

Effects of Salep (*Orchis mascula*) Supplementation on Physiological Indices and Stress Responses in Zebrafish (*Danio rerio*) Following Transport Stress

Safari R.^{1*}; Azadi H.¹; Khajavi A.M.¹; Rahbar M¹; Mortezaei, F²; Hejrati, M.H¹

1 - Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Fisheries Department, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran

*rsafari@gau.ac.ir

Abstract

This study investigated the effects of dietary supplementation with Salep (*Orchis mascula*) on physiological indices and stress responses in zebrafish (*Danio rerio*) following transport stress. A total of 288 zebrafish (average weight: 0.23 ± 0.01 g) were fed four experimental diets for eight weeks: a control diet (C, basal diet without Salep) and three Salep-supplemented diets, designated as OM0.5 (0.5%), OM1 (1%), and OM2 (2%). At the end of the trial, fish were exposed to transport stress for one hour, after which biochemical indices, hepatic enzyme activities, and stress responses were evaluated. Results revealed that diets containing 1% and 2% Salep significantly reduced plasma glucose, cortisol, cholesterol, lactate dehydrogenase, and aspartate aminotransferase activity ($P < 0.05$), while alkaline phosphatase activity was highest in the OM1 group ($P < 0.05$). However, triglyceride levels and alanine aminotransferase activity increased significantly in the 2% group ($P < 0.05$). Overall, dietary supplementation with 1% Salep is recommended to improve hepatic health, alleviate stress, and regulate biochemical metabolism in zebrafish aquaculture.

Keywords: Hepatic enzymes, Stress response, Salep, Medicinal herbs, Zebrafish.



مقاله علمی - پژوهشی:

اثرات گیاه ثعلب (*Orchis mascula* L.) بر شاخص‌های بیوشیمیایی و پاسخ استرس حمل‌ونقل در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

رقیه صفری*^۱، حامد آزادی^۱، امیر محمد خواجه‌جوی^۱، مینا رهبر^۱، فائزه مرتضایی^۱، محمد حسین هجرتی^۱

*rsafari@gau.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، گیلان، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۳

چکیده

در مطالعه حاضر، اثر افزودن گیاه ثعلب (*Orchis mascula*) به جیره غذایی ماهی گورخری (*Danio rerio*) بر شاخص‌های فیزیولوژیک و پاسخ استرسی پس از استرس حمل‌ونقل بررسی شد. ۲۸۸ عدد ماهی گورخری با میانگین وزنی 0.23 ± 0.01 گرم به مدت ۸ هفته با چهار جیره شامل: شاهد (C، جیره پایه فاقد ثعلب)، سه سطح مختلف از ثعلب در جیره شامل: OM0.5 (۰/۵ درصد)، OM1 (۱ درصد)، OM2 (۲ درصد) تغذیه شدند. در انتهای آزمایش ماهیان به مدت دو ساعت در معرض استرس حمل‌ونقل قرار گرفتند و شاخص‌های شاخص‌های بیوشیمیایی، آنزیم‌های کبدی و پاسخ استرسی بررسی شدند. نتایج نشان داد که جیره‌های حاوی ۱ و ۲ درصد ثعلب به طور معنی‌داری گلوکز، کورتیزول، کلسترول، لاکتات دهیدروژناز و فعالیت آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز را کاهش دادند ($P < 0.05$) درحالی‌که فعالیت آلکالین فسفاتاز در گروه OM1 به حداکثر رسید ($P < 0.05$). با این حال، تری‌گلیسرید و فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در دوز ۲ درصد افزایش یافت ($P < 0.05$). بر اساس نتایج حاصله، استفاده از ۱ درصد ثعلب جهت بهبود سلامت کبدی، کاهش استرس و تنظیم متابولیسم بیوشیمیایی در پرورش ماهی گورخری پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های کبدی، پاسخ استرسی، ثعلب، گیاهان دارویی، ماهی گورخری

مقدمه

در سال‌های اخیر، صنعت آبی‌پروری به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع تولید پروتئین برای جمعیت رو به رشد جهان، با چالش‌های متعددی از جمله بیماری‌ها، کاهش کیفیت آب و نیاز به بهبود بهره‌وری مواجه بوده است. در پاسخ به این چالش‌ها و در زمینه توسعه رویکردهای پایدارتر و سازگار با محیط زیست، استفاده از افزودنی‌های مبتنی بر گیاهان در جیره آبزیان به طور فزاینده‌ای مورد توجه قرار گرفته است. این افزودنی‌ها که منابع غنی از ترکیبات زیست‌فعال متنوعی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها، فیتواستروژن‌ها و پلی‌ساکاریدها هستند، پتانسیل قابل توجهی در بهبود جنبه‌های مختلف سلامت و عملکرد ماهیان پرورشی از خود نشان داده‌اند (Chakraborty *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2025). مطالعات متعددی حاکی از آن است که استفاده از این ترکیبات می‌تواند منجر به بهبود قابل ملاحظه‌ای در عملکرد رشد (افزایش نرخ رشد و ضریب تبدیل غذایی)، تقویت پاسخ‌های ایمنی (افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها و بهبود پاسخ به واکنش‌های ایمنی) و حمایت از موفقیت تولید مثل (افزایش کیفیت تخمک و اسپرم، بهبود باروری و بقاء لاروی) شود (Ahmadifar *et al.*, 2022; Vijayaram *et al.*, 2021). این ترکیبات زیست‌فعال با مکانیسم‌های مختلفی از جمله کاهش سطح هورمون‌های استرس‌زا (کورتیزول)، بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن برای مقابله با استرس اکسیداتیو ناشی از عوامل محیطی و مدیریتی و تنظیم پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مرتبط با استرس، می‌توانند به کاهش بار استرسی در ماهیان پرورشی کمک کنند (Ciji and Akhtar, 2021). کاهش استرس نه تنها برای رفاه حیوان ضروری است بلکه تأثیر مستقیمی بر بهبود عملکرد رشد، تقویت سیستم ایمنی به‌ویژه موفقیت در فرآیندهای تولید مثل دارد، زیرا استرس مزمن می‌تواند به شدت فرآیندهای هورمونی و فیزیولوژیک مرتبط با تولید مثل را مختل کند (Martos-Sitcha *et al.*, 2020). همان‌طوری که صنعت به دنبال راه‌های نوآورانه و کارآمد برای بهینه‌سازی عملکرد تولید مثل و افزایش مقاومت ماهیان در برابر شرایط چالش‌برانگیز پرورشی است، بررسی دقیق پتانسیل و اثرات مکمل‌های گیاهی خاص بر کاهش استرس به یک حوزه حیاتی و راهبردی از تحقیق تبدیل شده است.

