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

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

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

گیاه سالیکورنیا (*Salicornia* sp.) یکی از گیاهانی است که جنبه‌های دارویی موثری برای آن قائل شده‌اند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره الکلی گیاه سالیکورنیا (*Salicornia* sp.) بر فعالیت آنزیم‌های کبدی (آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP)) و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و کاتالاز (CAT)) ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) به‌مدت ٦٠ روز می‌باشد. در این مطالعه، تعداد ٢٤٠ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/٤۳±۸/٤۲ گرم در یک طرح کاملاً تصادفی با ٤ تیمار آزمایشی و ۳ تکرار (با تعداد ۲۰ قطعه در هر تکرار) مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمار شاهد (بدون عصاره گیاه) و تیمارهای آزمایشی ۲، ۳ و ٤ به‌ترتیب دارای ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم عصاره گیاه در هر کیلوگرم عصاره گیاه در غذا بودند. در پایان آزمایش، بیش‌ترین شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی CAT، GPX و کم‌ترین شاخص آنتی اکسیدانیMDA و آنزیم‌هایALT، AST وALP در تیمار حاوی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره الکلی گیاه مشاهده شد که با تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). لذا با توجه به نتایج به‌دست آمده، به‌منظور کاهش اکسیداسیون لیپید و بهبود سلامت کبد، استفاده از عصاره عصاره الکلی گیاه سالیکورنیا به‌عنوان مکمل غذایی مهم برای ماهی کفال خاکستری توصیه می‌شود.

