

اثر عصاره متانولی خارخاسک (*Tribulus terrestris*) بر آنزیم‌های کبد و گوارشی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) (Linnaeus 1758)

پریا اکبری^{۱*}، سیمین دلیران^۱، زهرا امینی خویی^۲

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

۲- مرکز تحقیقات آب‌های دور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۱۹

چکیده

در مقایسه با داروهای شیمیایی، گیاهان دارویی دارای عوامل و ترکیبات موثری بر تسریع روند جذب دستگاه گوارش، بهبود اثرات درمانی و کاهش اثرات جانبی و سمیت داروها می‌باشند. تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر عصاره متانولی خارخاسک (*Tribulus terrestris*) بر آنزیم‌های کبد و گوارشی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) به مدت ۶۰ روز صورت گرفت. ۲۴۰ قطعه بچه ماهی کفال خاکستری با میانگین وزنی $8/42 \pm 0/43$ گرم و میانگین طولی $6/45 \pm 0/40$ سانتی متر در یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار (با تعداد ۲۰ قطعه) که به ترتیب شامل ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم عصاره متانولی خارخاسک در هر کیلو گرم غذا بود مورد آزمایش قرار گرفتند. در پایان آزمایش، کمترین میزان کلسترول و تری گلیسرید و بیشترین میزان آلبومین سرم خون در تیمار ۴ مشاهده شد ($P < 0/05$). کمترین میزان گلوکز و بیشترین میزان پروتئین و گلوبولین در تیمار ۴ مشاهده شد و بین تیمارها تفاوت معنی داری وجود داشت ($P < 0/05$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز، پروتئاز و کمترین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمار ۴ مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز و کمترین میزان فعالیت آنزیم‌های اسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز نیز در تیمار ۴ و ۳ مشاهده شد اما بین تیمار ۳ و ۴ اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P > 0/05$). در کل، نتایج نشان داد که استفاده از ۱/۵ گرم عصاره متانولی خارخاسک در هر کیلو گرم اثرات مثبتی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و کبد و شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی کفال خاکستری دارد.

کلمات کلیدی: ماهی کفال خاکستری، آنزیم گوارشی، آمینوترانسفراز، عصاره خارخاسک، شاخص‌های بیوشیمیایی خون.

مقدمه

مدیریت تغذیه ماهی‌ها یکی از عوامل موثر در ایجاد مقاومت آن‌ها در برابر بیماری‌ها می‌باشد، در واقع با رژیم مناسب نه تنها وضعیت سلامتی آن‌ها تضمین می‌شود بلکه احتمال بیماری در آن‌ها نیز کاهش می‌یابد. و رابطه مثبتی بین افزایش مقاومت بیماری با نرخ رشد و بقا وجود دارد. استفاده از افزودنی‌های گیاهی در آبی پروری یکی از روش‌های ارزان‌تر و ایمن‌تر از جنبه مسائل زیست محیطی در مقایسه با داروهای شیمیایی است. گیاهان دارویی دارای ترکیبات و مواد موثره‌ای هستند که منجر به تسریع و تسهیل عمل جذب روده، بهبود اثرات درمانی و کاهش اثرات جانبی و سمیت داروهای شیمیایی می‌گردند (Platel et al., 2002). اگرچه تحقیقات انجام شده روی حیوانات آزمایشگاهی، گویای اثرات مثبتی از کاربرد گیاهان دارویی در درمان و جلوگیری بیماری در ماهیان است (Sivaram et al., 2004; Rao et al., 2006; Divyagnanevvari et al., 2007; Nafisi Bahabadi et al., 2014) اما اثرات متناقض برخی گیاهان، استفاده از آن‌ها را در مقیاس تجاری کاهش داده است. کمبود اطلاعات در زمینه اثرات یولوژیکی ترکیبات موجود در عصاره گیاهان دارویی بر ویژگی‌های فردی گونه‌های مختلف ماهی، در کاربرد این ترکیبات مشکل اساسی ایجاد نموده است (Banaee, 2010; Nafisi Bahabadi et al., 2014). بنابراین، مطالعه در زمینه اثرات مشتق‌های گیاهی و فارماکولوژیکی آن جهت سلامت ماهی می‌تواند منجر به افزایش دانش ما در زمینه استفاده از ترکیبات موثر برای درمان بیماری گردد (Nafisi Bahabadi et al., 2014).

خارخاسک با نام علمی (*Tribulus terrestris*)

از خانواده گیاهان زیگوفیلایسیا (*Zygophyllaceae*) می‌باشد. از نظر ماهیتی در دمای گرم و نواحی گرمسیری در اروپای جنوبی، جنوب آسیا، سراسر آفریقا و استرالیا رشد می‌نماید (Bucci, 2000). قسمت‌های مختلف این گیاه حاوی مواد شیمیایی از جمله فلاونوئیدها، فلانول گلیکوزید، استروئید، ساپونین و آلکالوئیدها می‌باشند که از نظر پزشکی حائز اهمیت هستند (Chhatre et al., 2014). اثرات مفید ترکیبات زیست فعال این گیاه، تحریک اشتها، کارایی غذا ماهی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Gültepe et al., 2014) و ماهی سیچلیده (*Cichlasoma nigrofasciatum*) (Yeganeh et al., 2018)، بهبود ترشح آنزیم‌های گوارشی، پاسخ ایمنی ماهی تیلاپای نیل (Gültepe et al., 2014)، آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد درد، ضد التهاب، ضد سرطان، ضد انعقادی، ضد تومور، حمایت کبد، افزایش مقاومت عضلانی می‌باشد (Chhatre et al., 2014).