یکی از این گیاهان، ثعلب (*Orchis mascula*) است. این گیاه عضوی از خانواده بزرگ Orchidaceae بوده که به دلیل خواص

دارویی سنتی خود در مناطق مختلف جهان شناخته شده است. یکی از مهم‌ترین ترکیبات فعال موجود در غده‌های زیرزمینی ثعلب، گلوکومانان است. گلوکومانان یک پلی‌ساکارید محلول در آب است که به دلیل خواص بی‌نظیر به‌ویژه در زمینه تعدیل سیستم ایمنی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مورد توجه قرار گرفته است (Kurt, 2021). این ترکیب می‌تواند با تأثیر بر سلول‌های ایمنی و کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از عوامل محیطی یا فیزیولوژیک، به بهبود وضعیت سلامت عمومی موجود زنده کمک کند (Bauerová *et al.*, 2008). با توجه به ترکیب منحصر به فرد ثعلب و حضور گلوکومانان و سایر ترکیبات زیست‌فعال در آن، این گیاه کاندیدای بسیار مناسبی برای بررسی اثرات آن بر بهبود عملکرد مولدین در ماهیان پرورشی است. با این حال، به رغم استفاده‌های سنتی و پتانسیل بیوشیمیایی ثعلب، اثرات خاص آن در زمینه آبی‌پروری تا کنون به طور کامل و علمی مورد مطالعه قرار نگرفته است. این کمبود اطلاعات، اهمیت و ضرورت انجام تحقیقات علمی در این زمینه را دوچندان می‌کند.

برای بررسی اثرات افزودنی‌های غذایی نوین به‌ویژه ترکیبات گیاهی بر فیزیولوژی آبزیان، نیاز به یک مدل مطالعاتی مناسب وجود دارد. ماهی گورخری (*Danio rerio*) به عنوان یک مدل حیاتی در تحقیقات علمی به‌ویژه در زمینه‌های زیست‌شناسی تکوینی، ژنتیک و فیزیولوژی، به طور گسترده‌ای مورد پذیرش قرار گرفته است (Ulloa *et al.*, 2014). این گونه دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است که آن را برای این نوع مطالعات ایده‌آل می‌سازد که از جمله این ویژگی‌ها می‌توان به چرخه زندگی کوتاه (امکان مشاهده چندین نسل در مدت زمان نسبتاً کوتاه)، باروری بالا (تولید تعداد زیادی تخمک و اسپرم) و ژنوم کاملاً شناخته شده (وجود نقشه‌های ژنتیکی و ابزارهای مولکولی پیشرفته برای بررسی مکانیسم‌های اثر)، اشاره کرد (Ribas and Piferrer, 2014). این ویژگی‌ها امکان ارزیابی سریع و کارآمد چگونگی تأثیر ترکیبات افزودنی در جیره مانند ثعلب بر فرآیندهای حیاتی را فراهم می‌کنند. نتایج حاصل از مطالعات بر ماهی گورخری به دلیل شباهت‌های فیزیولوژیک و مولکولی قابل توجه، می‌توانند با دقت بالایی به گونه‌های ماهیان با اهمیت تجاری و پرورشی تعمیم داده شوند.

بر اساس اثرات مثبت افزودنی‌های گیاهی بر بهبود شاخص‌های فیزیولوژیک گونه‌های مختلف ماهیان به‌ویژه در مواجهه با شرایط استرسی موجود در دوره پرورش، ارائه ترکیبات نوین که به راحتی

تهیه و نگهداری از ماهیان

تمامی فعالیت‌های تغذیه‌ای و نمونه‌برداری این پژوهش در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، انجام شد. بدین‌منظور، ۲۲۸ عدد ماهی گورخری با میانگین وزن اولیه 0.1 ± 0.23 گرم به مدت دو هفته در آکواریوم‌های شیشه‌ای ۲۳ لیتری با عمق آبیگری ۲۰ سانتی‌متر تحت شرایط محیطی کنترل شده سازگار و سه بار در روز با جیره تجاری پایه به میزان ۳ درصد وزن بدن تغذیه شدند. یک روز در میان ۵۰ درصد آب مخازن تعویض شد. شاخص‌های کیفیت آب شامل دما (26 ± 2 درجه سانتی‌گراد)، pH (7.0 ± 0.1) به طور منظم اندازه‌گیری می‌شدند. دوره نوری (فتوپریود) نیز در طول دوره آزمایش به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی ثابت نگه داشته شد.

طراحی آزمایش

این آزمایش به طور کاملاً تصادفی انجام شده و ماهیان در چهار گروه آزمایشی (سه تکرار) توزیع شدند. تیمارها شامل: C: گروه شاهد (جیره پایه فاقد ثعلب)، OM0.5: تغذیه شده با جیره پایه حاوی ۰/۵ درصد ثعلب، OM1: تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد ثعلب، OM2: تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد ثعلب بودند. ماهیان سه بار در روز (ساعت ۸:۳۰، ۱۲:۰۰ و ۱۵:۳۰) با جیره آزمایشی به میزان ۳ درصد وزن بدن به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش، تغذیه ماهیان به مدت ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری متوقف شد. سپس به مدت دو ساعت در معرض استرس حمل‌ونقل قرار گرفتند.