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

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: paria.akbary@gmail.com

مقدمه

توسعه آبزی‌پروری و افزایش تقاضا برای مصرف آبزیان، باعث افزایش تراکم پرورش در استخرها و در نتیجه افزایش استرس به آبزیان وهم‌چنین افزایش‌شیوع بیماری‌ها شده‌است(Byun و همکاران، ۲۰۱۰). استرس اکسیداتیو را به‌عنوان یک فعالیت اکسیداتیو یا تشکیل سریع فرم فعال اکسیژن (Reactive Oxygen species =ROS) می‌گویند که نقش مهمی در شیوع بسیاری از بیماری‌ها دارد. ROS یکی از انواع رادیکال‌های آزاد است که در شرایط نامتعادل واکنش‌های اکسیداسیون و احیای درون سلولی تولید می‌شود که قدرت اکسید کنندگی بالا و توانایی زیادی جهت آسیب زدن به اجزای حیاتی سلول از قبیل لیپیدها، DNA، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها دارند (Agarwal و Sekhon ، ۲۰۱۰). موجودات زنده سیستم آنتی‌اکسیدانی پیچیده‌ای جهت مقابله با گونه‌های فعال رادیکال‌های آزاد و کاهش مخرب آن‌ها دارند (Young و Woodside، ۲۰۰۱). سیستم آنتی‌اکسیدانی به‌صورت سیستم‌دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی عمل می‌کنند(Morales و همکاران، ۲۰۰۴). آنزیم‌ها دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) اشاره کرد که به‌همراه دیگر آنزیم‌ها مجموعه‌ای از دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی را تشکیل می‌دهند و نقش حذف رادیکال‌های آزاد را بر عهده دارند و به‌طورکلی تمامی عوامل آنتی‌اکسیدانی موجود در بدن موجود زنده چه آنزیم‌های درون سلولی و چه ترکیبات مغذی آنتی‌اکسیدانی(عوامل غیرآنزیمی) همگی تحت عنوان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل Total Antioxidant Capacity (TAC) نامیده می‌شوند (Agarwal و Sekhon، ۲۰۱۰). علی‌رغم وجود آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در بدن، سیستم دفاعی بدن به تنهایی قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در بدن نیست به‌همین جهت نیاز به تامین آنتی‌اکسیدان از منابع خارجی دارد که از طریق مواد غذایی تامین می‌شود (Young و Woodside، ۲۰۰۱). بسیاری از گیاهان با داشتن آنتی‌اکسیدان‌های فراوان و چربی‌های امگا ۳ و امگا ۶ باعث مهار پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود و این ویژگی با شکستن ساختار اکسیدکننده موجود توسط سیتوکروم P ۴۲۱ و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاداعمال می‌شود(Agarwal و Sekhon، ۲۰۱۰).هم‌چنین به‌دلیل داشتن‌خواص ضدباکتریایی،ضدقارچی‌وضدویروسی‌وهم‌چنین داشتن ترکیبات بیولوژیک فعال مثل پلی‌ساکاریدهای پیچیده، پروتئین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، کاروتنوئیدها، ویتامین‌ها و مواد معدنی به‌عنوان پتانسیلی برای افزایش بازماندگی، بهبود رشد و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌های ماهی‌های پرورشی مورد توجه هستند (Magnadottir، ۲۰۰۶). گیاه سالیکورنیا .*Salicornia* sp از خانواده اسفنجیان و نمک‌دوست بوده و در خاک‌های شور قابل رشد است. این گیاه بدون برگ بوده و ساقه‌های آن بسیار آب‌دار و شاداب است (Essaidi و همکاران، ۲۰۱۳؛ Choi و همکاران، ۲۰۱۴). گیاه سالیکورنیا غنی از فیبرهای رژیمی و ترکیبات زیست فعال نظیر فیتواسترول‌ها، پلی‌ساکاریدها و ترکیبات فنولی نظیر فلانوئیدها و اسیدفنولئیک هستند و به‌دلیل وجود ترکیبات فلانوئیدی خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد (Kharrati-Koopaee و همکاران، ۲۰۱۶). ترکیبات فنلی‌ممکن است به‌عنوان‌خاتمه‌دهنده واکنش‌های‌زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد و یا به‌عنوان شلاتور یون‌های فلزی فعال‌کننده ردوکس که باعث پراکسیداسیون می‌گردند عمل کنند. لذا توجهات اخیر به‌ترکیبات‌فنلی به‌ویژه فلانووئیدها به‌دلیل‌ظرفیت‌آنتی‌اکسیدانی بالاو نقش مفیدآن‌ها درسلامتی افزایش‌یافته‌است(Valko و همکاران، ۲۰۰۴). Choi و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی ویژگی‌های فیزیکی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی *Salicornia herbaciea* نشان دادند که این گیاه دارای اسیدهای چرب غیراشباع اسیدلینولئیک (۴۳/۷۳ درصد) و اسید اولئیک (۱۹/۸۱درصد) است و روغن گونه مذکور مقادیر قابل ملاحظه‌ای آنتی‌اکسیدان آلفاتوکوفرول دارد که باعث افزایش مقاومت روغن‌در برابر شرایط محیطی می‌گردد. تحقیقات مختلفی برای بررسی تاثیرهای مشتقات گیاهی مختلف بر فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنتی اکسیدانی گونه‌های مختلف ماهی صورت گرفته است. Antache و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی اثر تعدادی فیتوبیوتیک‌ها نظیر رزماری (*Rosmarinus officinalis*)، سنجد تلخ (*Hippophae rhamnoides*) و زنجبیل (*Zingiber officinale*) بر استرس اکسیداتیو ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تحت سیستم پرورشی با بازچرخش آب نشان دادند که استفاده از یک درصد سنجد تلخ بر کیلوگرم غذا منجربه‌کاهش مالون‌دی‌آلدئید و افزایش‌آنتی‌اکسیدان‌کل و گلوتاتیون پراکسیداز در ماهی تیلاپیای‌نیل گردید. Sönmez و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نوجوان (*Oncorhynchus mykiss*)تغذیه شده با اسانس آویشن معمولی (*Thymus vulgaris*)، نعناع وحشی (*Mentha spicata*) و مریم گلی (*Salvia officinalis*) گزارش کردند که استفاده از غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم اسانس مریم گلی و آویشن معمولی منجر به بهبود کارایی رشد، کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید و حداقل تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسیداز دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون ترانسفراز) بافت کبد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شد. Kavitha و همکاران (۲۰۱۱) باابررسی‌فعالیت‌حفاظتی‌کبد عصاره خارخاسک (*Tribulus terrestris*) در مقابل سمیت استامینوفن در ماهی تیلاپیای موزامبیکا (*Oreochromis mossambicus*) نشان دادند که استفاده از ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره خارخاسک برکیلوگرم غذا منجر به تنظیم

