

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

- ضحا هاشمی کاوردی: گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، صندوق پستی: 1616
- اکرم تهرانی فرد*: گروه بیولوژی دریا، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، صندوق پستی: 1616
- عباسعلی زمینی: گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، صندوق پستی: 1616

تاریخ دریافت: دی 1394 تاریخ پذیرش: فروردین 1395

چکیده

استفاده از گیاهان دارویی به عنوان ترکیبات محرک و تقویت کننده سیستم ایمنی ماهی‌ها در طی سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین در این پژوهش تاثیر عملکرد پودر بذر گیاه خار مریم (*Silybum marium*) بر فاکتورهای بیوشیمیایی و سیستم ایمنی خون بچه ماهی سیم (*Abramis braba orientalis*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در سال 1393، آزمایشی بر روی بچه ماهیان سیم (با وزن اولیه 10-12 گرمی)، به مدت 60 روز با به کارگیری 3 مقدار مختلف عصاره خار مریم 200، 400، 800 میلی گرم در 4 تیمار با 3 تکرار و یک تیمار به عنوان گروه شاهد (فاقد جیره محتوی عصاره خارمریم)، صورت پذیرفت. برای آزمون فرضیه‌ها از روش تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. نتایج نشان داد، عصاره خارمریم، با افزایش غلظت گلبول‌های سفید، هماتوکریت، نوتروفیل و مونوسیت، لیزوزیم و ایمونوگلوبین و همچنین کاهش آلکالین فسفاتاز، آسپرات آمینو ترانسفراز، پلاسما آلانین آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز در گروه‌های تیمار شده در 400 و 800 میلی گرم نسبت به گروه شاهد، می‌تواند موجب تقویت سیستم ایمنی ماهی سیم گردد ($p < 0/05$). همچنین با توجه به برتری تیمار 800 میلی گرمی، نسبت به سایر تیمارها، استفاده از مقدار مذکور در جیره غذایی آبزیان به منظور افزایش ایمنی ماهی سیم توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: *Silybum marium*، *Abramis braba orientalis*، فاکتورخونی، سیستم ایمنی.

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 تقویت کننده سیستم ایمنی تمایل نشان می‌دهند. با توجه به تکامل بیش‌تر ایمنی غیر اختصاصی ماهی نسبت به ایمنی اختصاصی و جایگاه ویژه محرک‌های ایمنی در تحریک ایمنی غیر اختصاصی، استفاده از محرک‌های ایمنی در آبزیان ارجحیت بیش‌تری نسبت به حیوانات خونگرم دارد به همین 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 رود، گرانی و مشکلات اجرایی تجویز باعث گرایش بیش‌تر به استفاده از محرک‌های ایمنی به‌عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها شده است (Iwama و Nakanishi، 1996). 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، 1382). به‌عنوان مثال، جعفریان و همکاران (1381) نشان دادند که استفاده از عصاره



ونیرو در ابعاد $2 \times 2 \times 0.5$ متر مکعب مهیا شده و در هر ونیرو 50 عدد ماهی با اوزان 10-12 گرمی معرفی گردید. از 4 تیمار مذکور، یک تیمار به عنوان شاهد در نظر گرفته شده که انحصاراً خوراک SFK¹ به بچه ماهی خورانده شده و 3 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 به صورت تازه و به صورت هفتگی و با افزودن مکمل سیلی مارین به نسبت 200، 400 و 800 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم غذا با پودر تجاری و تهیه مجدد پلت غذایی انجام گردید (Chen و همکاران، 2003). بدین منظور، پودر خالص سیلی مارین از شرکت زربند یاسوج تهیه گردید. برای تهیه خوراک حاوی سیلی مارین 300 گرم خوراک مخصوص ماهی سیم بر روی یک سینی گسترانیده شد. میزان 1 گرم پودر سیلی مارین (غلظت نهایی 0/5 درصد) با 100 میلی لیتر آب مخلوط و توسط اسپری روی خوراک پاشیده شد. این عمل بعد از به هم زدن خوراک چندین بار تکرار شد. برای حفظ بهتر سیلی مارین در خوراک در هنگام تغذیه ماهی، میزان 1 درصد محلول ژلاتین به همان روش روی خوراک اسپری گردید. سپس به مدت 4 ساعت خوراک در 40 درجه سانتی گراد قرار داده شد، تا کاملاً خشک گردد. بعد از خشک شدن خوراک، در کیسه های نایلونی مشکی بسته بندی شده، لیبل گذاری و تا زمان استفاده در یخچال 4 درجه سانتی گراد نگهداری گردید. خوراک شاهد نیز به همین روش ولی با آب فاقد سیلی مارین تیمار گردید.