شاخص‌های بیوشیمیایی و آنزیمی

تهیه عصاره کل بدن

برای ارزیابی شاخص‌های بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی سرم، به دلیل کوچک بودن اندازه ماهی و عدم امکان نمونه‌گیری خون، عصاره کل بدن طبق روش Yousefi و همکاران (۲۰۱۸) تهیه شد. بدین‌منظور پس از اعمال استرس حمل‌ونقل، از هر تکرار ۳ ماهی صید و با بالاترین دوز عصاره پودر گل میخک کشته شدند. سپس هر ماهی در هاون پر از نیتروژن مایع خرد و همگن شد. دو برابر وزن بافت‌های خرد شده، بافر نمکی فسفات‌ها اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، لایه رویی جداسازی و

قابل دسترس بوده و در کنار کیفیت بالا مقرون به صرفه نیز هستند، به توسعه هر چه بیشتر راهبردهای پایدار در صنعت آبی‌پروری کمک شایانی می‌کند (Hoseini et al., 2021; Kate et al., 2023; Hoseinifar et al., 2024). این رویکرد نه تنها می‌تواند به بهبود بهره‌وری و سودآوری مزارع پرورش ماهی کمک کند، بلکه با کاهش نیاز به استفاده از مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها، در عرصه حمایت از پایداری محیط زیست و تولید محصولات سالم‌تر نیز گام برمی‌دارد (El-Sayed et al., 2014; Hossain et al., 2024). با توجه به شکاف قابل توجه در دانش موجود در زمینه کاربرد ثعلب در آبی‌پروری به‌ویژه با وجود کاربردهای سنتی و پتانسیل امیدوارکننده پروفایل بیوشیمیایی آن، فرضیه اصلی مطالعه حاضر بر این است که گنجاندن پودر گیاه ثعلب در جیره ماهی گورخری، منجر به بهبود قابل توجهی در تقویت شاخص‌های ایمنی خواهد شد. این امر از طریق تعدیل مسیرهای مولکولی کلیدی و فرآیندهای فیزیولوژیک مرتبط با این عملکردها اتفاق خواهند افتاد. فقدان داده‌های علمی کافی و مستند در مورد اثرات دقیق و مکانیسم عمل ثعلب در رژیم غذایی ماهیان، بر اهمیت و فوریت انجام تحقیقات در این زمینه تأکید می‌کند. بر این اساس، مطالعه حاضر به بررسی پتانسیل ثعلب به عنوان یک افزودنی غذایی در تاثیرگذاری بر شاخص‌های بیوشیمیایی، آنزیم‌های کبدی و هورمونی ماهی گورخری نسبت به شرایط استرس‌زا پرداخت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی جیره

جیره پایه با قطر ۰/۵ میلی‌متر (بیومار موجود در بازار) دارای ۵۲/۴۵ درصد پروتئین، ۱۸/۴۴ درصد چربی و ۴۶۷۱/۳۲ کیلوکالری انرژی خام بود. گیاه ثعلب از عطاری در شهر گرگان تهیه شد. سپس در آزمایشگاه، در آون با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد خشک و با استفاده از آسیاب به صورت پودر درآمد. پودر حاصل با سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ درصد به جیره پایه اضافه شد. برای این منظور، از ژلاتین ۳ درصد به عنوان عامل همبند استفاده شد تا چسبندگی مناسب بین پودر ثعلب و جیره پایه ایجاد شود. این مخلوط به صورت مستقیم بر یک کیلوگرم جیره پایه اسپری شد.

۴۵۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر قرائت شد. غلظت کورتیزول با واحد ng/ml با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد (Poursaeid *et al.*, 2012). ضریب تغییرات درون آزمون و برون آزمون به ترتیب ۷/۶۰ و ۵/۸۵ درصد بود.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) بیان شدند. داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک‌طرفه و سپس آزمون تعقیبی توکی (Tukey's post-hoc test) برای تعیین تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون‌های Kolmogorov-Smirnov و Levene تأیید شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ (Chicago Inc., IL) انجام شد.

نتایج

شاخص‌های بیوشیمیایی

با توجه به جدول ۱، تغذیه با سطوح بالای گیاه ثعلب سبب کاهش معنی‌داری مقادیر گلوکز خون شد ($P < 0.05$). مقادیر این شاخص در دو گروه شاهد و OM0.5 اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P > 0.05$)؛ اگرچه، از سایر گروه‌ها بالاتر بود ($P < 0.05$). در ارتباط با سطوح کلسترول و لاکتات دهیدروژناز سرم نیز روند نزولی مشاهده شد. بدین صورت که با افزایش مقادیر ثعلب در جیره، سطوح این شاخص‌ها کاهش یافت ($P < 0.05$). همچنین مقادیر تری‌گلیسرید در گروه‌های OM1 و OM2 به طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها بود و در گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$).

با توجه به شکل ۱، فعالیت آنزیم ALT در سرم ماهیان تغذیه شده با ۲ درصد ثعلب به طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها ($P < 0.05$). بین دو گروه OM0.5 و OM1 اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). مقادیر ALP در گروه شاهد به طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافت و در گروه OM1 به حداکثر میزان خود رسید ($P < 0.05$) (شکل ۲). با افزایش میزان ثعلب در جیره به ۲ درصد، فعالیت AST به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$) (شکل ۳).

تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی

مقادیر گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید و لاکتات دهیدروژناز با استفاده از روش کالریمتریک و دستورالعمل مندرج در کیت سنجش پارس آزمون (تهران، ایران) تعیین شد. جذب نوری نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2150 (Unico, New Jersey, USA) با طول موج ۵۴۶ نانومتر تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خوانش شد (McGowan *et al.*, 1983).

فعالیت آنزیم‌های کبدی

فعالیت آنزیم‌های کبدی شامل آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) توسط کیت شرکت درمان فرازاکو (تهران، ایران) و آلکالین فسفاتاز (ALP) توسط کیت دلتادرم (تهران، ایران) مطابق دستورالعمل سازنده تعیین شد. فعالیت ALP با روش فسفات پ-نیتروفنیل اندازه‌گیری شد. در این آزمایش، توانایی آنزیم در تبدیل ماده بی‌رنگ ۴-نیتروفنیل فسفات به ۴-نیتروفنول رنگی اندازه‌گیری می‌شود. به طور خلاصه، ۲۰ میکرولیتر محلول کلرید منیزیم و دی‌اتانول‌آمین با ۵ میکرولیتر فسفات نیتروفنیل مخلوط شده، به مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس جذب نوری در ۴۰۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت ALT با اندازه‌گیری تغییر جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر تعیین شد. این تغییر ناشی از واکنش دو مرحله‌ای بین ال-آلانین، اوکزوگلوکارات، پیرووات و NADH بود. فعالیت AST نیز با اندازه‌گیری تغییر جذب نوری در ۳۴۰ نانومتر بر اساس واکنش دو مرحله‌ای بین ال-آسپاراتات، ۲-اوکزوگلوکارات و NADH محاسبه شد (Guo *et al.*, 2015).

