

## نقش آنتی‌اکسیدانی ویتامین C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از مسمومیت تحت حاد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با دیازینون

- محسن علی: گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، صندوق‌پستی: 4111
- علیرضا میرواقفی\*: گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، صندوق‌پستی: 4111
- هادی پوربافر: گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، صندوق‌پستی: 4111
- فرزاد اسدی‌جمانی: گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صندوق‌پستی: 1318-13145  
تاریخ دریافت: اسفند 1392 تاریخ پذیرش: خرداد 1393

### چکیده

آفت‌کش‌های ارگانوفسفره از جمله دیازینون امروزه در طیف وسیعی از فعالیت‌های کشاورزی و کنترل حشرات و آفات به‌کارگرفته می‌شوند که می‌تواند طی فرایند زهکشی وارد آب‌های سطحی و حتی سفره‌های آب زیرزمینی شوند. دیازینون می‌تواند سبب القاء استرس‌های اکسیداتیو ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) طی فرایند متابولیسم در بدن آبیان شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش آنتی‌اکسیدانی ویتامین C بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپید در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) است. در این مطالعه تعداد 60 قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی  $121 \pm 18$  گرم به 4 گروه مساوی تقسیم شدند که شامل گروه‌های: شاهد؛ تحت تیمار دیازینون (0/1 میلی‌گرم در لیتر)؛ تحت تیمار ویتامین C (300 میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و دیازینون (0/1 میلی‌گرم در لیتر)؛ تحت تیمار ویتامین C (1000 میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و دیازینون (0/1 میلی‌گرم در لیتر). نمونه‌برداری‌ها پس از گذشت مدت زمان دو و چهار هفته جهت سنجش آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، سطح آنتی‌اکسیدان کل (TAC) و شاخص مالون دی‌آلدیاید (MDA)، بر روی سرم خون آن‌ها صورت گرفت. یافته‌های این مطالعه نشان داد ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (فاقد ویتامین C در جیره) به‌طور معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) با کاهش سطح فعالیت آنزیم SOD و TAC بعد از دو هفته، و افزایش سطح فعالیت آنزیم CAT و شاخص MDA در انتهای هفته دوم و چهارم نسبت به گروه شاهد مواجه شدند. تغییرات مذکور در سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، سطح آنتی‌اکسیدان کل و شاخص MDA را می‌توان به اثرات مخرب آکسی رادیکال‌های آزاد از جمله رادیکال‌های سوپراکساید و هیدروکسیل حاصل از متابولیسم دیازینون نسبت داد. همچنین طبق نتایج به‌دست آمده دوز 1000 میلی‌گرم ویتامین C در ماهی‌های تحت تیمار دیازینون می‌تواند به‌طور معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) سبب کاهش و تعدیل سطح فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و همچنین افزایش سطح TAC و کاهش سطح MDA نسبت به گروه فاقد ویتامین شود. از طرفی دوز 300 میلی‌گرم ویتامین تأثیری بر کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT نداشت، ولی توانست سطح TAC را به‌طور موقت در انتهای هفته دوم افزایش داده و همچنین سطح MDA را در انتهای هفته چهارم کاهش دهد. در این پژوهش نقش آنتی‌اکسیدانی ویتامین C به‌عنوان یک Scavenger در فرایند حذف و پاکسازی آکسی رادیکال‌های آزاد ناشی از متابولیت‌های دیازینون؛ تعدیل سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی؛ افزایش سطح آنتی‌اکسیدان کل و همچنین کاهش آسیب‌های سلولی در پی فرایند مخرب پراکسیداسیون لیپید طی مواجهه با دیازینون مشخص شد. طبق نتایج به‌دست آمده با توجه به حضور فزاینده آلاینده‌های کشاورزی به‌خصوص سموم ارگانوفسفره در طی سال‌های اخیر در آب‌های داخلی و جاری، که منابع تامین‌کننده آب مزارع پرورشی نیز می‌باشند، در چنین شرایطی استفاده از ویتامین C با قابلیت افزودن به جیره گونه‌های پرورشی جهت افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: ویتامین C، دیازینون، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پراکسیداسیون لیپید، گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)