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

مواد و روش‌ها

ماهی و شرایط پرورش: این تحقیق در سالن مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار به‌مدت ۶۰ روز و در آذرماه ۱۳۹۶انجام گرفت. ماهیان مورد استفاده در این مطالعه، از مرکز تکثیر میگوی دکتر اژدری واقع در کنارک تامین شدند. پس از ۲ هفته سازگاری، تعداد ۲۴۰ قطعه‌ماهی کفال خاکستری با میانگین طولی ۰/۴۰ ± ۶/۴۵ سانتی‌متر و میانگین وزنی ۰/۴۳±۸/۴۲ گرم در ۱۲ مخزن فایبرگلاس باحجم ۶۰ لیتر به‌صورت تصادفی قرار گرفتند. هوادهی مخزن‌ها به‌طور مداوم با استفاده از سنگ‌های هواده متصل به پمپ هوادده مرکزی انجام شد. مخازن روزانه پیش از غذادهی برای خروج مواددفعی ۷۰ درصد حجم آب آن سیفون می‌شد. در طول دوره، پارامترهای آب اندازه‌گیری شد. به‌طور میانگین در کل دوره درجه حرارت آب ۴۵/۷۸±۲۸/۰درجه‌سانتی‌گراد،اکسیژن‌محلول ۰/۹۲±۸/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر و pH آب ۰/۶±۷/۹ بود.در طی دوره آزمایش فتوپریود به‌صورت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بود.

تهیه گیاه سالیکورنیا .*Salicornia* sp و آماده‌سازی عصاره: گیاه‌سالیکورنیا از خور تیس چابهار جمع‌آوری و شناسایی شد (Patell، ۲۰۱۶). سپس بعد از خشک شدن آن‌ها در فضای آزاد، آسیاب شد و کاملا به‌حالت پودر تبدیل شد ۵۰ گرم از پودر حاصل با ۴۰۰ سی‌سی الکل متانول ۹۶٪ مخلوط و با دستگاه هم‌زن کاملاً به‌هم زده شد. و با دستگاه سوکسله عصاره‌گیری انجام شد و عصاره‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگه‌داری شد(Harikrishnan و همکاران، ۲۰۱۳).

تیمارها: این تحقیق درقالب طرح کاملاًتصادفی به‌صورت ۴ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. افزودنی مورد نظر در سطوح ۰ (شاهد)، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم عصاره گیاه سالیکورنیا در هر کیلوگرم غذای تجاری شرکت هوورراش بوشهر (قطر ۱/۲ میلی‌متر)، حاوی (۳۹٪ پروتئین، ۷٪ چربی، ۸٪ خاکستر و ۵٪ رطوبت اضافه‌شدو ماهیان مورد آزمایش با این جیره‌ها تغذیه شدند (Sönmez و همکاران، ۲۰۱۵). سطوح مختلف مکمل به غذای کنسانتره ابتدا مقدار غذا را برای کل دوره ۶۰ روز برای هر تیمار محاسبه شد و بر حسب نوع تیمارهای آزمایشی سطوح مختلف عصاره افزودنی پس از توزین با ترازوی حساس آزمایشگاهی (۰/۰۰۱ گرم) در ۲۰ سی‌سی آب مقطر حل و به‌صورت یکسان بر روی غذای تجاری اسپری شد و تیمار شاهد به‌همین روش بدون عصاره گیاه آماده شد (Choi و همکاران، ۲۰۱۵). پس از ۴۸ ساعت جیره های خشک جمع‌آوری و در نایلون‌های مجزا در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. مقدار غذای روزانه با توجه به‌درصد وزن بدن (توده زنده) محاسبه شد و در نوبت صبح و عصر به‌میزان ۳ درصدوزن‌بدن در اختیار ماهیان قرار گرفت(Choi و همکاران، ۲۰۱۵).