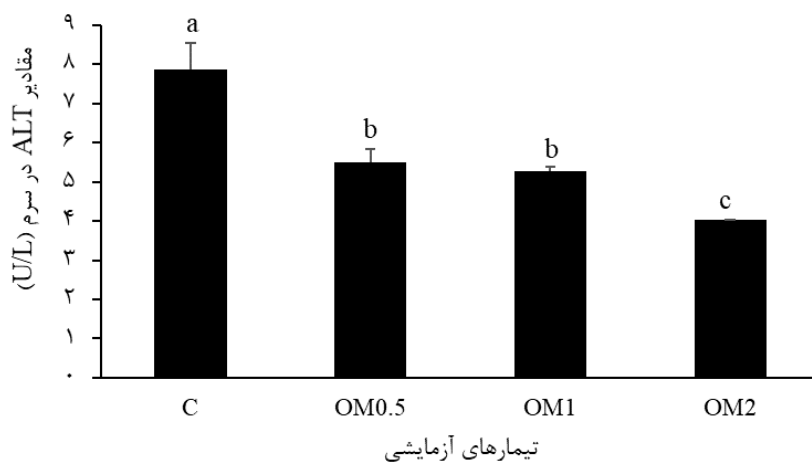
اندازه‌گیری فعالیت هورمون کورتیزول

سنجش هورمون کورتیزول با استفاده از کیت تجاری مونوباند (لیک فارست، آمریکا) طبق دستورالعمل تولیدکننده انجام شد. به طور خلاصه، پس از آماده‌سازی محلول‌ها و کیت، نمونه‌ها، استانداردها و کنترل‌ها در چاهک‌های پلیت اضافه شدند. سپس معرف‌های آنزیمی، بیوتین و سوپسترا به ترتیب اضافه و پس از انکوباسیون‌های لازم، محتویات چاهک‌ها شسته شد. واکنش با افزودن محلول توقف پایان یافته و جذب نوری در طول موج

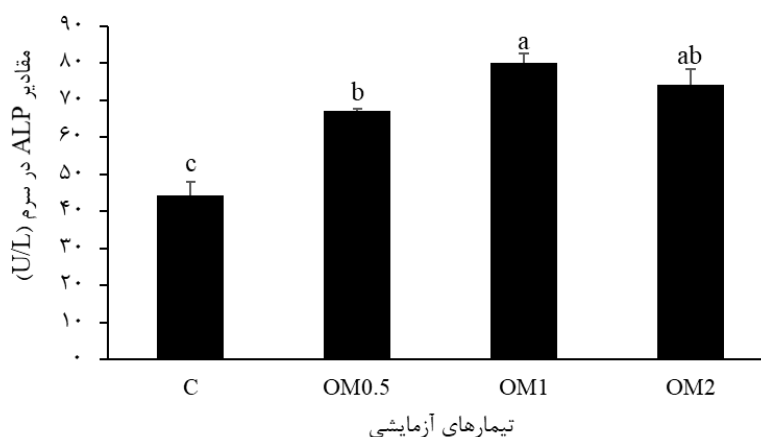
جدول ۱: شاخص‌های بیوشیمیایی سرم بدن ماهی گورخری (*Danio rerio*) تغذیه شده با سطوح مختلف ثعلب به مدت ۸ هفته، پس از قرارگیری در معرض استرس حمل‌ونقل (میانگین \pm SD، n = ۳).

شاخص‌ها	C	OM0.5	OM1	OM2
گلوکز	۳۸/۵۳ \pm ۰/۱ ^a	۳۸/۷ \pm ۱/۰ ^a	۳۵/۴ \pm ۰/۳ ^b	۳۲/۳ \pm ۱/۱ ^c
کلسترول	۱۱۲/۵ \pm ۴/۲ ^a	۹۳/۸ \pm ۲/۱ ^b	۸۱/۳ \pm ۲/۱ ^c	۷۲/۱ \pm ۱/۳ ^d
تری‌گلیسرید	۱۱۹/۹ \pm ۰/۹ ^c	۱۳۰/۵ \pm ۱/۳ ^b	۱۶۱/۰ \pm ۲/۴ ^a	۱۶۵/۹ \pm ۲/۴ ^a
لاکتات دهیدروژناز	۲۲۵/۷ \pm ۴/۳ ^a	۱۸۲/۱ \pm ۳/۶ ^b	۱۷۹/۴ \pm ۰/۹ ^b	۱۸۰/۷ \pm ۰/۷ ^b

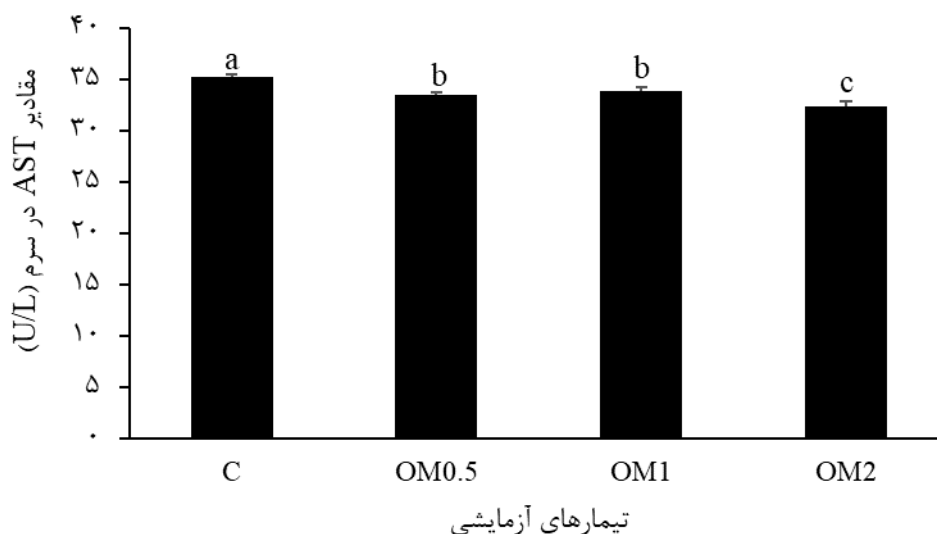
حروف لاتین کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری آماری بین تیمارهای مختلف آزمایشی است ($P < ۰/۰۵$). C: گروه شاهد (فاقد ثعلب)، OM0.5: تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد ثعلب، OM1: تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد ثعلب، OM2: تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد ثعلب.