## مقدمه

آفت‌کش‌های ارگانوفسفره امروزه به‌جای ترکیبات ارگانوکلره در طیف وسیعی از عملیات کشاورزی و کنترل حشرات و آفات به‌کار گرفته می‌شوند. با وجود تجزیه سریع‌تر و پایداری کمتر سموم فسفره نسبت به سموم کلره همچنان شواهد زیادی دال بر پایداری و ماندگاری این ترکیبات در محیط زیست آبی و رسیدن به غلظت‌های بالا در آن‌ها وجود دارد که نهایتاً توانسته موجودات آبی اکوسیستم‌های مختلفی را تحت تأثیر قرار دهد (Zhang و همکاران، 2004؛ Hai و همکاران، 1997). دیازینون علیه طیف وسیعی از انواع حشرات، آفات خانگی و باغات، از جمله آن‌ها حشرات بالغ و نوجوان، عنکبوت‌ها، کنه‌ها، پشه‌ها، مگس‌ها و همچنین انواع کرم‌های میوه شامل گوجه، سیب، گلابی و گیلاس به‌کار گرفته می‌شود (Virtue و Clayton، 1997). علاوه بر کاربردهای مذکور این سم برای از بین بردن آفات سبزیجات، تنباکو، علوفه، گیاهان خانگی زینتی و همچنین در مناطق شهری برای از بین بردن انواع حشرات به‌کار گرفته می‌شود (Bailey و همکاران، 2000). فرمول شیمیایی دیازینون به‌صورت  $O_3$  (P S C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>) و دارای وزن مولکولی 304/35 گرم بر مول می‌باشد (WHO، 1998). طبق مطالعات صورت گرفته زمان ماندگاری (نیمه‌عمر) دیازینون در آب دریاچه‌ها به‌طور میانگین 30 روز (184-14 روز) و در رودخانه‌ها 39 روز تخمین زده شده است (Arthur و همکاران، 1983؛ Jarvinen و Tanner، 1982).

مصرف دیازینون از سال 1976 در مبارزه با کرم ساقه‌خوار برنج در شمال ایران شروع شد (Sokhansanj، 1984). براساس گزارش وزارت کشاورزی میزان مصرف سالیانه دیازینون معادل 3775 تن برآورد شد (Annual Report of performance of the Ministry of Protection Agency, Environmental Monitoring and Agriculture of Iran، 2006-2005). طی مطالعات متعدد صورت گرفته حضور این سم در بسیاری از منابع آبی داخلی ایران از جمله رودخانه‌های صفارود، ترک‌رود، تجن، بابلرود، هراز، تلارود، تجن، سیاهرود، قره‌سو، نکارود، گرگانرود، اترک واقع در استان‌های مازندران و گلستان و رودخانه‌های شاهپور، دالکی، مند در استان بوشهر از مقادیر حاد (بیش از 1 میلی‌گرم در لیتر) در روزهای اولیه مصرف در فعالیت‌های کشاورزی تا مقادیر تحت حاد آن (0/1 میلی‌گرم در لیتر) پس از گذشت چندین ماه تایید شده است (Abbasian و همکاران، 2012؛ Shayeghi و همکاران، 2001).