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

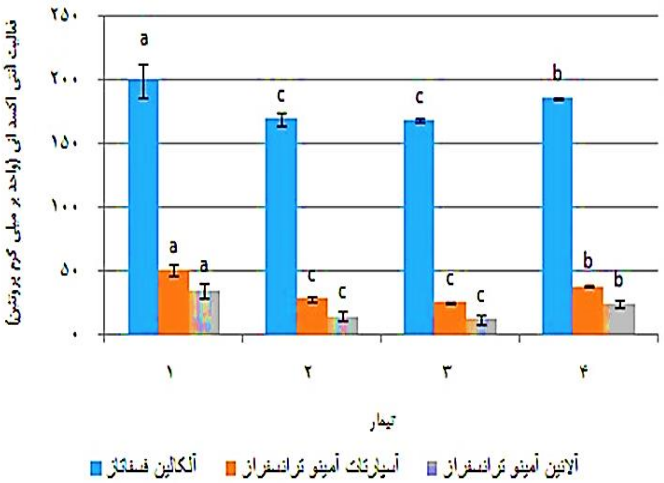
تعیین‌فعالیت‌آنزیم‌های‌کبدی: براساس تست آلکالین فسفاتاز، ابتدا دو لوله آزمایش انتخاب کرده و به هریک ۱ میلی‌لیتر سوبسترای بافری (۱۰۰ میلی‌گرم پارانیتروفنیل فسفات دی‌سدیم، ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲۵ میلی‌لیتر بافرگلیسین ۰/۱ نرمال (pH ۱۰/۶، ۰/۲ کلرید منیزیم، ۷/۵ گرم گلیسین، ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۸۵ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم نرمال) ریخته و در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به یکی از دو لوله، ۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر (لوله بلانک) و به دیگری ۰/۱ میلی‌لیتر سرم (لوله تست) اضافه شد. محتویات لوله‌ها به‌خوبی مخلوط شد و دقیقاً ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس آن‌ها را از بن ماری خارج کرده و ۱میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۰۲ نرمال را به آن‌ها اضافه کرده و به‌خوبی مخلوط شدند. جذب نوری لوله‌های تست (A_1) در مقابل بلانک در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک غلیظ به آن‌ها اضافه و به‌خوبی مخلوط شد و جذب نوری آن‌ها دوباره قرائت گردید (A_2) و مقدار A1-A2 از روی منحنی کالیبراسیون به‌دست آمد (Liu و همکاران، ۲۰۱۶). سنجش آلانین آمینوترانسفراز براساس روش Liu و همکاران (۲۰۱۶) با کمی تغییرات صورت گرفت. ۱ میلی‌لیتر سوبسترا (۰/۰۵۸۴ گرم‌اسیدآلفا گلوتاریک، ۵/۳۲ گرم اسید دی- ال آسپارتیک، ۴۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ نرمال،بافر فسفات،کلروفرم)به‌دوکووت اضافه‌ودرجه‌حرارت‌کووت‌ها به ۳۷ درجه‌سانتی‌گرادرسانده‌شد.۰/۲ میلی‌لیترسرم را به‌داخل کووت تست و ۲۰ میلی‌لیتر آب را به‌داخل کووت بلانک ریخته و محتویات کووت را به‌خوبی مخلوط کرده و یک ساعت در بن ماری در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. کووت‌ها را از بن ماری خارج نموده ۱ میلی‌لیتر معرف رنگی (۰/۰۳۹۶ گرم دی نیتروفنیل هیدرازین، ۲۰۰ میلی‌لیتر و اسیدکلریدریک نرمال) به آن‌ها اضافه شد. محتویات کووت‌ها را مجدداً مخلوط کرده و ۲۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده و ۱۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۴ نرمال به آن اضافه کرده و به‌خوبی مخلوط گردید. بعد از ۵ دقیقه جذب نوری لوله بلانک در طول موج ۵۰۵ نانومتر روی ۰/۲۵ تنظیم شد و جذب نوری کووت تست قرائت گردید. جهت سنجش از منحنی کالیبراسیون استفاده شد. سنجش آسپارتات‌آمینوترانسفرازبراساس‌روش Liu و همکاران (۲۰۱۶) صورت‌گرفت.به‌استثنای‌سوبسترا همانند‌سنجش‌آلانین آمینوترانسفراز بود. سوبسترای آن شامل ۰/۰۲۹۲ گرم اسید آلفاکتوگلوتاریک، ۱/۷۸ از دی ال آلانین، ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر و حجم محلول با بافر فسفات (۷/۴ pH) به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز طبق روش Winterbourn (۱۹۷۵)، با استفاده از کیت ارزیابی این آنزیم براساس دستورالعمل سازنده آن (راندوکس، انگلیس) اندازه‌گیری‌شد و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک در طول موج ۵۶۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. یک واحد از سوپر اکسید دیسموتاز مقداری است که موجب مهار ۵۰ درصد از واکنش احیاء ۲-۴ یدوفنیل ۳-۴ نیتروفنل ۵- فنیل تترازولیوم تحت شرایط آزمایش می‌شود و مقدار آنزیم در بافت به‌صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. سنجش فعالیت کاتالاز نیز طبق تجزیه آب اکسیژنه با کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به‌مدت ۳۰ ثانیه و به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین در عصاره آنزیمی بیان شد در آن بافر فسفات سدیم ۲۰ میلی مولار با پی اچ ۷ و ۲۰ میکرولیتر هیدروژن پراکساید ۳۰ درصد به‌عنوان پذیرنده الکترون مورد استفاده قرار گرفت (Dazy و همکاران، ۲۰۰۸).سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز مطابق روش Lawrence و Burk (۱۹۷۶) با استفاده از کیت ارزیابی این آنزیم بر اساس دستورالعمل سازنده آن (راندوکس، انگلیس) اندازه‌گیری شد و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک در طول موج ۴۴۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت و مقدار آنزیم در بافت به‌صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. سنجش مالانون دی‌آلدئید توسط روش Baluchnejad mojarad و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت.به سوپرناتنت حاصل تری‌کلرواستیک اسید ۱ درصد و تیوباربیتوریک اسید ۰/۶ درصد اضافه شد و سپس در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۸۰ دقیقه انکوباسیون شد و پس از سردشدن در مجاورت یخ، در دور ۱۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژشد و نمونه‌ها با جذب نوری ۵۳۵ نانومتری قرائت شد و نتایج بر حسب واحد مالون دی‌آلدئید بر حسب میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One Way Analysis Of Variance =ANOVA) و مقایسه میانگین بین تیمارها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌دار ۵٪ استفاده شد. بااستفاده از تست کالموگراف اسمیرنوف نرمال بودن داده‌ها و از تست لون برابری واریانس‌ها استفاده شد تجزیه و تحیل کلیه داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ صورت گرفت وجهت محاسبات آماری از نرم‌افزار Excel ویرایش ۲۰۱۰ استفاده شد.