کبد بزرگترین غده در بدن مهره داران و بخشی برای متابولیسم شدید است. بیماری‌های کبد یکی از مشکلات جدی است که به وسیله مواد شیمیایی سمی به وجود می‌آید و علی‌رغم پیشرفت‌های عظیم در داروهای آللوپاتی، هیچ داروی حفاظت کبدی موثری در دسترس نمی‌باشد (Kavitha et al., 2011). گیاهان دارویی نقش حیاتی را در مدیریت بیماری‌های کبدی بازی می‌کنند (Kavitha et al., 2011). آمینوترانسفرازها (آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز) مارکرهای آنزیمی کبدی قابل اعتمادی هستند که در تشخیص آسیب‌های کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kumer et al., 2004). تحت

شرایط عادی این آنزیم‌ها درون سلول‌های کبدی وجود دارند اما زمانی که کبدی آسیب می‌بیند این آنزیم‌ها وارد جریان خون می‌شوند (Ahmed and Khater, 2004; Kumar et al., 2004). گرچه آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز هر دو در ضایعات کبدی افزایش می‌یابند اما آلانین آمینوترانسفراز آنزیم اختصاصی‌تر و مشخص‌کننده‌تری می‌باشد و افزایش آسپاراتات آمینوترانسفراز در اکثر مواقع به جز ناراحتی‌های پارانشیمال کبد قابل ملاحظه است. همچنین هنگامی که جریان صفرا کم شود و یا مجرای صفرا بسته شود آنزیم‌های خاصی در کبد زیاد می‌شوند یکی از این آنزیم‌ها آلکالین فسفاتاز یا فسفاتاز قلیایی است. مشکلات جریان صفرا می‌تواند به علت مشکل در کبد، کیسه صفرا یا لوله‌های اتصال به آن‌ها باشد بنابراین افزایش غلظت آنزیم مذکور معمولاً به این معنی است که کبد آسیب دیده است (Hosseini and Shalae, 2013).

تاکنون تحقیقات اندکی در زمینه اثر عصاره خارخاسک بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون در ماهی تیلاپای نیل (Gültepe et al., 2014)، آنزیم‌های کبد در ماهی تیلاپای موزامبیکا (*O. mossambicus*) (Kavitha et al., 2011) و آنزیم‌های گوارشی در جوجه گوشتی (Sahin and Duru, 2010) صورت گرفته است. به عنوان مثال، Gültepe و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که استفاده از سطوح مختلف عصاره خارخاسک (۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم غذا) منجر به افزایش معنی‌دار سطح گلوکز، گلوبولین و کاهش معنی‌دار کلسترول در ماهی تیلاپای نیل شد و بر روی میزان آلبومین، پروتئین تام و تری-گلیسیرید تاثیر معنی‌داری نداشت و در پایان استفاده از

غلظت ۴۰۰ میلی گرم عصاره خارخاسک بر کیلو گرم غذا به منظور بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی، ایمنی و هماتولوژی ماهی تیلاپای نیل توصیه شد. همچنین Kavitha و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که استفاده از ۲۵۰ میلی گرم عصاره خارخاسک بر کیلو گرم غذا منجر به تعدیل و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و آنزیم‌های کبدی از جمله آلکالین فسفاتاز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در مقابل سمیت استامینوفن در کبد ماهی تیلاپای موزامبیکا شد.

در بین ماهیان دریایی، گونه ی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) علاوه بر اهمیت زیست محیطی، از نظر اقتصادی نیز حائز اهمیت فراوان می‌باشد. این ماهی به عنوان یک گونه ی تجاری و پرورشی در مزارع پرورشی وارد و مورد توجه واقع گردیده است. از طرفی، به کارگیری روش‌ها و آلات صید مخرب و آلودگی آب‌ها، بقای نسل این ماهی با ارزش را به شدت به خطر انداخته است. لذا انجام مطالعاتی که به- نحوی دوام بقای این ماهی و ماهیان مشابه را به دنبال داشته باشد ضروری به نظر می‌رسد (نگهداری جعفر بیگی، ۱۳۹۴).

از آنجایی که مطالعات اندکی در خصوص اثر عصاره خارخاسک روی شاخص‌های بیوشیمیایی و آنزیم‌های کبدی ماهیان به عنوان شاخص‌های مهم در بررسی وضعیت سلامت و ایمنی ماهی صورت گرفته است (Akrami et al., 2015; Kavitha et al., 2011) و از طرف دیگر مطالعه‌ای در خصوص نقش عصاره گیاه خارخاسک بر فعالیت آنزیم‌های گوارش به عنوان شاخص موثر در کارایی قابلیت هضم و بررسی وضعیت تغذیه ماهی (Citarasu, 2010) انجام نشده است.

لذا این تحقیق با هدف بررسی تاثیر عصاره الکلی گیاه خارخاسک بر بهبود وضعیت سلامتی ماهی به بررسی فعالیت آنزیم‌های کبدی (اسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز) و گوارشی (آمیلاز، لیپاز و پروتئاز) و برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون (گلوکز، کلسترول، تری گلیسیرید، پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین) ماهی کفال خاکستری (*M. cephalus*) می‌پردازد

مواد و روش‌ها

در آذرماه ۱۳۹۶، ۲۴۰ قطعه ماهی کفال خاکستری با میانگین وزنی $43 \pm 8/42$ گرم و میانگین طولی $40 \pm 6/45$ سانتی‌متر از مرکز تکثیر میگوی دکتر اژدری واقع در اطراف شهرستان کنارک تهیه و به مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار انتقال داده شد. پیش از شروع آزمایش، ماهی‌ها به مدت دو هفته با در دو مخزن ۳۰۰ لیتری سازگار شدند و طی این مدت با استفاده از جیره تجاری (۳۹ درصد پروتئین، ۷ درصد چربی، ۸ درصد خاکستر و ۵ درصد رطوبت) با سایز ۱/۲ میلی‌متر ساخت شرکت هورراش تولید غذای میگو و آبریان بوشهر) به میزان ۵ درصد وزن بدن طی دو مرحله (ساعت ۹ و ۱۷) تغذیه شدند.