دیازینون به‌عنوان یک سم ارگانوفسفره آلی تماسی و گوارشی مطرح است که به‌عنوان یک سم از دسته ارگانوفسفرها از طرق مختلف پوست، آبشش و سیستم گوارش وارد بدن آبی شده و قابلیت لیپوفیلیک و حلالیت آن در چربی‌ها سبب شده که به‌راحتی از ساختار و غشاء فسفولیپیدی سلولی عبور نماید. این سم می‌تواند از طریق بافت اپیتلیال آبشش، جذب پوستی و نیز سیستم گوارشی وارد بدن ماهی شده و به‌دلیل خاصیت چربی‌دوستی می‌تواند

از داخل خون به سایر بافت‌ها منتقل شود (Vale، 1998). پس از ورود دیازینون به بدن ماهی‌ها، در مرحله بعد فرایند متابولیسم، این سم می‌تواند منجر به تولید متابولیت‌هایی شود که در ساختار آن‌ها عوامل مستعد با قابلیت تبدیل شدن به رادیکال‌های آزاد وجود دارد، که نتیجه آن افزایش بیش از حد این عوامل و برهم خوردن تعادل بین عوامل آنتی‌اکسیدان و رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود که در نهایت ایجاد استرس اکسیداتیو را به‌دنبال خواهد داشت. در تایید مطالب مذکور طی مطالعه‌ای بروز استرس اکسیداتیو در گونه‌های قزل‌آلا، نیلابیبا و کپور معمولی در مواجهه با سمیت دیازینون تایید شده است (Uner، 2006). روند تجزیه این سم در بدن ماهی‌ها بدین صورت است که در ابتدا این سم به‌وسیله فعالیت آنزیم‌های فاز اول متابولیسم، از جمله آن‌ها سایتوکروم‌های نوع CYP3A2 و CYP1A2 طی فرایند دسولفوراسیون (گوگردزدایی) به دیازوکسون (Diazoxon) تبدیل می‌شود (Schlenk، 2005). قزل‌آلای رنگین‌کمان، کپور، گویی و گورخرماهی (Zebra Fish) همگی توانایی تبدیل دیازینون به دیازوکسون را دارند (Keizer و همکاران، 1995).

به‌طور کلی می‌توان گفت در مرحله اول متابولیسم دیازینون، یک گروه قطبی فعال مثل هیدروکسیل ( $OH^-$ ) در ساختار ایزوپروپیل-هیدروکسی پریمیدین (IMP) که از جمله متابولیت‌های این سم است ایجاد می‌شود که این ترکیب الکتروفیل بوده و توانایی تشکیل ترکیبات مزدوج را برای دفع شدن دارا است.

از طرفی همین ترکیبات مستعد تبدیل شدن به رادیکال‌های آزاد اکسیژن شامل هیدروکسیل و سوپراکساید آنیون بوده که توانایی حمله به اجزاء مختلف سلولی را داراست. در کپور ماهی (Dace) هیدروکسی دیازینون و در ماهی (Yellow Tail) هیدروکسی متیل دیازینون متابولیت‌های اصلی بوده که هر دو متابولیت‌ها دارای عامل هیدروکسیل هستند (Schlenk، 2005؛ Fujii و Asaka، 1982).

به‌طور کلی انواع مختلف آفت‌کش‌های ارگانوفسفره توانایی ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال در طی آزمایشات *in vivo* و *in vitro* را دارند که از جمله مهم‌ترین آن‌ها رادیکال‌های آزاد سوپراکساید آنیون ( $O_2^-$ ) و رادیکال هیدروکسیل ( $OH^-$ ) می‌باشند که اثرات بیولوژیک خود را از طریق حمله الکتروفیلی به اجزاء و ارگان‌های موجود در ساختار سلول‌ها انجام می‌دهند (Cnubben و همکاران، 2001؛ Yang و همکاران، 2000؛ Anderson و همکاران، 1995). برای نمونه، در مطالعه‌ای گزارش شد که سموم ارگانوفسفره می‌توانند میزان پراکسیداسیون لیپید را با تأثیر مستقیم بر غشاء پلاسمایی سلول افزایش دهند (Hazarika و همکاران، 2003). از جمله محصولات فرایند پراکسیداسیون لیپید، تولید مالون دی‌آلدهاید (MDA) است که می‌تواند به‌عنوان شاخصی در تعیین سطح این فرایند طی القاء استرس اکسیداتیو کم‌کننده به‌عبارتی این ماده محصول ثانویه تولید شده و رابطه مستقیم با صدمات وارده به سلول توسط فرایند مذکور را دارد (Durmaz و همکاران، 2006).