نمونه گیری و آزمایش: پس از شروع آزمایش، به طور تصادفی از هر ونیرو 3 ماهی و در مجموع از هر تیمار 9 ماهی در روزهای 14 و 28 صید و پس از بی هوش کردن ماهی با عصاره پودر گل میخک (1:5000)، از ساقه دمی آنها با استفاده از سرنگ آغشته به EDTA خون گیری گردید. برای اندازه گیری فاکتورهای خونی از روش ذیل استفاده گردید. گلبول های سفید و قرمز با محلول Lewis و لام نوبار شمارش شده است. هموگلوبین (Hb) با واحد گرم در دسی لیتر با استفاده از محلول دریاکلین (سیانومت هموگلوبین) در طول موج 540 نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد، اندازه گیری شده است. هماتوکریت با سانتریفیوژ Nuve در دوره 14000 rpm اندازه گیری شده است. اندیس گلبولی یعنی حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین گلبولی (MCHC) با استفاده از فرمول های استاندارد موجود محاسبه گردید.

تعداد گلبول های قرمز/10×هماتوکریت(درصد)=MCV

گیاه دارویی گل ارونه در جیره غذایی جانوران آزمایشگاهی می تواند موجب تقویت سیستم ایمنی سلولی و همورال گردد. مصرف گیاه دارویی برای درمان و مقابله با عفونت های ویروسی (طاهرزاده و همکاران، 1387؛ رضوی و همکاران، 1385)، باکتریایی (Elgayyar و همکاران، 2001)، قارچی (Gvindachari، 2000) و حتی پیشگیری از شیوع انگل های تک یاخته (مناففر و همکاران، 1385)، 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 marianum* و نام انگلیسی Milk thistle که از 2000 سال پیش به دلیل خواص درمانی خاص مورد توجه انسان بوده است. در میوه های خارمریم فلاونوئیدهای مختلفی ساخته و ذخیره می شود که مقدار آنها متفاوت و به شرایط اقلیمی محل رویش و نوع گیاه بستگی دارد (David و همکاران، 2001). به مجموع این فلاونوئیدها سیلی مارین گفته می شود. گیاه سیلی مارین خود مجموعه ای از مواد شامل silybin، silychristin و silydianin می باشد. سیلی مارین فیتوزوم های موجود در بذر گیاه خارمریم از طریق اثر بر فعالیت های مربوط به هسته سلول و تأثیر بر میکروزوم سلولی کبدی، می تواند رادیکال های آزاد ناشی از مصرف سموم قارچی را کاهش و فعالیت سلولی جهت سنتز پروتئین را افزایش دهند. این فیتوزوم ها علاوه بر تثبیت غشاء با حذف نمودن رادیکال های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، موجب اعمال این نقش حفاظتی می شوند (احمدی و همکاران، 1389). مهم ترین کاربرد تایید شده این گیاه استفاده از آن در درمان مسمومیت های کبدی و ترمیم سلول های آسیب دیده کبدی اظهار کرد. با توجه به گستره آسیب های اقتصادی و بهداشتی ناشی از مسمومیت ها و بیماری های متفاوت در ارتباط با جامعه انسانی و صنعت آبی پروری که در ایران نیز از اهمیت ویژه ای برخوردار است، می توان این ماده را به عنوان کنترل کننده این موارد معرفی نمود (احمدی و همکاران، 1389). هدف از این مطالعه و بررسی تأثیر عصاره گیاه خار مریم بر سیستم ایمنی ماهی سیم (*Abramis brama orientalis*) به دلیل در حال انقراض بودن این ماهی بوده است.