گیاه خارخاسک، پس از جمع‌آوری از اطراف شهرستان شیراز، به تایید اداره منابع طبیعی استان فارس رسید. سپس بوته‌ها و سر شاخه‌های آن‌ها در سایه خشک و توسط دستگاه آسیاب کاملاً به حالت پودر تبدیل شد. مقدار ۵۰ گرم از پودر حاصل شده با ۴۰۰ سی سی الکل متانول ۹۶ درصد مخلوط گردید و با دستگاه سوکسله عصاره‌گیری انجام شد. به‌منظور حذف حلال، عصاره‌های حاصل در دستگاه روتاری

تحت عملیات تقطیر در خلا قرار گرفته از خلا ۲۵ میلی‌متر جیوه در دمای ۵۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد استفاده و با گاز ازت باقی‌مانده حلال حذف شد و عصاره‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف در شیشه‌های تیره نگهداری شدند (Harikrishnan و همکاران، ۲۰۰۳).

پس از دو هفته سازگاری، آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار به همراه ۳ تکرار، در مجموع ۱۲ مخزن و ۲۰ قطعه ماهی در هر مخزن در سالن مرکز انجام گرفت. بر این اساس تیمار ۱ شامل گروه شاهد بود و ماهی‌های این تیمار با جیره رشد (شرکت هورراش بوشهر) تغذیه شدند. بقیه تیمارها به ترتیب با ۱/۵، ۱ و ۱/۵ گرم عصاره خارخاسک در هر کیلوگرم غذا تغذیه شدند (Ghosal et al., 2015). در طول دوره آزمایش شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم شد و همچنین ماهیان در دوره پرورش به میزان ۵ درصد وزن بدن با جیره‌های آماده شده تغذیه شدند. طی دوره آزمایش پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب به صورت روزانه اندازه‌گیری شدند. به‌طوری‌که دمای آب $28/45 \pm 0/78$ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول $8/01 \pm 0/92$ میلی‌گرم بر لیتر و pH آب $7/9 \pm 0/6$ بود. تعویض آب به صورت روزانه (۳۰ درصد) و هوادهی از یک پمپ مرکزی با استفاده از سنگ هوادهی انجام شد. ماهی‌ها با سطوح ۵، ۱۰، ۱ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم عصاره گیاه خارخاسک تغذیه شده و در طی دوره ۶۰ روزه مورد پرورش قرار گرفتند. سپس سطوح مشخص عصاره گیاه، پس از مشخص نمودن مقدار غذا برای یک دوره ۶۰ روزه، در آب مقطر حل و با اسپری کننده‌های جداگانه به سطح غذا اسپری گردید پس از ۴۸ ساعت

سانتریفیوژ با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در هر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و کبد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند (Gawlica et al., 2000). سپس محلول رویی در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری (با سه تکرار برای هر تیمار) به منظور سنجش آنزیمی جمع آوری شد. از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون تهران و دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل DR600، ساخت HACH آمریکا) برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و کبدی استفاده شد.

میزان فعالیت آنزیم آمیلاز بر اساس روش Natalia و همکاران (۲۰۰۴) در طول موج ۵۴۰ نانومتر، میزان فعالیت آنزیم پروتئاز به روش King (۱۹۷۲) طول موج ۴۶۰ نانومتر و میزان فعالیت آنزیم لیپاز به روش Furne و همکاران (۲۰۰۵) در طول موج ۴۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفتند. فعالیت آنزیم‌ها بر اساس واحد بر میلی گرم پروتئین با سه تکرار برای هر نمونه محاسبه شدند.

سطح فعالیت آنزیم‌های اسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز سرم بر اساس مقدار مصرف NADPH و تبدیل آن به NAD^+ در طول موج ۵۰۵ نانومتر و آلکالین فسفاتاز بر اساس تبدیل نیتروفنیل فسفات به نیتروفنول و فسفات و در طول موج ۴۱۰ نانومتر تعیین و بر اساس جذب نوری OD و فرمول ارائه شده در دستورالعمل کیت‌ها محاسبه گردید (Liu et al., 2016).

پس از خون‌گیری از قلب ماهی‌ها، خون به درون میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری ریخته شد و پس از سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، سرم آن تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان

جیره های خشک جمع آوری و در نایلون‌های مجزا در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تیمار شاهد تنها با آب مقطر اسپری شد (Ghosal et al., 2015). در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)، ۹ ماهی از هر تیمار بعد از ۲۴ ساعت قطع غذا (به منظور کاهش استرس و خالی شدن دستگاه گوارش) (Akrami et al., 2015) به صورت تصادفی صید و پس از بیهوش نمودن با پودر گل میخک (۲۰۰ میلی گرم در لیتر)، از قلب آن‌ها با استفاده از سرنگ انسولین خون‌گیری شد (Nafisi Bahabadi et al., 2014). سپس به منظور تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی و گوارشی، ماهیان سریعاً در مجاورت یخ (به منظور به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی) کالبدشکافی آن‌ها صورت گرفت و روده و کبد آن‌ها با دقت جدا و روده در محور طولی با دقت بریده شد و محتویات داخل روده تخلیه و سپس با آب مقطر به خوبی شسته شد (Chong et al., 2002). نمونه‌های کبد و روده بلافاصله در شرایط انجماد در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