ویتامین يك آنتی‌اکسیدان بسیار مهم در مایعات خارج سلولی (آب میان بافتی و بین سلولی)، مایع داخل سلولی (سیتوزول) بوده، به طوری که توانایی خنثی‌سازی بسیاری از آکسی-رادیکال‌ها را داراست (Bigard, 2001). در تأیید این مطلب عملکرد این ویتامین به عنوان يك عامل احیاءکننده برای بی‌اثر کردن انواع گسترده‌ای از رادیکال‌های آزاد تولید شده طی متابولیسم آفت‌کش‌ها به اثبات رسیده است (Tsao, 1997).

طی پژوهش‌های صورت گرفته افزودن ویتامین C به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند سبب خنثی‌سازی و احیای رادیکال‌های آزاد  $O_2^-$ ،  $OH^-$  و  $H_2O_2$  شده و از آسیب‌های حاصل از استرس‌های اکسیداتیو جلوگیری به عمل آورد (Verlhac و Gabaudan, 1997؛ Fujii و Asaka, 1982). از طرفی طی پژوهش‌های انجام شده این ویتامین می‌تواند از فرایند پراکسیداسیون چربی‌ها با مهار گونه‌های اکسیژن فعال در فاز آبی قبل از شروع این فرایند جلوگیری به عمل آورد (Jialal و همکاران, 1990؛ Frei و همکاران, 1988). به طور کلی استفاده از ویتامین C جهت افزایش مقاومت ماهی در برابر تنش‌های محیطی با تأثیر بر پارامتر بیوشیمیایی خون مؤثر واقع شده است. به عبارتی عملکرد اسیدآسکوربیک میتنی بر کاهش و تعدیل عملکردهای بیوشیمیایی در طی استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد که در نهایت می‌تواند میزان ROS تولید شده در بدن موجود زنده را به طرق مختلف فیزیولوژیک کاهش دهد (Fabiana و همکاران, 2007؛ Moseley و Buettner, 1993).

تاکنون مطالعات وسیعی در مورد تأثیر آفت‌کش‌ها بر روی گونه‌های مختلف جانوران صورت گرفته که نتایج به دست آمده طیف وسیعی از آسیب‌های فیزیولوژیک توسط این سموم را با توجه به نوع ترکیب شیمیایی سم، میزان و مدت زمان مواجهه با آن و نوع گونه نشان می‌دهند. برای نمونه طی مطالعه‌ای میزان شاخص MDA در ماهی‌های قزل‌آلای آلوده به سم ارگانوفسفره دیازینون افزایش یافت، همچنین سطح فعالیت آنزیم SOD نیز با کاهش مواجه شد (Celik و Isik, 2008). در مطالعه مشابه دیگری تأثیر دیازینون بر ماهی تیلپیا (*Oreochromis niloticus*) با افزایش میزان CAT و کاهش فعالیت SOD همراه بود. از طرفی نتایج این مطالعه افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید سلولی را به واسطه سنجش شاخص MDA بافت‌های مورد بررسی نشان می‌داد (Durmaz و همکاران, 2006). هم‌چنین طبق پژوهش صورت گرفته دیگری تأثیر سم ارگانوفسفره متیل پاراتیون بر کید ماهی (*Brycon cephalus*)، حاکی از افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT بوده است (Monterio و همکاران, 2009). طی مطالعات صورت گرفته تأثیر سم سیفلوترین از جمله حشره‌کش‌های پیرتروئید بر ماهی کپور معمولی و سم دیازینون بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند سبب کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل TAC در آن‌ها شود (Banaee و همکاران, 2011؛ Sepici-dinçel و همکاران, 2009).