مواد و روش ها

این آزمایش در مهرماه 1393، در قالب طرح کاملاً تصادفی با 4 تیمار که هر تیمار دارای 3 تکرار بوده و در مدت زمان 2 ماه به اجرا درآمد. بدین منظور تعداد 600 قطعه بچه ماهی 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 12 عدد

1: یک نام تجاری غذای ماهی است که دارای رطوبت 8.7% و خاکستر 11.2% و چربی 10.5% می باشد

نتایج

فاکتورهای خونی: نتایج آزمایشات خون شناسایی نمونه‌های اخذ شده از تیمارهای مختلف در جدول 1 آورده شده است. نتایج نشان داد که هموگلوبین و تعداد گلبول قرمز، آنتی بادی هیپاتیت، 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 800 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 14 و 28 پس از شروع آزمایش در ماهی تحت تیمار در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود ($p < 0/05$). با توجه به جدول 2 میزان ایمنوگلوبین و لیزوزیم در تیمار 800 و 400 میلی‌گرمی بالاتر از سایر تیمارها بود (شکل 1).

تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب) / $10 \times$ هموگلوبین (گرم در دسی لیتر) $MCH =$ هماتوکریت (درصد) / $10 \times$ هموگلوبین (گرم در دسی لیتر) = $MCHC$
آنزیم ALT، AST، با کیت زیست‌شیمی و آنزیم ALP با کیت پارس آزمون روش فتومتریک با واحد بین‌المللی (IU) 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 (2001) بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لیزوزیم *Micrococcus lysodeikticus* اندازه‌گیری شده است (Zandeki و همکاران، 2007). میزان ایمنوگلوبین بر اساس روش Siwici و Andevson (1993) اندازه‌گیری شده است.

آزمون آماری: به‌منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Kolmogorov-smirnov استفاده شد. در صورت 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 2 گروه (مقایسه بین مراحل 1 و 2 فاکتورهای خون) از آزمون Independent Samples T-Test استفاده شده است.

جدول 1: مقایسه شاخص‌های خونی (میانگین $\pm$ انحراف معیار) بین تیمارهای مختلف

تیمار 4 (800 میلی‌گرم)	تیمار 3 (400 میلی‌گرم)	تیمار 2 (200 میلی‌گرم)	تیمار شاهد	تیمار فاکتور
7500 $\pm$ 45/9 ^b	8000 $\pm$ 141/2 ^c	7100 $\pm$ 7071 ^b	4700 $\pm$ 577/35 ^a	گلبول سفید $10^3 \times$ میلی‌متر مکعب
998000 $\pm$ 3535 ^a	955000 $\pm$ 3535 ^a	875000 $\pm$ 3535 ^a	898000 $\pm$ 2121/32 ^a	گلبول قرمز $106 \times$ میلی‌متر مکعب
6 $\pm$ 0/14 ^a	5/5 $\pm$ 0/13 ^a	5 $\pm$ 0/14 ^a	5/2 $\pm$ 0/11 ^a	هموگلوبین خون (گرم / دسی‌لیتر)
28 $\pm$ 0/7 ^d	27 $\pm$ 0/7 ^c	23 $\pm$ 0/6 ^a	25 $\pm$ 0/5 ^b	هماتوکریت (%)
280 $\pm$ 13/62 ^a	282 $\pm$ 13/73 ^a	267 $\pm$ 8/11 ^a	278 $\pm$ 0/23 ^a	آنتی بادی هیپاتیت IU / لیتر
60/1 $\pm$ 3/94 ^b	57 $\pm$ 2/74 ^a	57/1 $\pm$ 1/55 ^a	58/3 $\pm$ 1/15 ^a	متوسط هموگلوبین fL
23/5 $\pm$ 0/30 ^a	23/40 $\pm$ 0/8 ^a	23/23 $\pm$ 1/13 ^a	23/3 $\pm$ 0/52 ^a	متوسط هموگلوبین در سلول قرمز (گرم/دسی-لیتر)
29/5 $\pm$ 0/7 ^d	26/5 $\pm$ 0/7 ^b	28 $\pm$ 0/7 ^c	22 $\pm$ 0/7 ^a	نوتروفیل (%)
66 $\pm$ 0/85 ^a	69/23 $\pm$ 0/51 ^b	69/33 $\pm$ 0/63 ^b	73/33 $\pm$ 0/33 ^c	لنفوسیت (%)
4 $\pm$ 0/67 ^b	5 $\pm$ 0/67 ^c	3 $\pm$ 0/66 ^a	4 $\pm$ 0/67 ^b	مونوسیت (%)
1 $\pm$ 0 ^a	1/5 $\pm$ 0/33 ^a	1/5 $\pm$ 0/33 ^a	1 $\pm$ 0 ^a	ائوزینوفیل (%)