شکل ۱: سطوح آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در سرم ماهی گورخری (*Danio rerio*) تغذیه شده با سطوح مختلف ثعلب به مدت ۸ هفته، پس از قرارگیری در معرض استرس حمل‌ونقل (n = ۳). داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار آمده‌اند. حروف لاتین کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری آماری بین تیمارهای مختلف آزمایشی است ($P < ۰/۰۵$). C: گروه شاهد (فاقد ثعلب)، OM0.5: تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد ثعلب، OM1: تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد ثعلب، OM2: تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد ثعلب.



شکل ۲: سطوح آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در سرم ماهی گورخری (*Danio rerio*) تغذیه شده با سطوح مختلف ثعلب به مدت ۸ هفته، پس از قرارگیری در معرض استرس حمل‌ونقل (n = ۳). داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار آمده‌اند. حروف لاتین کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری آماری بین تیمارهای مختلف آزمایشی است ($P < ۰/۰۵$). C: گروه شاهد (فاقد ثعلب)، OM0.5: تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد ثعلب، OM1: تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد ثعلب، OM2: تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد ثعلب.

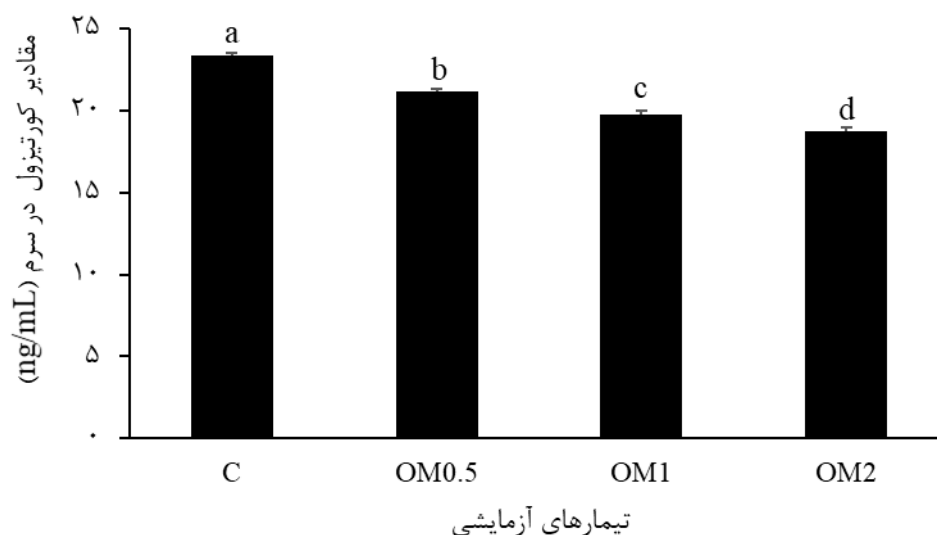


شکل ۳: سطوح آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (AST) در سرم ماهی گورخری (*Danio rerio*) تغذیه شده با سطوح مختلف ثعلب به مدت ۸ هفته، پس از قرارگیری در معرض استرس حمل و نقل ($n = 3$). داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار آمده‌اند. حروف لاتین کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری آماری بین تیمارهای مختلف آزمایشی است ($P < 0.05$). C: گروه شاهد (فاقد ثعلب)، OM0.5: تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد ثعلب، OM1: تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد ثعلب، OM2: تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد ثعلب

میزان آن در گروه شاهد و پایین‌ترین آن در گروه تغذیه شده با ۲ درصد ثعلب مشاهده شد ($P < 0.05$).

غلظت هورمون کورتیزول در سرم

مقادیر هورمون کورتیزول در سرم (شکل ۴) با افزایش مقادیر ثعلب در جیره رابطه معکوس نشان داد به طوری که بالاترین



شکل ۴: سطوح هورمون کورتیزول در سرم ماهی گورخری (*Danio rerio*) تغذیه شده با سطوح مختلف ثعلب به مدت ۸ هفته، پس از قرارگیری در معرض استرس حمل و نقل ($n = 3$). داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار آمده‌اند. حروف لاتین کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری آماری بین تیمارهای مختلف آزمایشی است ($P < 0.05$). C: گروه شاهد (فاقد ثعلب)، OM0.5: تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد ثعلب، OM1: تغذیه شده با جیره حاوی ۱ درصد ثعلب، OM2: تغذیه شده با جیره حاوی ۲ درصد ثعلب

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن گیاه ثعلب به جیره غذایی ماهی گورخری شاخص‌های بیوشیمیایی خون را پس از استرس حمل‌ونقل تأثیر قرار می‌دهد. کاهش معنی‌دار گلوکز خون در گروه‌های دریافت‌کننده جیره‌های حاوی مقادیر بالاتر ثعلب (۱-۲ درصد) نشان‌دهنده تأثیر مثبت این گیاه در تعدیل پاسخ استرسی است. گلوکز به عنوان یکی از شاخص‌های کلیدی استرس در ماهیان شناخته می‌شود، زیرا در شرایط استرس، ترشح کورتیزول و کاتکول‌آمین‌ها منجر به گلیکوژنولیز و افزایش گلوکز خون می‌شود (Barton and Iwama, 1991). فقدان تفاوت معنی‌دار بین گروه شاهد و OM0.5 ممکن است به دلیل دوز پایین ثعلب باشد که برای ایجاد اثر متابولیک کافی نبوده است. با این حال، گروه‌های OM1 و OM2 احتمالاً به دلیل حضور ترکیبات فعال زیستی (گلوکومنان در ثعلب) که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است، توانستند متابولیسم گلوکز را تنظیم کنند و پاسخ استرسی را کاهش دهند (Kurt, 2021). مطالعات مشابه نشان داده‌اند که افزودن عصاره‌های گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی به جیره ماهیان می‌تواند از افزایش گلوکز خون در شرایط استرس جلوگیری کند (Hoseini et al., 2019; Yuan et al., 2021; Shohreh et al., 2025). کاهش سطوح کلسترول و لاکتات دهیدروژناز سرم با افزایش مقدار ثعلب در جیره، نشان‌دهنده بهبود متابولیسم چربی و کاهش آسیب سلولی است. کلسترول به عنوان یک شاخص سلامت متابولیک در ماهیان، در شرایط استرس ممکن است افزایش یابد، زیرا استرس متابولیسم چربی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Montero et al., 2001). کاهش لاکتات دهیدروژناز می‌تواند به کاهش آسیب بافتی و استرس اکسیداتیو نیز مرتبط باشد، زیرا این آنزیم در شرایط آسیب سلولی یا استرس متابولیک آزاد می‌شود (Yang et al., 2019). ترکیبات پلی‌ساکاریدی موجود در ثعلب (گلوکومنان)، ممکن است با بهبود عملکرد کبد و کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن به این اثرات کمک کرده باشند (Pourahmad et al., 2015). این نتایج با یافته‌های مطالعه‌ای که اثر عصاره‌های گیاه موسیر (*Allium hirtifolium*) را بر کاهش استرس اکسیداتیو در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بررسی کرده بود، همخوانی دارد (Ghafariarsani et al., 2022).