به منظور تعیین میزان آنزیم‌های کبدی و گوارشی، نمونه‌های کبد و روده از شرایط انجماد خارج و وزن گردیدند. روده بعد با نسبت وزنی به حجمی (w/v) ۱ به ۵ با کلرید سدیم ۰/۲ مولار و کبد هر ماهی درون یک لوله فالتکون که قبلاً استریل شده بودند قرار داده شدند و به نسبت وزنی به حجمی ۱۰ برابر (۱/۱۰) به آن‌ها محلول بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار، KCL ۱۰۰ میلی مولار و EDTA یک میلی مولار با PH: 7/4 اضافه شد. سپس توسط یک دستگاه یکنواخت کننده (هموژنایزر) (مدل UP200S، شرکت Hielscher آلمان) به خوبی یکنواخت شدند. جهت جداسازی عصاره حاوی آنزیم مخلوط‌های یکنواخت شده روده در

ویرایش ۱۹ و جهت مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح معنی دار ۵ درصد استفاده شد. و جهت محاسبات آماری از نرم افزار Excel ویرایش ۲۰۱۰ استفاده شد. مدل آماری طرح به قرار زیر است

$$Y_{ij} = \mu + T_{ij} + E_{ij}$$

Y_{ij} مقدار صفت اندازه گیری شده، μ میانگین صفت در جامعه مورد نظر، T_{ij} اثر سطوح مختلف عصاره خارخاسک و E_{ij} اثر خطای آزمایش

نتایج

فعالیت آنزیم های کبدی

با افزایش غلظت عصاره خارخاسک، میزان فعالیت آنزیم های آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز و آسپاراتات آمینو ترانسفراز کاهش یافت و اختلاف معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد ($P < 0.05$). در حالی که تیمار ۳ و ۴ اختلاف معنی داری را میزان فعالیت آنزیم های آلانین آمینو ترانسفراز و آسپاراتات آمینو ترانسفراز با یکدیگر نشان ندادند ($P > 0.05$) (جدول ۱). کمترین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمار ۴ مشاهده شد که اختلاف معنی داری را با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0.05$) (جدول ۱).

انجام آزمایش های بیوشیمیایی نگهداری گردید (Nafisi Bahabadi et al., 2014). از کیت های تهیه شده از شرکت پارس آزمون تهران و دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل DR600، ساخت HACH آمریکا) برای سنجش شاخص های بیوشیمیایی سرم خون استفاده شد. سنجش کلسترول به روش کلسترول اکسیداز (Burtis and Ashwood, 1994) در طول موج ۵۱۰ نانومتر، تری گلیسیرید توسط آنزیم لیپاز، گلیسرول کیناز و پراکسیداز (Burtis and Ashwood, 1994) در طول موج ۵۱۰ نانومتر، گلوکز به روش واکسنش پراکسیداز-اکسیداز گلوکز (Trinder, 1969) و در طول موج ۵۰۰ نانومتر، پروتئین تام به روش بیوره در طول موج ۵۴۰ نانومتر، آلبومین به روش بروموکرزول سبز (Wootton, 1964) در طول موج ۶۳۰ نانومتر و از کسر پروتئین تام و آلبومین گلوبولین محاسبه شد (Kumar et al., 2005). نسبت آلبومین به گلوبولین از تقسیم آلبومین بر گلوبولین محاسبه شد (Sahoo et al., 1999).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده ها به روش آنالیز واریانس یک طرفه (one way analysis of variance ANOVA) انجام گرفت نرمال بودن داده ها بر اساس آزمون کالموگراف اسمیرنوف با استفاده از نرم افزار SPSS

جدول ۱: تغییرات میانگین میزان فعالیت آنزیم های کبدی ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)

تیمار				میزان فعالیت آنزیم ها (واحد بر میلی گرم پروتئین)
۴	۳	۲	۱	
۶/۶۸±۰/۹۸ ^c	۵/۹۰±۱/۱۰ ^c	۶/۵۶±۱/۳۷ ^b	۷/۶۶±۱/۵۷ ^a	اسپاراتات آمینو ترانسفراز (ASP)
۳۴/۹۰±۲/۱۷ ^c	۳۶/۳۶±۳/۵۵ ^{bc}	۳۷/۹۳±۱/۹۲ ^b	۴۸/۸۳±۱/۲۵ ^a	آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)
۲۰۵/۳۳±۲۳/۰۵ ^d	۳۰۹/۶۶±۲۵/۵۷ ^c	۴۸۱/۳۳±۳۳/۲۱ ^b	۵۱۵±۱۵ ^a	آلکالین فسفاتاز (ALP)

وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$). تیمار ۱ تا ۴ به ترتیب حاوی ۱/۵ و ۱/۵ گرم عصاره گیاه خارخاسک بر کیلو گرم غذا است.

فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی

اضافه نمودن عصاره گیاه خارخاسک به جیره غذایی با غلظت‌های مختلف منجر به افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم پروتئاز و آمیلاز در مقایسه با تیمار شاهد شد ($P < 0/05$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز در روده ماهی کفال خاکستری تغذیه شده با ۱/۵ گرم عصاره گیاه خارخاسک در هر

کیلوگرم غذا مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0/05$) (جدول ۲). در حالی- که بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز در تیمار ۳ و ۴ مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر نشان ندادند ($P > 0/05$) (جدول ۲).