نتایج

فعالیت آنزیم‌های کبدی: تغییرات میانگین (± خطای معیار) فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز کبد ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش در شکل ۱ داده شده است. طبق شکل ۱، فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینو ترانسفراز در تیمارهای حاوی سطوح مختلف عصاره الکلی گیاه سالیکورنیا کاهش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). درحالی‌که تیمارهای ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری را در فعالیت آنزیم‌های اندازه‌گیری شده با یکدیگر نشان ندادند (P>۰/۰۵). کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی مربوط به‌تیمارهای ۲ و ۳ بود.



شکل ۱: میانگین و خطای معیار فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینو ترانسفراز،آسپارتات آمینو ترانسفراز کبد ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است. تیمار۱ تا ۴ به‌ترتیب حاوی ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰میلی‌گرم عصاره گیاه سالیکورنیا برکیلوگرم است.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: تغییرات میانگین (±خطای معیار)فعالیت‌آنزیم‌های سوپراکسیداز دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، مالون دی آلدئید و کاتالاز ماهی کفال خاکستری در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش در جدول ۱ داده شده است. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم مالون دی آلدئید (MDA) در تیمار ۲ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد و تیمار ۴ نشان داد (P<۰/۰۵). فعالیت آنزیم MDA در تیمارهای ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند (P>۰/۰۵). درحالی‌که بیش‌ترین فعالیت آنزیم‌های CAT وGPX در تیمارهای حاوی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره‌گیاه سالیکورنیا برکیلوگرم غذا مشاهده‌شدو اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). بین کلیه تیمارها از نظر فعالیت آنزیم SOD اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

بحث

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

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

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

وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵)تیمار۱ تا ۴ به‌ترتیب حاوی ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰میلی‌گرم عصاره گیاه سالیکورنیا برکیلوگرم است.ns نشانه عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در شاخص مورد نظر است (P>۰/۰۵).