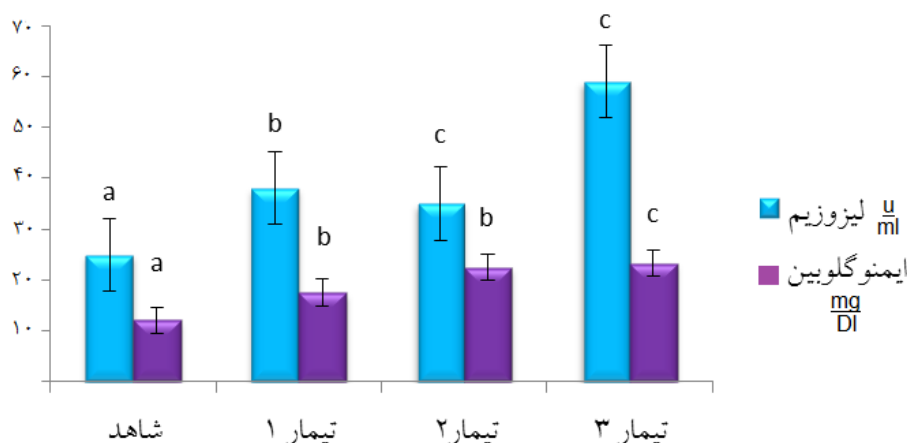
*حروف غیر هم‌نام کوچک در ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد.

جدول 2: مقایسه میزان شاخص‌های ایمنی در شاهد و تیمارهای مختلف

شاخص	شاهد	تیمار 1 (200 میلی‌گرم)	تیمار 2 (400 میلی‌گرم)	تیمار 3 (800 میلی‌گرم)
ایمنوگلوبین (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	12/05 $\pm$ 0/44 ^a	17/5 $\pm$ 0/27 ^b	22/5 $\pm$ 0/28 ^c	23/3 $\pm$ 0/39 ^c
لیزوزیم (واحد/میلی‌لیتر)	25 $\pm$ 0/44 ^a	38 $\pm$ 0/27 ^b	35 $\pm$ 0/28 ^b	59 $\pm$ 0/39 ^c



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



شکل 1: نمودار مقایسه میزان ایمنوگلوبین و لیزوزیم در شاهد و تیمارهای مختلف

نیز کاهش یافته است به‌طوری‌که تیمار 800 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.

پارامترهای آنزیمی: با توجه به جدول 3، 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 ($p>0/05$). از طرفی با افزایش عصاره خارمریم در جیره، میزان آنزیم AST در تیمارها،

جدول 3: مقایسه میزان پارامترهای آنزیمی در شاهد و تیمارهای مختلف.

شاخص	شاهد	تیمار 1 (200 میلی‌گرم)	تیمار 2 (400 میلی‌گرم)	تیمار 3 (800 میلی‌گرم)
آلکالین فسفاتاز (ALP) (واحد/لیتر)	65/35±0/44 ^a	59±0/27 ^a	60/23±0/28 ^a	59/42±0/39 ^a
آسپرئات آمینو ترانسفراز (AST) (واحد/لیتر)	89/02±0/18 ^d	73±0/27 ^c	65/23±0/28 ^b	59/11±0/39 ^a
پلاسما آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) (واحد/لیتر)	4±0/18 ^d	2±0/27 ^a	3±0/28 ^b	3±0/39 ^b
لاکتات دهیدروژناز (LDH) (گرم/مول)	1214±31/18 ^d	842±21/27 ^c	722±18/20 ^a	812±22/4 ^b

*حروف غیر همنام 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 غیر اختصاصی 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 به-عنوان نتایج موافق به تحقیق Harikrishnan و همکاران (2003)

در مورد تاثیر عصاره گیاه خار مریم *Silybum marianum* در ماهی کپور معمولی و مطالعه Harikrishnan (۲۰۰۹) در ماهی طلایی (*Carassius auratus*) به‌عنوان 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) در تاس-ماهی اشاره نمود. در تحقیقی که تاثیر عصاره گیاه مورخوش بر سیستم ایمنی ماهی پنگوسی مورد بررسی قرار گرفت، اختلاف

مریم تاثیر مفیدی بر افزایش گلبول قرمز و هموگلوبین و انوزینوفیل 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 (2004) 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 پروتئین-سازی، می‌تواند روند ترمیم و نوسازی بافت‌های آسیب دیده، هم-چون بافت کبد را تسریع نماید (Soto, 2004; Sonnenbichler و همکاران، 1984). هر گونه تغییری در فاکتورهای ایمنی خون، به‌عنوان یک شاخص بالینی در پایش سلامت سیستم ایمنی بدن جانوران مورد استفاده قرار گیرد (Jon, 2007).