افزایش سطوح تری‌گلیسرید در گروه‌های OM1 و OM2 در مقایسه با گروه شاهد و OM0.5 ممکن است به تغییر در متابولیسم چربی مرتبط باشد. تری‌گلیسریدها به عنوان منبع انرژی ذخیره‌ای در ماهیان عمل می‌کنند و افزایش آنها می‌تواند نشان‌دهنده بهبود دسترسی به انرژی در شرایط استرس باشد (Li et al., 2024). همچنین کاهش تری‌گلیسرید در گروه شاهد ممکن است به دلیل مصرف ذخایر انرژی در پاسخ به استرس حمل‌ونقل باشد. این یافته‌ها با مطالعه‌ای که اثر مکمل‌های گیاهی بر متابولیسم چربی در ماهی کپور را بررسی کرده بود، هم‌خوانی دارد (Nguyen et al., 2019). با این حال، افزایش تری‌گلیسرید در دوزهای بالاتر ثعلب و در طولانی‌مدت نیاز به بررسی بیشتر دارد.

نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار افزودن گیاه ثعلب به جیره غذایی ماهی گورخری بر فعالیت آنزیم‌های کبدی پس از استرس حمل‌ونقل بود. افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم ALT در گروه OM2 (تغذیه شده با ۲ درصد ثعلب) نسبت به سایر گروه‌ها ممکن است نشان‌دهنده تغییر در متابولیسم کبدی یا پاسخ به ترکیبات موجود در ثعلب باشد. ALT به طور خاص در کبد تولید می‌شود و افزایش آن می‌تواند به آسیب خفیف کبدی یا افزایش فعالیت متابولیک کبد مرتبط باشد (Hoseini et al., 2019). با این حال، عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های OM0.5 و OM1 نشان می‌دهد که دوزهای پایین‌تر ثعلب احتمالاً تأثیر کمتری بر متابولیسم کبدی دارند. ترکیبات فعال زیستی ثعلب (گلوکومنان و فلاونوئیدها)، ممکن است در دوزهای بالاتر (۲ درصد) متابولیسم آمینواسیدها را تحریک کنند و منجر به افزایش فعالیت ALT شوند. این یافته با مطالعه‌ای که اثر عصاره‌های گیاهی بر فعالیت آنزیم‌های کبدی در ماهی کپور را بررسی کرده بود، تا حدی همخوانی دارد (Nguyen et al., 2019). اگرچه، این مسئله که افزایش ALT نشانه‌ای از استرس کبدی بوده یا صرفاً پاسخ فیزیولوژیک به جیره است، نیاز به بررسی بیشتر دارد.

کاهش معنی‌دار فعالیت ALP در گروه شاهد نسبت به سایر گروه‌ها احتمالاً به دلیل تأثیر استرس حمل‌ونقل بر متابولیسم کبدی و کاهش فعالیت آنزیمی در غیاب مکمل ثعلب است. در مقابل، حداکثر فعالیت ALP در گروه OM1 نشان‌دهنده اثر مثبت دوز متوسط ثعلب بر بهبود عملکرد کبد و متابولیسم فسفات است. ALP در فرآیندهای متابولیک (هضم و جذب مواد

نشان‌دهنده پاسخ استرسی شدید در نبود مکمل ثعلب است در حالی که کاهش آن در گروه OM2 احتمالاً به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی ترکیبات فعال زیستی ثعلب است (Atashpour *et al.*, 2017; Hürkan *et al.*, 2019). این ترکیبات می‌توانند با کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب، فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-اینترنال را تعدیل می‌کند و ترشح کورتیزول را کاهش دهند. مطالعات مختلفی بیانگر اثر مثبت ترکیبات موجود در افزودنی‌های گیاهی بر کاهش سطوح کورتیزول خون ماهیان هستند. برای مثال، مصرف عصاره پروپولیس در جیره تیلاپیی نیل سبب کاهش سطوح کورتیزول پس از بروز استرس سرمایی و بهبود متابولیسم این گونه شد (Hassaan *et al.*, 2019). در کنار ویژگی آنتی‌اکسیدانی گیاه ثعلب، کاهش سطوح کورتیزول را می‌توان با تعدیل تولید سایتوکین‌های التهابی نیز در ارتباط دانست. اگرچه، مطالعات متمرکز در ارتباط با اثرات این گیاه در ماهیان انجام پذیرفته است اما سایر بررسی‌ها بر روی پستاندارانی نظیر موش صحرایی بیانگر اثرات این گیاه در کاهش استرس و بهبود شرایط فیزیولوژیک است (Pourahmad *et al.*, 2015; Atashpour *et al.*, 2017).

نتایج این مطالعه نشان داد، افزودن گیاه ثعلب به جیره غذایی ماهی گورخری به طور معنی‌داری پاسخ‌های استرسی را کاهش می‌دهد، سلامت کبدی را بهبود می‌بخشد و متابولیسم بیوشیمیایی را تنظیم می‌کند که احتمالاً به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی ترکیبات فعال زیستی آن است. با این حال، افزایش ALT و تری‌گلیسرید در دوز ۲ درصد نیاز به بررسی بلندمدت دارد. در مجموع، دوز ۱ درصد ثعلب به عنوان بهترین غلظت برای کاهش استرس حمل‌ونقل و بهبود سلامت ماهی گورخری بدون اثرات منفی قابل توجه توصیه می‌شود.