به‌نظر می‌رسد وجود پلی‌فنل‌ها و فلانوئیدها از مواد زیست فعال موجود در گیاه سالیکورنیا و گیاهان دیگر هستند که خاصیت آنتی اکسیدانی داشته و به‌عنوان مکانیسم حفاظتی در برابر استرس در پیشگیری ازعفونت‌نقش دارند(Kang و همکاران، ۲۰۱۱).سیستم‌های دفاعی آنزیمی نظیر سوپراکسیداز دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتلازو مالون‌دی‌آلدئیدوغیرآنزیمی‌مثل ترکیبات‌آنتی‌اکسیدان موجود در مواد غذایی نظیر ویتامین‌ها، پلی‌فنل‌هاو کاروتن‌ها از مهم‌ترین و اصلی‌ترین سیستم‌های تدافعی بدن، جهت تنظیم میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) تحت شرایط استرس می‌باشند (Sies و Stahl، ۱۹۹۵). پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل از فرم‌های فعال اکسیژن هستند که در شرایط نامتعادل اکسیداسیون و احیای درون سلولی می‌توانند آسیب‌های شدیدی به مولکول‌های‌درشت سلولی نظیر پروتئین‌ها، چربی و DNA وارد نمایند (Juránek و Bezek، ۲۰۰۵). در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسیداز دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و مالون دی آلدئید مورد بررسی قرار گرفت به‌صورتی‌که بیش‌ترین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز و کم‌ترین فعالیت آنزیم مالون‌دی‌آلدئید در تیمارهای حاوی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عصاره گیاه سالیکورنیا بر کیلوگرم غذا مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد. بین کلیه تیمارها از نظر فعالیت آنزیم SOD اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. Sönmez و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نوجوان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با اسانس آویشن‌معمولی(*Thymus vulgaris*)، نعناع وحشی (*Mentha spicata*) و مریم گلی (*Salvia officinalis*) گزارش کردند که استفاده از غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم اسانس مریم گلی و آویشن معمولی منجر به بهبود کارایی رشد، کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید (شاخص پراکسیداسیون لیپیدی) شد که با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی داشتند. این به‌نظر می‌رسد که تاثیر عصاره سالیکورنیادر کاهش غلظت MDA می‌تواند به‌واسطه ترکیبات‌فنلی به‌ویژه فلانووئیدها باشد.آنتی‌اکسیدان‌های فنلی (PhOH) با دادن سریه هیدروژن به رادیکال‌ها از اکسیداسیون لیپیدها و دیگر مولکول ها جلوگیری می‌کنند. واسطه‌های رادیکال فنوکسی (PhO) نسبتاً پایدار هستندو به‌عنوان خاتمه‌دهنده‌واکنش‌های‌زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند (Kang و همکاران، ۲۰۱۱؛ Crespy و Williamson، ۲۰۰۴؛ Valko و همکاران، ۲۰۰۶). هم‌چنین افزایش فعالیت آنزیم‌های GPX و CAT در تیمارهای تغذیه شده با عصاره سالیکورنیا نشان می‌دهد که احتمالاً وجود ترکیبات فنلی موجود در گیاه باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد گردیده است (Lynn و همکاران، ۲۰۰۶؛ Valavanidis و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به بررسی فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنتی‌اکسیدانی به‌نظر می‌رسد که سطح‌موثرعصاره‌گیاه‌سالیکورنیا درجیره غذایی‌ماهی کفال خاکستری، سطوح ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا می‌باشد. البته لازم به ذکر است که برای پی بردن به این که این اثر مربوط به چه ترکیب یا ترکیباتی از گیاه است. به مطالعات فارماکولوژیکی و بیوشیمیایی گسترده‌ای در جهت‌استخراج‌وخالص‌سازی‌این‌ترکیبات،موردنیاز است.

تشکر و قدردانی

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

منابع

۱. **Agarwal, A. and Sekhon, L., 2010.** The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Human Fertility. Vol. 13, pp: 217-225.

۲. **Akhani, H., 2007.** Diversity, biogeography, and photosynthetic pathways of Argusia and Heliotropium (Boraginaceae) in South-West Asia with an analysis of phytogeographical units. Botanical Journal of the Linnean Society. Vol. 155, pp: 401-425.