وجود ترکیبات مختلف فنلی، تریپتوفیل و غیره در اسانس گیاهان دارویی خار مریم می‌تواند 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, 1994). در تحقیق حاضر، میزان ایمونوگلوبین خون ماهیان بین تیمارها و شاهد تفاوت معنی‌داری را نداشته است ($p < 0/05$). همچنین میزان ایمونوگلوبین، در شاهد و تیمار 200 میلی‌گرم نسبت به تیمارهای 400 و 800 میلی‌گرم از میزان کمتری برخوردار بوده، ولی بین تیمارهای 400 و 800 میلی‌گرم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). سطح لیپوزیم نیز، اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف آزمایشی نشان داده، و تجزیه و تحلیل حاصل از آزمون واریانس یک‌طرفه نشان داده، سطح لیپوزیم در تیمار 800 میلی‌گرم به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها بود. مقدار لیپوزیم 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 لیپوزیم‌ها در ماهی‌ها می‌تواند سبب افزایش مقاومت این جانداران در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و منفی گردد. لیپوزیم‌ها نقش opsonic دارند و سبب فعال شدن کمپلمان و فاگوسیتوز می‌شوند. لیپوزیم‌ها در بافت لنف، موکوس، پلاسما و یا سایر مایعات بدن ماهی‌ها وجود دارد (Saurabh و همکاران، 2008).

گزارشاتی از افزایش ایمونوگلوبین و لیپوزیم سرم به‌دنبال استفاده از محرک‌های ایمنی گیاهی وجود دارد (Vasudeva Rao

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 لیپوزیم 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 400 میلی‌گرم نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌داری را نشان داده است ($p < 0/05$). 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 ($p > 0/05$) از سوی دیگر، درصد هماتوکریت و متوسط هموگلوبین خون ماهیان بین تیمارها و شاهد در پایان آزمایش معنی‌دار بوده است ($p < 0/05$)، به‌طوری‌که غلظت هماتوکریت و متوسط هموگلوبین، در تیمار 800 میلی‌گرم نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود.

تعداد نوتروفیل، در تیمار 800 میلی‌گرم به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها به‌خصوص گروه شاهد بود ($p < 0/05$). مونوسیت خون ماهیان بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$). از طرفی میزان مونوسیت خون ماهیان در تیمار 400 میلی‌گرم نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی-داری را نشان داده است ($p < 0/05$). در صورتی‌که غلظت متغیر مذکور، در گروه 200 میلی‌گرم کمتر از سایر گروه‌ها بود.

علی‌شاهی و همکاران (1390) 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 (2005)، تجویز گلوکان LPS باکتری به ماهی کپور معمولی سبب افزایش گلبول‌های سفید خون می‌شود. همچنین Herikrishnan و همکاران (2003) نیز بیان نمودند، افزودن مکمل گیاهی به خوراک ماهی طلانی سبب افزایش غلظت گلبول‌های سفید خون می‌شود. طبق مطالعات انجام توسط مورکی و همکاران (1391)، 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 انوزینوفیل، 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، 1388). ولی مقدار غلظت‌های مذکور بیش‌تر از گروه شاهد مشاهده شد، با توجه به مطلب فوق، عصاره خار



عصاره‌ها بر میزان لیپوزیم 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 آسپارات آمینو ترانسفراز، در تیمارهای مرحله پایانی اختلاف معنی‌داری را نشان داده است و سطح AST در تیمار 800 میلی‌گرم، کمتر از سایر تیمارها مشاهده شد.

میزان پلازما آلانین آمینو ترانسفراز نیز اختلاف معنی‌داری را در تیمارهای مرحله نهایی نشان داده است ($p < 0/05$). میزان ALT در تیمار 400 و 800 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 400 و 800 میلی‌گرمی کمتر از سایر گروه‌ها بود ($p < 0/05$).

مدنی و همکاران (1385)، 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، واکتس‌های RNA و پروتئین‌های غشایی موجب آسیب سلول می‌شوند.