جدول ۲: تغییرات میانگین فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)

فعالیت آنزیم‌ها (واحد بر میلی گرم پروتئین)	تیمار			
	۴	۳	۲	۱
لیپاز	۵/۱۰±۰/۱۰ ^a	۵/۰۴±۰/۲۴ ^a	۴/۱۱±۰/۲۲ ^b	۳/۲۹±۰/۱۳ ^c
پروتئاز	۳۱۵/۳۳±۱۲/۶۶ ^a	۲۴۷/۶۶±۲/۵۱ ^b	۲۴۲/۴۵±۶/۴۲ ^b	۱۹۹/۶۶±۱۰/۵۰ ^c
آمیلاز	۹۳۵/۳۳±۱۷/۷۵ ^a	۷۳۵/۶۶±۴۷/۶۳ ^b	۶۸۶±۱۳/۰۷ ^b	۴۹۶/۶۶±۵۲/۸۲ ^c

وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است ($P < 0/05$). تیمار ۱ تا ۴ به ترتیب حاوی ۱۰/۵، ۱/۵ و ۱/۵ گرم عصاره گیاه خارخاسک بر کیلوگرم غذا است.

شاخص‌های بیوشیمیایی خون

بیشترین میزان پروتئین تام و گلوبولین و کمترین میزان گلوکز در سرم خون در تیمار ۴ مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0/05$). بیشترین میزان آلبومین و کمترین میزان

کلسترول و تری گلیسیرید در تیمار ۳ و ۴ مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را از این نظر در مقایسه با تیمار ۲ و شاهد نشان دادند ($P < 0/05$) (جدول ۳).

جدول ۳: تغییرات میانگین (میانگین ± خطای معیار) شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

	تیمار			
	۴	۳	۲	۱
پروتئین تام (گرم بر دسی لیتر)	۶/۸۰±۰/۳۳ ^a	۶/۶۹±۰/۴۵ ^b	۴/۵۹±۰/۱۸ ^c	۴/۵۶±۰/۰۲ ^c
گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر)	۸۹/۶۶±۹/۰۱ ^b	۱۰۷±۳۸/۱۸ ^{ab}	۹۹/۳۲±۱۰/۰۶ ^{ab}	۱۱۶/۳۳±۱۵/۵۶ ^a
کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر)	۸/۱۳±۱/۴۴ ^c	۱۰±۰/۸۳ ^b	۹/۹۳±۱/۰۱ ^b	۱۲/۵۳±۱/۰۸ ^a
تری گلیسیرید (میلی گرم بر دسی لیتر)	۱۳۲/۳۳±۱۶/۴۲ ^b	۱۴۱/۵۰±۱۲/۵۰ ^b	۱۳۸/۶۶±۱۳/۲۱ ^b	۱۷۹/۶۶±۱۱/۵۲ ^a
آلبومین (گرم بر دسی لیتر)	۵/۲۰±۰/۵۴ ^a	۵/۱۷±۰/۱۲ ^b	۳/۰۷±۰/۳۲ ^c	۳/۰۱±۰/۱۹ ^c
گلوبولین (گرم بر دسی لیتر)	۱/۵۴±۰/۳۲ ^a	۱/۵۲±۰/۲۵ ^a	۵/۵۱±۰/۱۲ ^a	۱/۵۵±۰/۱۹ ^a

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P < 0/05$). میانگین داده‌ها بر اساس واریانس یک طرفه مورد مقایسه قرار گرفتند. تیمار ۱ تا ۴ به ترتیب حاوی ۱۰/۵، ۱/۵ و ۱/۵ گرم عصاره گیاه خارخاسک بر کیلوگرم غذا است.

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از سطوح مختلف عصاره خارخاسک منجر به کاهش معنی دار میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز، میزان آلکالین فسفاتاز، اسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در کبد ماهی کفال خاکستری شد و کمترین سطوح آنزیم‌های کبدی اسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در تیمارهای حاوی ۱ و ۱/۵ گرم عصاره گیاه خارخاسک بر کیلوگرم غذا و کمترین میزان آلکالین فسفاتاز در تیمار ۱/۵ گرم عصاره گیاه خارخاسک بر کیلوگرم غذا مشاهده شد. می‌توان گفت که عصاره گیاهی مذکور در غلظت‌های مورد استفاده، هرچند بایستی مطالعات هیستوپاتولوژیکی از بافت کبد جهت آزمایش تکمیلی نیز صورت گیرد فاقد مواد آسیب رسان به بافت کبد می‌باشد (Talpur, 2014). Kavitha و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی فعالیت حفاظت کبدی عصاره خارخاسک بر علیه سمیت استامینوفن در ماهی تیلاپای موزامبیکا نشان دادند که در مقایسه با بافت کلیه و آبشش، بافت کبد حساسیت بیشتری نسبت به سمیت استامینوفن نشان داد و میزان آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، اسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز کبد در ماهیان تیمار شده با استامینوفن افزایش یافت در حالی که استفاده از ۲۵۰ میلی گرم عصاره خارخاسک بر کیلوگرم غذا در رژیم غذایی ماهی تیلاپای موزامبیکا منجر به کاهش و تعدیل میزان فعالیت آنزیم‌های کبد شدند. که با نتایج حاصل از نظر تاثیر عصاره خارخاسک بر تعدیل فعالیت آنزیم‌های کبدی هم‌خوانی داشت. بسیاری از مطالعات فیتوشیمیایی حضور ترکیب فلانووئیدی در عصاره اتانولی خارخاسک را تأیید می‌نمایند که دلیل فعالیت

حفاظتی کبد و تعدیل آنزیم‌های کبدی می‌باشند (Wegner and Fintelman, 1999; Kavitha et al., 2011)، لذا می‌توان گفت که عصاره خارخاسک با داشتن ترکیبات فعال طبیعی از جمله، فلاانوئیدها، تری-ترپنوئیدها و استروئیدها که دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند می‌تواند منجر به نفوذپذیری سلولی، توانایی سرکوب استرس اکسیداتیو تعدیل آنزیم‌های کبدی گردد (Chhatre et al., 2014; Kavitha et al., 2011).

