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 617-721.
22. Murray, R., Bender, D., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Rodwell, V., Weil, P.A., 2003. Harpers Illustrated Biochemistry 29th Edition. University of Toronto, Ontario, Canada: Mc Graw Hill Education, 818
23. Nafisi Bahabadi, M., Banaee, M., Taghiyan, M., Nematdoust Haghi, B., 2014. Effects of dietary administration of yarrow extract on growth performance and blood biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Aquatic Biology*, 2(5), 275-285.
24. Ndong, D., Fall, J., 2007. The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). *Document Scientifique du CRODT*, 1-22.
25. Puri, A., Srivastava, P., Pandey, P., Yadav, R.S., Bhatt, P.C., 2014. Scopalamine induced behavioral and biochemical modifications and protective effect of *Celastrus paniculatus* and *Angelica glauca* in rats. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 4(3), 158-169.
26. Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A.J.M., Del Carmen Garrigós, M., 2014. Release and antioxidant activity of carvacrol
7. Asadi, M.S., Mirvaghefi, A.R., Nematollahi, M.A., Banaee, M., Ahmadi, K., 2012. Effects of Watercress (*Nasturtium nasturtium*) extract on some immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Open Veterinary Journal*, 2(1), 32-39.
8. Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P., 2010. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytotherapy Research*, 24(5), 673-679.
9. Banaee, M., 2010. Influence of silymarin in decline of sublethal diazinon-induced oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ph.D. Thesis, Aquaculture and Environmental Department, Natural Resource Faculty, Natural Resource and Agriculture Collage, Tehran University, Iran, 2010. 149
10. Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., Rafei, G.R., 2011. Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 887-896.
11. Bilia, A.B., Santomauro, F., Sacco, C., Bergonzi, M.C., Donata, R. 2014. Essential oil of *Artemisia annua* L, An extraordinary component with numerous antimicrobial properties. *Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* ID: 159819. 1-7. Doi:10.1155/2014/159819.
12. Burt, S.A., Vlieland, R., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E.J.A., 2005. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection*, 68(5), 919-926.
13. Divyagnaneswari, M., Christyapita, D., Dinakaran, M.R., 2007. Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 249-259.
14. Ebrahimi, A., 2005. Clinical Explanation of Laboratory Tests. Tehran, Iran: Teimorzadeh, Tabib Publisher, 628
15. Elmastas, M., Ozturk, L., Gokce, I., Erenler, R., Aboul-Enein, H.Y., 2004. Determination of antioxidant activity of marshmallow flower (*Althaea officinalis* L.). *Bioanalytical*, 37(9), 1859-1869.
16. Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 2004. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 1081-1085.

- activities of the seed oil from three Malvaceae Species. Archive of Biological Science Belgrade, 64(1), 221-227.
33. Vázquez, G.R., Guerrero, G.A., 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Tissue and Cell, 39, 151-160.
 34. Veličković, D.T., Karabegović, I.T., Stojičević, S.S., Lazić, M.L., Marinković, V.D., Veljković, V.B., 2011. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from *Salvia glutinosa* L. and *Salvia officinalis* L. Hemijska industrija, 65(5), 599-605.
 35. Wynn, S.G., Fougère, B.J., 2007. Veterinary herbal medicine. USA: Mosby Elsevier St. Louis. 2007; 736
 36. Yin, G., Ardó, L., Thompson, K.D., Adams, A., Jeney, Z., Jeney, G., 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology, 26(1), 140-145.
 37. Yin, G., Jeney, G., Racz, T., Xu, P., Jun, X., Jeney, Z., 2006. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 253 (1-4), 39-47.
 - and thymol from polypropylene active packaging films. LWT-Food Science and Technology, 58(2), 470-477.
 27. Sadighara, P., Gharibi, S., Moghadam Jafari, A., Jahed Khaniki, G.R., Salari, S., 2012. The antioxidant and flavonoids contents of *Althaea officinalis* L. flowers based on their color. Avicenna Journal of Phytomedicine, 2(3), 113-117.
 28. Sartoratto, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., Rehder, V.L.G., 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 35, 275-280.
 29. Secombes, C.J., Bird, S., Zou, J., 2005. Adaptive immunity in teleosts: cellular immunity. Development Biology, 121, 25-32.
 30. Soltan, M.A., Hanafy, M.A., Wafa, M.I.A., 2008. An Evaluation of fermented silage made from fish by products as a feed ingredient for African catfish (*Clarius gariepinus*). Global veterinaria, 2, 80-86.
 31. Suresh Kumar, S.V., Mishra, S.H., 2005. Hepatoprotective activity of rhizomes of *Cyperus rotundus* Linn. against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity, Indian Journal of Pharmaceutical sciences, 67(1), 84-88.
 32. Tešević, V., Vajs, V., Lekić, S., Dordević, I., Novaković, M., Vujisić, L., Todosijević, M., 2012. Lipid composition and antioxidant