Pyo و همکاران (2004) 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 (1389)، بیان نمودند سیلی مارین با تثبیت ساختار غشای سلولی سطح فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات آمینو ترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز تنظیم می‌کند.

Ramadan و همکاران (2002) گزارش نمودند، آنزیم‌های آسپاراتات آمینو ترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز توسط سلول‌های پوششی مجرای کیسه صفرا تولید می‌شود و در اختلالات کبدی و انسداد مجرای صفرا، سطح آن‌ها به‌طور ناگهانی در پلازما افزایش می‌یابد. در نتیجه استفاده از این مشتق گیاهی به‌علت داشتن خصوصیات 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 آسپاراتات آمینو ترانسفراز AST، پلازما آلانین آمینو ترانسفراز ALT، کلسترول، تری‌گلیسرید، کلسم، فسفر و لاکتات دهیدروژناز LDH، اسیداوریک و آلکالین فسفاتاز 13 در سرم خون بیماران

و همکاران، 2004). عالیشاهی و همکاران (1390)، گزارش کردند، میزان لیپوزیم و ایمونوگلوبین خون ماهی کپور بین تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داده است. نجف‌پورمقدم و همکاران (1392)، در بررسی‌های خود در ماهی استرلیاد به این نتیجه رسیدند که فعالیت لیپوزیم سرم، میزان پروتئین کل، میزان ایمونوگلوبین سرم، آلبومین، تحت تأثیر تجویز عصاره سرخارگل، به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از شاهد بوده است ($p > 0/05$)، همچنین بیان شده، تیمار 2 گرمی برتری بیش‌تری نسبت به تیمار 1 و 1/5 گرمی داشته است.

در مطالعات دیگری نیز از گیاهان در تغذیه ماهی استفاده شده است، از جمله Pratheepa و همکاران (2010) در بررسی تأثیر عصاره برگ گیاه (*Aegle marmelos*) بر روی ماهی کپور معمولی، سوداگر و حاجی‌بیگل (1389) در بررسی تأثیر عصاره 11 گیاه دارویی مختلف روی پاسخ ایمنی غیر اختصاصی و مقاومت نسبت به باکتری *Aeromonas hydrophila* در ماهی کپور معمولی، Austin (2009) در بررسی تأثیر پودر گیاه زنجبیل بر سیستم ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان، Rao و همکاران (2006) در بررسی تأثیر دانه گیاه (*Achyranthes aspera*) بر روی ماهی *Labeo rohita*، Chen و همکاران (2003) در بررسی تأثیر 4 گیاه چینی (*heum officinale*, *andrographis paniculata*, *Isatis indigotica*, *Lonicera japonica*) در کپور معمولی نشان دادند که در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره گیاهان مذکور میزان لیپوزیم سرم در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافته است. Kumar (2006) اثر دانه‌های زیره سیاه *Nigella sativa* بر پاسخ ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین 34 گرمی بررسی کردند که میزان پروتئین کل سرم و سطح ایمونوگلوبولین کل در گروه‌های مورد آزمایش به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه شاهد بود. ولی‌پور و همکاران (1392) گزارش نمودند، عصاره الکی بره موم زنبور عسل تأثیر مثبتی در میزان لیپوزیم و ایمونوگلوبین ماهی کپور معمولی داشته است.

ایمونوگلوبولین‌ها 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, 1991). ایمونوگلوبولین‌ها 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 گلوبول‌های سفید، باعث انتشار لیپوزیم و ایمونوگلوبین 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، 1387).

البته برخی از گزارشات نیز علی‌رغم ویژگی‌های تحریک ایمنی در برخی فرآورده‌های گیاهی، عدم تأثیر معنی‌دار این