در مقابل چنین تهدیداتی از سوی محیط ماهی‌ها نیز دارای مکانیسم‌هایی برای دفاع می‌باشند که از جمله آن‌ها می‌توان به آنزیم‌های اختصاصی دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل: سوپراکساید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) اشاره کرد که به همراه تعداد دیگری از آنزیم‌ها مجموعه‌ای از دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی را تشکیل می‌دهند که نقش پاکسازی رادیکال‌های آزاد را برعهده دارند (El-Gendy و همکاران, 1990). در این میان آنزیم سوپراکساید دیسموتاز (SOD) يك دفاع اصلی علیه رادیکال‌های سوپراکساید آنیون محسوب می‌شود و به نوعی اولین خط دفاعی علیه استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد. به طور کلی این آنزیم وظیفه تسریع تبدیل یون سوپراکساید آنیون را به اکسیژن مولکولی و هیدروژن پراکساید برعهده دارد (Das و همکاران, 1997؛ McCord و Fridovich, 1969). آنزیم کاتالاز (CAT) جزء آنزیم‌های معمول در سلول موجودات هوازی است و مکانیسم عمل آن شامل تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن است (Aebi, 1984).

از طرفی مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی شامل گروه‌های مختلف شیمیایی مثل ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها، آمینو اسیدها، پپتیدها و ... است که جهت مقابله با اثرات ضداکسیداتیو در ساختارهای مختلف سلولی مستقر شده‌اند. این عوامل به طرق مختلف سعی در مهار و جلوگیری از شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد را داشته و همگی در ایجاد وضعیت هموستازی در بدن آبرزی نقش‌های مهمی ایفا می‌کنند (Zama و همکاران, 2007). در يك جمع‌بندی کلی می‌توان گفت که تمامی عوامل آنتی‌اکسیدانی موجود در بدن موجود زنده چه آنزیم‌های درون سلولی و چه ترکیبات مغذی آنتی‌اکسیدانی (عوامل غیر آنزیمی) همگی تحت عنوان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) نامیده می‌شوند (Mahfouz و همکاران, 2009). به عبارتی این فاکتور بیوشیمیایی بیانگر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل موجود زنده جهت از بین بردن رادیکال‌های آزاد است (Miller و همکاران, 1993).

از جمله عوامل آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی ویتامین C یا اسیدآسکوربیک است که توسط اکثر حیوانات از مولکول گلوکز ساخته می‌شود. جانورانی که قادر به سنتز آن هستند این ویتامین را از مولکول‌های گلوکز و گالاکتوز می‌سازند، اما در بسیاری از ماهی‌ها به خصوص ماهیان استخوانی و از جمله آن‌ها قزل‌آلای رنگین‌کمان به علت عدم وجود آنزیم آل‌گلوکونولاکتون اکسیداز که وظیفه تبدیل گلوکز به آسکوربات را انجام می‌دهند، سنتز ویتامین نیز صورت نمی‌گیرد، و همین امر باعث شده که تأمین این ویتامین مهم و حیاتی از طریق منابع غذایی صورت گیرد (Moreau و همکاران, 1999؛ Verlhac و Gabaudan, 1997).

ویتامین C در بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک از جمله رشد، تکامل، تولیدمثل، شرکت در سنتز کلاژن، التیام زخم‌ها، پاسخ به استرسورها، ایجاد پاسخ‌های ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی دخالت دارد (Di Giulio و Meyer, 2008). اما یکی از مهم‌ترین نقش‌های حیاتی این ویتامین عملکرد آنتی‌اکسیدانی آن است. این