گزارش‌های بسیاری اثر گیاهان را به‌عنوان اشتها-آور و محرک رشد در گونه‌های آبی اثبات کرده‌اند (Citarasu, 2010). گیاهان در فعالیت آغازی در تغذیه (به‌عنوان چاشنی عمل کرده در نتیجه در الگوهای تغذیه-ای ترشحات مایع گوارشی و کل غذای خورده شده موثر هستند. تحریک ترشحات گوارشی شامل بزاق دهان، آنزیم‌های گوارشی، صفرا و موکوس را شامل می‌شود که به‌عنوان یک عمل مهم افزودنی‌های غذایی به‌حساب می‌آید. از جهت دیگر بوی عناصر غذایی رشد را افزایش می‌دهد و به‌عنوان مکمل غذایی برای تغذیه بیشتر ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (صارمی و همکاران، ۱۳۹۷؛ نصرتی موفق و همکاران، نتایج حاصل از این (Syahidah et al., 2015; ۱۳۹۸ تحقیق نشان داد که استفاده از عصاره خارخاسک در جیره غذایی ماهی کفال خاکستری منجر به افزایش معنی دار فعالیت آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در مقایسه با شاهد شد و بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و امیلاز در تیمار حاوی ۱/۵ گرم عصاره خارخاسک بر کیلوگرم غذا مشاهده شد و بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز در تیمار حاوی ۱ و ۱/۵ گرم عصاره خارخاسک بر کیلوگرم غذا مشاهده شد. دلیل

آن را می‌توان وجود ترکیب‌های طبیعی از جمله، آلکالوئیدها، تریپنوئیدها، ساپوین‌ها و فلاونوئیدها دانست که محرک گوارش و افزایش وزن بوده و به عنوان تحریک کننده ایمنی شناخته شده‌اند (Fereidouni و Harikrishnan *et al.*, 2010).
Allium همکاران (۲۰۱۵) با بررسی اثر عصاره سیر (بر نرخ بقا و پارامترهای بیوشیمیایی و *sativum L.*) آنزیم‌های گوارشی لارو ماهی کفال خاکستری نشان دادند بیشترین میزان سطوح آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پروتئاز مربوط به جیره حاوی ۳ درصد عصاره سیر بود که اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و سایر تیمارهای آزمایشی داشت. همچنین نگهداری جعفر بیگی (۱۳۹۴) گزارش کرد که استفاده از ۲۰ گرم بر کیلو گرم پودر زنجبیل و رازیانه در جیره غذایی ماهی کفال خاکستری منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های گوارشی شد که با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی داشتند. هم‌چنین ثابت شده است که عصاره‌های گیاهان دارویی، ادویه‌های مختلف و ترکیباتی نظیر نوکلئوتیدها، با تاثیر بر میکروفلور روده و هم‌چنین تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی باعث افزایش هضم و جذب پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و Lee *et al.*, 2012; Tahmasebi چربی‌ها می‌شوند (Khoyani *et al.*, 2008).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از سطوح مختلف عصاره خارخاسک منجر به کاهش معنی‌دار میزان گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید شد. به‌طوری‌که کمترین میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید در تیمار حاوی ۱ و ۱/۵ گرم عصاره خارخاسک بر کیلو گرم غذا و کمترین میزان گلوکز در تیمار حاوی ۱/۵ گرم عصاره خارخاسک بر کیلو گرم غذا مشاهده

شد. Gültepe و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که استفاده از سطوح مختلف عصاره خارخاسک (۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم غذا) منجر به افزایش معنی‌دار گلوکز و کاهش معنی‌دار کلسترول در ماهی تیلاپای نیل شد همچنین بر میزان تری‌گلیسیرید سرم خون تیلاپای نیل تاثیر معنی‌داری نداشت که تنها از نظر میزان کلسترول با تحقیق حاضر هم‌خوانی داشت. دلیل عدم مشابهت در نتایج مربوط به گلوکز و تری-گلیسیرید را می‌توان به گونه‌ماهی، کیفیت آب، شرایط پرورش، نوع و مقدار ترکیبات زیست فعال گیاه دارویی مختلف نسبت داد (Akrami *et al.*, 2015).
 می‌توان گفت که دلیل افزایش سطح گلوکز خون یا هیپرگلیسمی نشان دهنده بروز اختلال در روند متابولیسم کربوهیدرات است که منجر به افزایش تجزیه گلیکوژن کبد و در نهایت افزایش گلوکز خون می-گردد (Banaee *et al.*, 2011) و همکاران (۲۰۰۶) و Lambo و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که با بررسی اثر عصاره خارخاسک در درمان بیماری دیابت موش نشان دادند که عصاره مذکور منجر به کاهش معنی‌دار گلوکز، تری‌گلیسیرید و کلسترول سرم خون و افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز شد و در نهایت در مهار گلیکوژنزیز نقش داشت. هم‌چنین استفاده از عصاره خار مریم (*Silybum marianum*) منجر به کاهش معنی‌دار میزان گلوکز در سرم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) شد (Banaee *et al.*, 2011) که با تحقیق حاضر هم‌خوانی داشتند. می‌توان گفت که حضور ترکیبات فنلی در عصاره گیاه مذکور از سنتز اسیدهای چرب جلوگیری نموده و منجر به افزایش لیپاز لیپوپروتئین در عضله شده و فعالیت آن در

بافت چربی کاهش یافته لذا تری گلیسیرید سرم خون به منظور تولید انرژی در عضله مصرف شده و در بافت چربی ذخیره نمی گردد (Khan et al., 2011). همچنین ساپونین موجود در عصاره خارخاسک دارای خاصیت هیپو گلیسمی می باشد و با سنتز گلیکوژن و سلامت کبد در ارتباط است (Ji et al., 2007).