- ماهی استرلیاد. هشتمین همایش دامپزشکان علوم بالینی ایران. دانشگاه شیراز.
5. رضایی پور، ر.؛ کمالی نژاد، م.؛ کاظمی فروز، ف. و فدایی، ش.، 1382. بررسی اثرات چهار گیاه دارویی بر سیستم ایمنی سلولی. مجله علوم پزشکی، سال 1. شماره 2، صفحات 78 تا 73.
 6. رضایی، م.؛ سوری نژاد، ا.؛ سلطانیان، س. و یوسفزادی، م.، 1392. تاثیر عصاره گیاه مورخوش در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و ایمنی‌شناسی گربه ماهی. مجله بوم‌شناسی آبزیان سال 3، شماره 8، صفحات 1 تا 19.
 7. مدنی، ح.؛ عسگری، ص.؛ نادری، غ. و طالب‌الحسینی، م.، 1385. اثر حفاظتی کبدی عصاره پلی فنلی خارمریم *Silybum marianum* و همیشه بهار *Callendula officinalis* در موش صحرایی. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد 19، شماره 2، صفحات 157 تا 163.
 8. مناف فر، ر.؛ ملکی، ر.؛ آتشبار، ب. و آق، ن.، 1385. استفاده از عصاره دانه گیاه *Azadirachta indica* علیه مژکداران تک سلولی مهاجم در محیط پرورش متراکم جلبک تک سلولی *tertiolecta Dunaliella*. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. شماره 71، صفحات 92 تا 88.
 9. Ahmad, A.; Pillai, K.K.; Najmi, A.K. and Pal, S.N., 2002. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. J. Ethnopharmacology. Vol. 79, pp: 35-41.
 10. Alishahi, M.; Ranjbar, M.M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R.; Mesbah, M. and Razi jalali, M., 2010. Effects of dietary Aloe vera on specific and nonspecific immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*), J. Vet. Res. Vol. 4, pp: 85-91.
 11. David, J.; C, M.; Jaree, P.; James, H.L.; Somkiat, K.; Kim, D.T. and Alexandra, A., 2001. Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. Aquaculture. Vol. 195, pp: 1-15.
 12. Dietzmann, J.; Thiel, U.; Ansoerge, S.; Neumann, K.H. and Tager, M., 2002. Thioliinducing and immunoregulatory effects of flavonoids in peripheral blood mononuclear cells from patients with end-stage diabetic nephropathy. Free Radic. Biol. Med. Vol. 33, pp: 1347-54.
 13. Chen, X.; Wu, Z.; Yin, J. and Li, L., 2003. Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus gibelio*. J. Fish Sci China. Vol. 10, pp: 36-40.
 14. Elgayyar, M.; Draughon, F.A.; Golden, D.A. and Mount, J.R., 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J. Food Prot. Vol. 64, pp: 1019-1024.
 15. Falah Hosseini, H.; Hemati, A.R. and Alavian, S.M., 2004. A Review of Herbal Medicine: *Silymarin marianum*. Journal of Medicinal Plants. Vol. 3, No. 11, pp: 14-24, (Persian language).
 16. Fanouraki, E.; Divanach, P. and Pavlidis, M., 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in

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، 1388). 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، 2002).

بنابراین عصاره خارمریم، با افزایش غلظت گلبول‌های سفید، همتوکریت، نوتروفیل و مونوسیت، لیزوزیم و ایموگلوبین و همچنین کاهش کاهش AST، ALP، LDH و ALT در گروه‌های تیمار شده در 400 و 800 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 و صنعت آبی‌پروری که در ایران نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، می‌توان این ماده را به‌عنوان کنترل‌کننده این موارد معرفی نمود.

منابع

1. احمدی، ک.؛ وثوقی، ع.؛ میرواقفی، ع.؛ عطایی‌مهر، ب. و بنایی، م.، 1389. تاثیر عصاره خوراکی خارمریم بر برخی فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله بیولوژی دریا. سال 2، شماره 7، صفحات 19 تا 26.
2. بنایی، م.؛ میرواقفی، ع.؛ رفیعی، غ.ر. و سوردآگومیل، آ.، 1389. تاثیر تجویز خوراکی سیلی مارین بر روی فاکتورهای بیوشیمیایی خون قزل‌آلای رنگین‌کمان. نشریه شیلات و مجله منابع طبیعی ایران. دوره 66، شماره 4، صفحات 271 تا 286.
3. مورکی، ن.؛ روزی، ی.؛ س.ج. ذریه زهرا. و ش، صافی، 1391. بررسی اثر کاربرد پودر دارچین بعنوان مکمل رشد در جیره غذایی ماهی گرین ترور (*Andinocara rivulatu*) بر شاخص‌های همتولوژی. اولین کنفرانس ملی راهکارهای دستیابی به توسعه پایدار. تهران، وزارت کشور، صفحات 8 تا 1.
4. نجف‌پورمقدم، م.؛ سلاطی، پ.؛ کیوان‌شکوه، س.؛ یآوری، و. و پاشایی‌زانوسی، ح.، 1393. تاثیر عصاره خوراکی گیاه دارویی سرخارگل بر برخی فاکتورهای ایمنی غیراختصاصی