**مشخصات ماهی‌های مورد مطالعه، شرایط نگهداری و تیمار بندی آن‌ها:** این مطالعه در پاییز سال 1391 در کارگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. در این پژوهش تعداد 60 قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی  $121 \pm 18$  گرم و میانگین طولی  $22/9 \pm 1/6$  سانتی‌متر از ماهی‌سرای کرج خریداری شد. ماهی‌ها توسط یک مخزن 1000 لیتری که توسط آب مزرعه آب‌گیری و توسط کپسول اکسیژن هوادهی شد به 4 مخزن فایبرگلاس 300 لیتری منتقل شدند. طول دوره آدپتاسیون (سازگار نمودن) ماهی‌ها، 7 روز در نظر گرفته شد. در طول دوره آزمایش روزانه به‌میزان 10 درصد از حجم کل مخازن تعویض آب صورت گرفت. میانگین دما در کل دوره  $12/5 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد، میانگین pH آب معادل  $7/8 \pm 0/1$ ، میزان اکسیژن محلول معادل  $8 \pm 0/5$  و میزان سختی آب  $205 \pm 16$  میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم ( $\text{CaCO}_3$ ) اندازه‌گیری شد. جهت تیمار بندی، ماهی‌ها به 6 گروه 15 قطعه‌ای تقسیم شامل گروه‌های: 1- شاهد؛ 2- تحت تیمار دیازینون ( $0/1$  میلی‌گرم در لیتر)؛ 3- تحت تیمار دیازینون ( $0/1$  میلی‌گرم در لیتر) و ویتامین C به‌میزان 300 میلی‌گرم در کیلوگرم جیره؛ 4- گروه تحت دیازینون ( $0/1$  میلی‌گرم در لیتر) و ویتامین C به‌میزان 1000 میلی‌گرم در کیلوگرم جیره. گروه‌های مذکور به‌مدت چهار هفته تحت آزمایش قرار گرفتند و میزان جیره دریافتی معادل 2% وزن بدنی آن‌ها در نظر گرفته شد.

**تهیه سرم خون از نمونه‌ها:** به‌منظور بی‌هوشی ماهی‌ها طی فرایند خون‌گیری، از محلول پودر گل میخک با غلظت 100 میلی‌گرم بر لیتر یا (1:10000) استفاده شد، خون‌گیری توسط سرنگ 2 سی‌سی (فاقد ماده ضد انعقاد هیپارین) از ناحیه کمان خونی ساقه دمی انجام شد و به اپندورف‌های 2 سی‌سی منتقل شدند و جهت جداسازی سرم از سانتریفیوژ با تنظیم (4500 دور در 15 دقیقه) استفاده شد. سپس نمونه‌ها بلافاصله به فریزر با دمای  $-70$  درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند.

**سنجش آنزیم سوپراکساید دیسموتاز (SOD):** جهت سنجش آنزیم سوپراکساید دیسموتاز سرم خون به‌دست آمده از نمونه‌ها از روش Marklund استفاده شد (Marklund و Marklund، 1974). در این روش فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز بر اساس فرایند اتواکسیداسیون پیروگالول (pyrogallol) در حضور هیدروژن پراکساید ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) مورد ارزیابی قرار می‌گیرد، به‌طوری‌که باتوجه به میزان آنزیم سوپراکساید دیسموتاز موجود در سرم از میزان فرایند اتواکسیداسیون پیروگالول کاسته می‌شود، که باتوجه به کاهش جذب نوری در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 420 نانومتر این سنجش صورت می‌گیرد. بر اساس سنجش انجام شده یک واحد فعالیت آنزیمی SOD برابر است با مقدار آنزیمی که موجب مهار 50 درصدی اتواکسیداسیون پیروگالول شود.

باتوجه به تحقیقات صورت گرفته تجویز عوامل آنتی‌اکسیدانی از جمله ویتامین‌های C، E و A می‌تواند با مهار و پاکسازی رادیکال‌های آزاد باعث کاهش اثرات مخرب استرس‌های اکسیداتیو ناشی از القاء سموم فسفره و همچنین موجب تعدیل فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شوند. به‌طوری‌که در یک مطالعه استفاده از ویتامین‌های E و C در رژیم غذایی موش‌های Wistar توانست اثرات ناشی از استرس‌های اکسیداتیو القاء شده توسط دیازینون بر بافت پانکراس را بهبود بخشد (Gokalp و همکاران، 2005). در یک مطالعه مشابه بررسی اثر حفاظتی ویتامین‌های E، C و A طی مواجهه با سم دیازینون در گلبول‌های قرمز موش صحرایی، کاهش و تعدیل فعالیت آنزیم SOD به‌دنبال داشت (Shokrzadeh و همکاران، 2012). همچنین به‌کارگیری ویتامین E در جیره به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در مواجهه با سمیت مزمن آترازین در گربه‌ماهی آفریقایی ماده (*Clarias gariepinus*) توانست مقادیر آنزیم‌های CAT، SOD و میزان پراکسیداسیون لیپید LPO را در بافت کبد کاهش دهد (Kadry و همکاران، 2012).