منابع

Ahmadifar, E., Pourmohammadi Fallah, H., Yousefi, M., Dawood, M.A., Hoseinifar, S.H., Adineh, H., Yilmaz, S., Paolucci, M. and Doan, H.V., 2021. The gene regulatory roles of herbal extracts on the growth, immune system and reproduction of fish. *Animals*, 11, 2167. <https://doi.org/10.3390/ani11082167>

مغذی)، نقش دارد و افزایش آن می‌تواند به بهبود سلامت کبدی و پاسخ به استرس کمک کند (Banaee *et al.*, 2011). این نتیجه ممکن است به خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی ثعلب مرتبط باشد که استرس اکسیداتیو ناشی از حمل‌ونقل را کاهش می‌دهد و عملکرد کبد را بهبود می‌بخشد. کاهش ALP در گروه OM2 نسبت به OM1 ممکن است نشان‌دهنده یک آستانه دوز باشد که در آن اثرات مثبت ثعلب کاهش می‌یابد یا متابولیسم متفاوتی فعال می‌شود.

کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم AST در گروه OM2 (تغذیه شده با ۲ درصد ثعلب) احتمالاً نشان‌دهنده اثر محافظتی ثعلب بر کبد و کاهش استرس متابولیک است. AST به‌عنوان یک شاخص حساس به آسیب سلولی به‌ویژه در کبد و عضلات، شناخته می‌شود و افزایش آن معمولاً با آسیب بافتی یا استرس اکسیداتیو همراه است (Hoseini *et al.*, 2019). کاهش AST در گروه OM2 احتمالاً به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی ترکیبات فعال زیستی ثعلب (گلوکومان و فلاونوئیدها) است که می‌توانند تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را کاهش دهند و از آسیب سلولی جلوگیری کنند (Pourahmad *et al.*, 2015). در همین زمینه، مطالعات مختلف بیانگر اثرات مثبت ترکیبات افزودنی گیاهی در بهبود سلامت کبد و کاهش استرس متابولیک هستند. در این ارتباط، Safari و همکاران (۲۰۲۵) نشان دادند که افزودن ۱-۲٪ عصاره گل ختمی (*Alcea rosea*) باعث کاهش معنی‌دار سطوح سرمی ALT و AST ماهی گورخری در مقایسه با گروه شاهد شد. کاهش AST می‌تواند نشان‌دهنده بهبود سلامت کبدی و مقاومت بهتر ماهی در برابر استرس حمل‌ونقل باشد. همچنین عصاره آرتیشو (*Cynara scolymus*) سبب کاهش فعالیت کبدی ALT و AST تیلاپیی نیل (*Oreochromis niloticus*) پس از بروز استرس دمایی شد (Shohreh *et al.*, 2025).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن گیاه ثعلب به جیره غذایی ماهی گورخری تأثیر معنی‌داری بر کاهش مقادیر هورمون کورتیزول سرم پس از استرس حمل‌ونقل دارد. روند کاهش کورتیزول سرم در اثر افزایش غلظت ثعلب در جیره نشان‌دهنده اثر محافظتی این گیاه در برابر استرس است. کورتیزول به عنوان هورمون اصلی استرس در ماهیان شناخته می‌شود و افزایش آن در پاسخ به استرس‌هایی مانند جابه‌جایی از طریق فعال‌سازی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-اینترنال رخ می‌دهد (Barton and Iwama, 1991). بالاترین سطح کورتیزول در گروه شاهد

- Atashpour, S., Jahromi, H.K., Jahromi, Z.K. and Zarei, S., 2017.** Antioxidant effects of aqueous extract of Salep on Paraquat-induced rat liver injury. *World Journal of Hepatology*, 9, 209. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i4.209>.
- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R. and 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, 885-896. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9486-9>.
- Barton, B.A. and Iwama, G.K., 1991.** Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 3-26. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G).
- Bauerová, K., Ponist, S., Navarová, J., Dubnickova, M., Paulovicova, E., Pajtinka, M., Kogan, G. and Mihalová, D., 2008.** Glucomannan in prevention of oxidative stress and inflammation occurring in adjuvant arthritis. *Neuroendocrinology Letters*, 29, 691.
- Chakraborty, S.B., Horn, P. and Hancz, C., 2014.** Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 6, 1-19. <https://doi.org/10.1111/raq.12021>.
- Ciji, A. and Akhtar, M.S., 2021.** Stress management in aquaculture: A review of dietary interventions. *Reviews in Aquaculture*, 13, 2190-2247. <https://doi.org/10.1111/raq.12565>.
- El-Sayed, S.A., El-Galil, S.Y.A. and Rashied, N.A., 2014.** Effects of some herbal plants as natural feed additives in comparison with antibiotic on growth performance and immune status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture*, 4, 22-30.
- Ghafarifarsani, H., Yousefi, M., Hoseinifar, S.H., Paolucci, M., Lumsangkul, C., Jaturasitha, S. and Van Doan, H., 2022.** Beneficial effects of Persian shallot (*Allium hirtifolium*) extract on growth performance, biochemical, immunological and antioxidant responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fingerlings. *Aquaculture*, 555, 738162. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738162>.
- Guo, Q., Yang, W., Xiao, B., Zhang, H., Lei, X., Ou, H., Qin, R. and Jin, R., 2015.** Study on early biomarkers of zebrafish liver injury induced by acetaminophen. *Toxin Reviews*, 34, 28-36. <https://doi.org/10.3109/15569543.2014.1002048>.
- Hassaan, M.S., Nagar, A.G.E., Salim, H.S., Fitzsimmons, K. and El-Haroun, E.R., 2019.** Nutritional mitigation of winter thermal stress in Nile tilapia by propolis-extract: Associated indicators of nutritional status, physiological responses and transcriptional response of delta-9-desaturase gene. *Aquaculture*, 511, 734256. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734256>.
- Hoseini, S.M., Yousefi, M., Hoseinifar, S.H. and Van Doan, H., 2019.** Antioxidant, enzymatic and hematological responses of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with myrcene- or menthol-supplemented diets and exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 506, 246-255. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.048>.