28. Saurabh, S. and Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*. Vol. 39, pp: 222-239.
29. Selvaraj, V.; Sampath. K. and Sekar. V., 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*. Vol. 19, pp: 293-306.
30. Siwicki, A.K.; Anderson, D.P. and Rumsey, G.L., 1994. Dietary intake of Immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology Immunopathology*. Vol. 41, pp: 125-139.
31. Sonnenbichler, J.; Goldberg, M.; Hane, L.; Vogl, S. and Zetl, L., 1984. Stimulatory effect of silibinin on DNA synthesis in partially hepatectomized rat livers: Non-response Hepatoma an Other Malign Cell Lines. *Biochem. Pharmacol*. Vol. 35, pp: 538-541.
32. 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., 2004. *Silymarin* induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. *Life Sciences*. Vol. 75, pp: 2167-2180.
33. Stites, D.P., 1991. Basic and clinical immunology. Lange Medical Book. USA. Biomed. Pharmacother, chapter. Vol. 57, pp:145-55.
34. Tatina, M.; Bahmani, M.; Soltani, M.; Abtahi, B. and Gharibkhani, M., 2010. Effects of different levels of dietary Vitamins C and E on some of hematological and biochemical parameters of sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. Vol. 5, pp: 1-11.
35. Vasudeva Rao, Y.; Romesh. M.; Singh. And Chakrabarti, R., 2004. Potentiation of antibody production in Indian major carp *Labeo rohita*, rohu, by *Achyranthes aspera* as an herbal feed ingredient. *Aquaculture*. Vol. 238, pp: 67-73.
36. Watanuki, H.; Ota, K.; Malina, A.C.; Tassakka, A.R. and Kato, T., 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*. Vol. 258, pp: 157-163.
37. Zandecki, M. and Spurious, A., 2007. 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. 29, No. 1, pp: 21-41.
- sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture*. Vol. 265, pp: 294-304.
17. Gvindachari, T.R.; Suresh, G.; Gopalakrishnan, G.; Masilamani, S. and Banumathi, B., 2000. Ninomiya, Antifungal activity of some tetranortriterpenoids. *Fitoterapia*. Vol. 71, pp: 317-320.
18. Harikrishnan, R.; Nisha, M.R. and Balasundaram, C., 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*. Vol. 221, pp: 41-50.
19. Harikrishnan, R.; Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2009. Herbal supplementation diets effects on hematology and innate immunity in goldfish. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 28, pp: 211-225.
20. John, P.J., 2007. Alteration of Certain Blood Parameters of Freshwater Teleost *Mystus vittatus* after Chronic Exposure to Metasystox and Sevin. *Fish Physiology Biochemistry*. Vol.33, pp: 15-20.
21. Kumar jha, A.; Pal, A.K.; Sahu, N.P.; Kumar, S. and Mukherjee, S.C., 2007. Haemato-immunological responses to dietary Yeast RNA ω -3 fatty acid and Carotene in Catl catla Juvenils. *Fish Shell fish Immunol*. Vol. 23, pp: 917-918.
22. Iwama, G. and Nakanishi, T., 1996. The fish immune system. Academic Press, London. Chapter 3, innate Immunity in fish, pp: 73-114.
23. Misra, C.K.; Kuamr, D.B.; Mukherjee, S.C. and Pattnaik, P., 2006. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of Labeo rohito fingerlings. *Aquaculture*. Vol. 255, pp: 82-94.
24. Pyo, Y.H.; Lee, T.C.; Logendra, L. and Rosen, R.T., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chemistry*. Vol. 85, pp: 19-26.
25. Ramadan, L.A.; Roushy, H.M.; Abu Senna, G.; Amin, N.E. and El-deshw, O.A., 2002. Radioprotective effect of silymarin against radation inuced hepatotoxicity. *Pharmacological Research*. Vol. 45, No. 6, pp: 447-454.
26. Rao, Y.Y.; Das, B.K.; Iyotymayee, P. and Chakrabarti, R., 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 20, pp: 265-273.
27. Rehulka, J.; Minark, B.; Adamec, V. and Rehulka, E., 2005. Investigation of physiological and pathological levels of total plasma protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Res*. Vol. 36, pp: 22-32.