پروتئین تام، گلوبولین و آلبومین سرم خون شاخص مهمی در کنترل و نظارت بر دوره بیماری، اختلالات سیستم ایمنی، اختلال در عملکرد کبد و اختلالات عملکرد کلیه می باشد (Nafisi Bahabadi et al., 2014). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از سطوح مختلف عصاره خارخاسک منجر به افزایش معنی دار میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین سرم خون ماهی در مقایسه با گروه شاهد شد. بیشترین میزان گلوبولین و پروتئین تام سرم خون در تیمار حاوی ۱/۵ گرم عصاره خارخاسک بر کیلو گرم غذا و بیشترین میزان آلبومین در تیمار حاوی ۱/۵ گرم عصاره خارخاسک بر کیلو گرم غذا مشاهده شد. می توان گفت افزایش میزان آلبومین سرم خون با عصاره مذکور می تواند منجر به بهبود روند توزیع ترکیبات موثر این عصاره در خون گردد و افزایش گلوبولین سرم خون منجر به افزایش سطح گلوبولین های حامل (نوع آلفا و بتا) و گاما گلوبولین ایمنی در سرم خون ماهی گردد (Banaee et al., 2011). Gültepe و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که استفاده از سطوح مختلف عصاره خارخاسک (۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم غذا) منجر به افزایش معنی دار سطح گلوبولین در ماهی تیلاپای نیل شد و روی میزان آلبومین و پروتئین تام سرم خون ماهی تاثیر معنی داری نداشت که به استثنای گلوبولین، از نظر میزان آلبومین و پروتئین تام با تحقیق

حاضر هم خوانی نداشت. دلیل مغایرت در نتایج، می تواند مربوط به گونه ماهی، غلظت عصاره گیاهی و نوع عصاره مورد استفاده باشد (Dadras et al., 2016). در حالی که استفاده از عصاره خار مریم (Banaee et al., 2011) و عصاره سرخارگل (*Echinacea purpurea*) (Oskoi et al., 2012) در جیره غذایی ماهی قزل آلا رنگین کمان منجر به افزایش معنی دار میزان گلوبولین، آلبومین و پروتئین تام سرم خون ماهی قزل آلا رنگین کمان شد که با نتایج تحقیق حاضر، هم خوانی داشتند.

در کل نتایج حاصل از این تحقیق، نشان داد که با توجه به بررسی فعالیت آنزیم های کبد و گوارشی و فراسنجه های بیوشیمیایی به نظر می رسد که سطح موثر عصاره گیاه خارخاسک در جیره غذایی ماهی کفال خاکستری، ۱/۵ گرم عصاره گیاه خارخاسک بر کیلو گرم غذا می باشد که می توان به منظور بهبود عملکرد هضم مواد غذایی، سلامت کبد و تقویت سیستم ایمنی ماهی کفال خاکستری در جیره غذایی به کار برد.

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 تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

- ۱- صارمی، ن.، موسوی، س. م.، ذاکری، م.، زنگویی، ن.، شهریاری، ع.، ۱۳۹۷. اثرات عصاره الکلی زیره

- 7- Bucci, L. R., 2000. Selected herbals and human exercise performance. The American Journal of Clinical Nutrition, 72(2), 624-636.
 - 8- Burtis, C. A., Ashwood, E. R. 1994. Tietz Textbook of Clinical Chemistry (5th ed.). Philadelphia. USA; W.B. Saunders Company: P. 560-568.
 - 9- Chhatre, S., Nesari, T., Somani, G., Kanchan, D., Sathaye, S., 2014. Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. Pharmacognosy Reviews, 8(15), 45-52.
 - 10- Chong, A.S.C., Hashim, R. M., Chow-Tang, L., Ali, A. B., 2002. Partial characterization and activities of protease from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). Aquaculture, 203 (3-4); 321-331.
 - 11- Citarasu, T., 2010. Herbal biomedicines a new opportunity for aquaculture industry. Aquaculture International, 18(3), 403-414.
 - 12- Dadras, H., Hayatbakhsh, M.R., Shelton, W.L., 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, 59, 109-114.
 - 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 and Shellfish Immunology, 23(2), 249-259.
 - 14- Fereidouni, M. S., Akbary, P., Soltanian, S., 2015. Survival rate and biochemical parameters in *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) larvae fed garlic (*Allium sativum* L.) extract. American Journal of Molecular Biology, 5; 7-15.
 - 15- Furne, M., Hidalgo, M.C., López, A., García-Gallego, M., Morales, A.E., Domenzain, A., Domezain, J., Sanz, A., 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. Aquaculture, 250(1-2), 391-398.
- سبز بر آنزیم‌های گوارشی و برخی پارامترهای سرمی ماهی انگشت قد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۲(۴)، ۵۱-۶۹.
- ۲- نصرتی موفق، ا.، امیر کلایی، ع.ک.، اورجی، ح.، ۱۳۹۸. اثر تغذیه با ریز جلبک اسپیرولینا بر رشد، بازماندگی، کارایی، رنگ‌پذیری و هضم‌پذیری رنگدانه در ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*). نشریه توسعه آبزی‌پروری، ۱۳(۳)، ۱۱۹-۱۳۳.
- ۳- نگهداری جعفر بیگی، ی.، ۱۳۹۴. عنوان اثر سطوح مختلف بیوهربال (زنجبیل *Zingiber officinale* Roscoe, 1807 و رازیانه *Foeniculum vulgare* Mill) روی شاخص‌های رشد، ترکیبات شیمیایی لاشه و آنزیم‌های گوارشی در ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758). پایان نامه کارشناسی ارشد گروه شیلات دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار. ۶۰ صفحه.
- 4- Akramia, R., Gharaeib, A., Razeghi Mansour, M., Galeshi, A., 2015. Effects of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innate immune response and hematocrit biochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754) juvenile. Fish and Shellfish Immunology, 45 (2), 828-834.
 - 5- Amin, A., Lotfy, M., Shafiullah, M., Adeghate, E., 2006. The protective effect of *Tribulus terrestris* in diabetes, Annals of the New York Academy of Sciences New York Academy of Sciences. 1084, 391-401.
 - 6- 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.