۳. **Akrami, R.; Gharaeib, A.; Razeghi Mansourc, M. and Galeshi, A., 2015**. Effects of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innateimmune response and hematoebiochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754) juvenile. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 45, pp: 828-834.

۴. **Antache, A.; Crister, V.; Iulia, R.; Grecu, I.R.; Ion, S.P. and Mocanu, M.C., 2013.** The Influence of Rosemary Sea Buckthorn and Ginger on Oxidative Stress at *Oreochromis niloticus* Reared in a Recirculating Aquaculture System. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies. Vol. 70, pp: 110-116.

۵. **Atli, G. and Canli, M., 2010**. Response of antioxidante systemof freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 73, pp: 1884-1889.

۶. **Bhardwaj, S.; Srivastava, M.K.; Kapoor, U. and Srivastava, A., 2010.** 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: morphological, biochemical and histopathological evaluations, Food Chemistry and Toxicology. Vol.48, pp: 1185-1190.

۷. **Baluchnejad mojarad, T.; Roghani, M. and Mafakheri, M., 2010.** Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress. Neuroscience letter. Vol. 480, pp: 206-210.

۸. **Byun, D.S.; Kwon, M.N.; Hong, J.H. and Jeong, D.Y., 1994.** Effects of flavonoids and α-tocopherol on the oxidation of n-3 polyunsaturated fatty acids. Antioxidizing effect of catechin and α-tocopherol in rat with chemically induced lipid peroxidation. Bulletin of Korean Fish Society. Vol. 27, pp: 166-172.

۹. **Choi, D.; Lim, G.S.; Piao, Y.L.; Choi, O.Y.; Cho, K.A. and Park, C.B., 2014.** Characterization, stability, and antioxidant activity of *Salicornia herbaciea* seed oil. Korean Journal of Chemical Engineering. Vol. 31, pp: 2221-2228.

۱۰. **Chong, A.S.C.; Hashim, R.M.; Chow-Tang, L. and Ali, A.B., 2002.** Parrtial characterization and activities of protease from the digestiove tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). Aquacultur. Vol. 203, pp: 321-331.

۱۱. **Crespy, V. and Williamson, G., 2004.** A Review of the Health Effects of Green Tea Catechins in inivo Animal Models. International Research Council on Food Nutrition and Cancer. Vol. 134, pp: 3431-3440.

۱۲. **Dadras, H.; Hayatbakhsh, M.R.; Shelton, W.L. and Golpour, A., 2016**. Effects of dietary administration of Rose hip and Safflower on growth performance, haematological, biochemical parameters and innate immune response of Beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 59, pp: 109-114.

۱۳. **Das, K.M. and Tripathi, S.D., 1991.** Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharhyngodan idella*. Aquaculture. Vol. 92, pp: 21-32.

۱۴. **Dazy, M.; Jung, V.; Ferard, J. and Masfaraud, J., 2008.** Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: Role of plant antioxidant enzymes and possible implication in site restoration. Chemosphere. Vol. 74, pp: 57-63

۱۵. **Essaidi, I.; Brahmi, Z.; Snoussi, A.; Haj Koubaier, H.B.; Casabianca, H.; Abe, N.; El Omri, A.; Chaabouni, M.M. and Bouzouita, N., 2013**. Phytochemical investigation of Tunisian *Salicornia herbacea* L., antioxidant, antimicrobial and cytochrome P450 (CYPs) inhibitory activities of its methanol extract. Food Control. Vol. 32, pp: 125-133.

۱۶. **Harikrishnan, R.; Nisha, M.R. and Balasundaram, C., 2003**. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. Vol. 221, pp: 41-50.

۱۷. **Hall, J.E., 2010**. Textbook of medical physiology, 12 th ed. New York, Saunders press. pp: 999-1006.

۱۸. **Juránek, I. and Bezek, S., 2005**. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury? General Physiology and Biophysics. Vol. 24, pp: 263-278.

۱۹. **Kang, S.; Kim, D.; Lee, B.H.; Kim, M.R.; Chiang, M. and Hong, J., 2011**. Antioxidant Properties and Cytotoxic Effects of Fractio Glasswort (*Salicornia herbacea*) Seed Extracts on Human Cells. Food Science and Biotechnology. Vol. 20, No. 1, pp: 115-122.