- Hoseini, S.M., Hoseinifar, S.H. and Van Doan, H., 2021. Growth performance and hematological and antioxidant characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed diets supplemented with Roselle, *Hibiscus sabdariffa*. *Aquaculture*, 530, 735827. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735827>.
- Hoseinifar, S.H., Ghafarifarsani, H., Raeisi, M., Raissy, M., Safari, R., Khosraviani, K., Yousefi, M. and Van Doan, H., 2024. Effect of dietary Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica L.*) on growth performance, antioxidant status, immune response and gene expression of common carp (*Cyprinus carpio*). *Annals of Animal Science*, 24, 1277-1291. <https://doi.org/10.2478/aoas-2024-0032>.
- Hossain, M.S., Small, B.C., Kumar, V. and Hardy, R., 2024. Utilization of functional feed additives to produce cost-effective, ecofriendly aquafeeds high in plant-based ingredients. *Reviews in Aquaculture*, 16(1), 121-153. <https://doi.org/10.1111/raq.12830>.
- Hu, X., Ma, W., Zhang, D., Tian, Z., Yang, Y., Huang, Y. and Hong, Y., 2025. Application of natural antioxidants as feed additives in aquaculture: A review. *Biology*, 14, 87. <https://doi.org/10.3390/biology14010087>.
- Hürkan, K., Yüksel, M.B., Hürkan, Y.K. and Demir, N., 2019. Determination of total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of some important Salep orchids. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, 8, 191-202. <https://doi.org/10.18038/estubtdc.540879>.
- Kate, G.U., Krishnani, K.K., Kumar, N., Sukhdhane, K., Verma, A.K., Brahmane, M.P., Chadha, N.K. and Kumar, J., 2023. Abiotic and biotic stress alleviating effects of the medicinal and aromatic plant-derived product on striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 135, 108625. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108625>.
- Kurt, A., 2021. Salep glucomannan: Properties and applications. In: *Polysaccharides: Properties and Applications*. (Ed. by Ahamed, M.I., Boddula, R., Altalhi T.), pp. 177-203, Scrivener Publishing LLC, Beverly, USA.
- Li, Z., Gao, Q., Dong, S., Dong, K., Xu, Y., Mei, Y. and Hou, Z., 2024. Effects of chronic stress from high stocking density in mariculture: Evaluations of growth performance and lipid metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology*, 13, 263. <https://doi.org/10.3390/biology13040263>.
- Martos-Sitcha, J.A., Mancera, J.M., Prunet, P. and Magnoni, L.J., 2020. Welfare and stressors in fish: Challenges facing aquaculture. *Frontiers in Physiology*, 11, 162. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00162>.
- McGowan, M.W., Artiss, J.D., Strandbergh, D.R. and Zak, B., 1983. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clinical Chemistry*, 29, 538-542. <https://doi.org/10.1093/clinchem/29.3.538>.
- Montero, D., Robaina, L.E., Socorro, J., Vergara, J.M., Tort, L. and Izquierdo, M.S., 2001. Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24, 63-72. <https://doi.org/10.1023/A:1011164629660>.
- Nguyen, T.M., Mandiki, S.N.M., Tran, T.N.T., Larondelle, Y., Mellery, J., Mignolet, E.,

- Cornet, V., Flamion, E. and Kestemont, P., 2019. Growth performance and immune status in common carp (*Cyprinus carpio*) as affected by plant oil-based diets complemented with β -glucan. *Fish and Shellfish Immunology*, 92, 288-299. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.011>.
- Pourahmad, M., Jahromi, H.K. and Jahromi, Z.K., 2015. Protective effect of saleg on liver. *Hepatitis Monthly*, 15, e28137. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.28137>.
- Poursaeid, S., Falahatkar, B., Amiri, B.M. and Van Der Kraak, G., 2012. Effects of long-term cortisol treatments on gonadal development, sex steroids levels and ovarian cortisol content in cultured great sturgeon *Huso huso*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 163, 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.05.202>.
- Ribas, L. and Piferrer, F., 2014. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture*, 6, 209-240. <https://doi.org/10.1111/raq.12041>.
- Safari, R., Hoseinifar, S.H., Raeisi, M., Vakili, F., Paolucci, M., Yazici, M., Van Doan, H., Azadi, H., Hoseini, M., Abdolmanafi, M. and Ghafarifarsani, H., 2025. Unveiling the role of *Alcea rosea* in modulating growth, immunity, antioxidant defenses and gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Veterinary Research Communications*, 49, 105. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10376-7>.
- Shohreh, P., Mohammadzadeh, S., Mahboub, H.H., Ebrahimi, P., Gavzan, H., Ahmadifar, M., Moghadam, M.S., El-Haroun, E., Hoseinifar, S.H., Guerreiro, I. and Paolucci, M., 2025. The role of artichoke (*Cynara scolymus*) extract in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and digestive enzymes, effect on oxidative and immune-and antioxidant-related gene expression before and after heat stress. *Aquaculture International*, 33, 115. <https://doi.org/10.1007/s10499-024-01522-8>.
- Ulloa, P.E., Medrano, J.F. and Feijoo, C.G., 2014. Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. *Frontiers in Genetics*, 5, 313. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00313>.
- Vijayaram, S., Sun, Y.Z., Zuorro, A., Ghafarifarsani, H., Van Doan, H. and Hoseinifar, S.H., 2022. Bioactive immunostimulants as health-promoting feed additives in aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 130, 294-308. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.034>.
- Yang, S., Wu, H., He, K., Yan, T., Zhou, J., Zhao, L.L., Sun, J.L., Lian, W.Q., Zhang, D.M., Du, Z.J. and Luo, W., 2019. Response of AMP-activated protein kinase and lactate metabolism of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) under acute hypoxic stress. *Science of the Total Environment*, 666, 1071-1079. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.404>.
- Yousefi, S., Hoseinifar, S.H., Paknejad, H. and Hajimoradloo, A., 2018. The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 73, 192-196. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.022>.
- Yuan, X.C., Chen, F., Yue, D.D., Xie, S.Q., Huang, S.J., Jin, S.Z., Chen, H.T. and Yang, Y.O., 2021. Tea polyphenols act as a natural antihyperglycemic feed additive candidate in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 27, 2712-2725. <https://doi.org/10.1111/anu.13374>.