- enzymology. 2nd ed, London:the University of Michigan press;. P. 250-286
- 25- Kumar, S., Sahu, N. P., Pal, A. K., Choudhury, D., Yengkokpam, S., Mukherjee, S. C., 2005. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *Labeo rohita* juveniles. Fish and Shellfish Immunology, 19(4), 331 -344.
 - 26- Lamba, H.S., Bhargava, C.H., Thakur, M., Bhargava, S., 2011. α - glucosidase and aldose reductase inhibitory activity in vitro and antidiabetic activity in vivo of *Tribulus terrestris*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 3,270-272.
 - 27- Lee, D.H., Ra, C.S., Song, Y.H., Sung, K.I., Kim, J.D., 2012. Effects of dietary garlic extract on growth, feed utilization and whole body composition of juvenile starlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*). Asian Australian Journal of Animal Science, 25, 577-583.
 - 28- Liu, F., Shi, H., Guo, Q., Yu, Y., Wang, A., Lv, F., 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, 51; 125-135.
 - 29- 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.
 - 30- Natalia, Y., Hashim, R., Ali, A., Chong, A., 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). Aquaculture, 233(1-4); 305–320.
 - 31- Oskoi, S.B., Kohyani, A.T., Parseh, A., Salati, A. P., Sadeghi, E., 2012. Effects of dietary administration of *Echinacea purpurea* on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Fish Physiology and Biochemistry, 38(4), 1029 -1034.
 - 16- Gawlicka, A., Parrent, B., Horn, M.H., Ross, N., Opstad, I., Torrissen, O.J., 2000. Activity of digestive enzyme in yolk- sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) indication of readiness for first feeding. Aquaculture, 184 (1-2), 304-314.
 - 17- Ghosal, I., Mukherjee, D., Hancz, C., Bhusan, S., 2015. Efficacy of *Basella alba* and *Tribulus terrestris* extracts for production of monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 5 (8), 152-158.
 - 18- Gültepe, N., Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., Yıldırım, Ö., Türker, A., 2014. Effects of dietary *Tribulus terrestris* extract supplementation on growth, feed utilization, hematological, immunological, and biochemical variables of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgah. 66, 1-8.
 - 19- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2010. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. Fish & shellfish immunology, 28(2), 354-361.
 - 20- Hosseini S.M., Shalae, M., 2013. Effect of Milk thistle seed on yield and quality parameters in laying hens eggs, Journal of Animal and Poultry Research, 2(1), 31-39.
 - 21- Ji, S., Takaoka, O., Jeong, G., Lee, S., Ishumaru, K., Seoka, M., Takii, K., 2007. Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. Fishery Science, 73(1), 63-69.
 - 22- Kavitha, P., Ramesh, R., G.Bupesh, G., Stalin, A., Subramanian, P., 2011. Hepatoprotective activity of *Tribulus terrestris* extract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish (*Oreochromis mossambicus*)". In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal, 47, 698-706.
 - 23- Khan, S., Kabir, H., Jalees, F., Asif, M., Naquvi, K.J., 2011. Antihyperlipidemic potential of fruits of *Tribulus terrestris* linn. International Journal of Biomedical Research, 2, 98-101.
 - 24- King, J., 1972. Practical clinical

- S., Nematollahi, A., Mahmoudi, N., Pasha-Zanoosi, H., 2008. Effects of dietary nucleotide on growth indices and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Marian Science and Technology, 1, 45-54.
- 39- Talpur, A.D., 2014. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture, (420-421), 71-78.
- 40- Trinder, P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor Annual Clinical Biochemistry, 6, 24-27.
- 41- Wegner, T., Fintelmann, V., 1999. Flavonoids and bioactivity. Wein. Med. Wochem. Sihr, 149, 241-247.
- 42- Wootton, L. I. 1962. Micro-analysis in medical biochemistry in micrometer, 4th.ed. London: Churchill press; P. 264-267.
- 43- Yeganeh, S., Sotoudeh, A., Nosrati, A., Movaffagh, A., 2017. Effects of *Tribulus Terrestris* extract on growth and reproductive performance of male convict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 17, 1003-1007.
- 32- Platel, K., Rao, A., Saraswahi, G., Srinivasan, K., 2002. Digestive stimulant action of three Indian spice mixes in experimental rats. Nahrung. 46(6), 394-398.
- 33- Rao, Y.V., Das, B.K., Jyotirmayee, P., Chakrabarti, R., 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology, 20(3), 263-273.
- 34- Şahin, A., Duru, M., 2010. Effects of *Tribulus terrestris* (Puncture vine) supplementation on performance and digestive system of broiler chicks. Journal of Agricultural Sciences, 16, 271-277.
- 35- Sahoo, P.K., Mohanty, J., Mukherjee, S.C., 1999. The three immunomodulators on haematological parameters and immunity level in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings. Journal of Aquaculture Tropics, 14; 127-135.
- 36- Sivaram, V., Babu, M.M., Citarasu, T., Immanuel, G., Murugadass, S., Marian, M.P., 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. Aquaculture, 237(1-4), 9-20.
- 37- Syahidah, A., Saad, C.R., Daud, H.M., Abdelhadi, Y.M., 2015. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 14(1), 27-44.
- 38- Tahmasebi-Kohyani, A., Keyvanshokoo, H., 2015. Effect of *Tribulus terrestris* extract on growth and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Vibrio* spp. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 14(1), 27-44.