۲۰. **Kavitha, P.; Ramesh, R.; Bupesh, G.; Stalin, A. and Subramanian, P., 2011.** Hepatoprotective activity ofTribulus terrestrisextract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish (*Oreochromis mossambicus*). In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal. Vol. 47, pp: 698-706.

۲۱. **Kharrati-Koopaee, H.; Heydarian, Z.; Shekarforoush, S.Sh.; Golmakani, M.T.; kharrati-kopaei, M. and Gorji Makhsous, S., 2016**. The antibacterial activities of six organic solvent extracts of *Salicornia iranica* against *Salmonella typhimurium*. Iranian Journal of Veterinary Science and Technology. Vol. 8, pp: 25-26.

۲۲. **Lawrence, R.A. and Burk, R.F., 1976.** Gluthatione peroxidase activity in selenium deficiency rat liver biochemical and biophysics research communitations. Vol. 71, pp: 952-958.

۲۳. **Liu, F.; Shi, H.; Guo, Q.; Yu, Y.; Wang, A.; Lv, F. and Shen, W., 2016.** Effects of astaxanthin and emodin on the growth, stress resistance and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 51, pp: 125-135.

۲۴. **Lynn, A.; Collins, A.; Fuller, Z.; Hillman, K. and Ractcliffe, B., 2006.** Cruciferous vegtables and colo- rectal cancer. Proceedings of the Nutrition Society. Vol. 65, pp: 135-144.

۲۵. **Magnadottir, B., 2006.** Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 20, pp: 137-151.

۲۶. **Morales, A.E.; Pérez-Jiménez, A.; Hidalgo, M.C.; Abellán, E. and Cardenete, G., 2004**. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 139, pp: 153-161.

۲۷. **Osawa, T. and Kato, Y., 2005.** Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 1043, pp: 440-451.

۲۸. **Patel1, S., 2016.** Salicornia: evaluating the halophytic extremophile as a food and a pharmaceutical candidate. Biotechnology. Vol. 6, pp: 2-10.

۲۹. **Rosenkranz, G.K., 2009.** Modeling laboratory data from clinical trials. Computational Statistics and Data Analysis. Vol. 53, pp: 812-819.

۳۰. **Sies, H. and Stahl W., 1995.** Vitamins E and C, beta carotene, and other carotenoids as antioxidants. American Journal of Clinical Nutrition. Vol. 62, pp: 1315-1321.

۳۱. **Sönmez, A.Y.; Bilen, S.; Alak, G.; Hisar, O.; Yamık, T. and Biswas, G., 2015.** Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 41, pp: 165-175.

۳۲. **Soochan, D.; Keough, V.; Wanless, I. and Molinari, M., 2012.** Intra and extra-hepatic cystadenoma of the biliary duct. Review of literature and radiological and pathological characteristics of a very rare case. BMJ Case Report. Vol. 4, pp: 2012-2014.

۳۳. **Vahedi, A., 2015**. Investigation of oral administration of ginger extract (*Zingiber officinale)* on growth performance, blood index and metabolic enzymes in *Huso huso*. Thesis of MS.c Azad University of Azad Shahr. 67 p.

۳۴. **Valavanidis, A.; Valchogianni, T. and Fiotakis, C., 2009.** 8- hydroxy-2- deoxyguanosine 98-OHdG): A critical biomarker of oxidative strss and carcinogenesis. Journal of Environmental Science and Health Part. Vol. 27, pp: 120-139.

۳۵. **Valko, M.; Rhodes, C.J.; Monco, J.; Izakovic M. and Mazur, M., 2006**. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico- Biological Interaction. Vol. 160, pp: 1-40.

۳۶. **Young I.S. and Woodside, J., 2001**. Antioxidants in health and disease. Journal of clinical pathology. Vol. 54, pp: 176-186.

۳۷. **Winterbourn, C.; Hawkins, R.; Brian, M. and Carrell, R.W., 1975**. Estimation red cell superoxidase dismu tase activity, Journal of Laboratory chinease in. The Medicine. Vol. 85, No. 2, pp: 337-340.

۳۸. **Zarifmanesh, T. and Zorreieh Zahra, J., 2012.** Use of Phytobiotics in development of Aquaculture. First National Conference on Sustainable Development Strategies. 7 p.