پژوهش حاضر به‌منظور بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و تعدیل‌کننده ویتامین C افزوده شده به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ضمن مواجهه با دوز تحت حاد دیازینون، بر سطح فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، تغییر سطح آنتی‌اکسیدان کل TAC و همچنین شاخص MDA سرم خون انجام پذیرفت.

## مواد و روش‌ها

**مواد شیمیایی و دستگاه‌ها:** از دیازینون به‌شکل امولسیون 60 درصد، به‌صورت محلول در زایلون 40 درصد ساخت شرکت پرتونار (ساخت ایران) استفاده شد. برای تهیه غلظت تحت حاد ( $0/1$  میلی‌گرم در لیتر) دیازینون، محلول استوک 10 گرم در هزار لیتر آن تهیه شد (Kopruca و همکاران، 2006). این مقدار از دیازینون بر اساس  $0/1$  میزان  $\text{LC}_{50}$  آن در نظر گرفته شد (Eisler، 1986). ویتامین C مورد نیاز به‌شکل پودر ویتامین C پوشش‌دار و پایدار در آب با ساختار شیمیایی ال-آسکوربات-2- فسفات و نام تجاری Tiger C-35 ساخت شرکت چینی Tiger تهیه شد. همچنین این ویتامین دارای فرمول شیمیایی  $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6\text{P}$ ، با وزن مولکولی 256/11 گرم بر مول است. مواد شیمیایی مورد نیاز جهت سنجش‌های فاکتورهای بیوشیمیایی شامل؛ محلول پیروگالول، محلول بافرتریس، محلول پراکسید هیدروژن  $33\% \text{H}_2\text{O}_2$ ، آمونیوم مولیبدات 4%، تیوباربیتوریک اسید 67/0%، بافر فسفات نمکی ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )، بنزوات سدیم، اسیداوریک، سود (NaCl)، اسیداستیک، بوتیل هیدروکسی تولون. مواد شیمیایی مذکور از شرکت‌های سیگما، مرک خریداری شد. از دستگاه اسپکتروفتومتر Unico مدل UV-2100، حمام بخار یا بن ماری ساخت شرکت شیماز، سانتریفیوژ Genofuge مدل M16 استفاده شد.



در حمام آب جوش قرار گرفتند و پس از سپری شدن این زمان جهت سرد شدن در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند. سپس نمونه‌های به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ (3000 دور در دقیقه) شدند و در نهایت محلول رویی نمونه‌ها به آرامی جدا گردید و در طول موج 535 نانومتر میزان جذب قرانت شد. این واکنش براساس میزان مهار تیوباربیتریک اسید (TBA) توسط MDA موجود در سرم صورت گرفت. به طوری که هرچقدر سطح MDA افزایش یابد میزان مهار (TBA) بیشتر شده در نتیجه رنگ کمتری در محلول تولید شده و جذب نوری نیز کاهش می‌یابد.

**تجزیه و تحلیل آماری:** تجزیه و تحلیل آماری به روش آنالیز واریانس یکطرفه و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 16 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون آماری توکی (Tukey) در سطح اطمینان 95 درصد و سطح معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) انجام شد. میانگین داده‌ها ( $S.D \pm Mean$ ) با استفاده از نمودار میله‌ای و با نرم‌افزار EXCEL 2007 رسم و اختلاف بین تیمارها با حروف الفبای انگلیسی نشان داده شد.

### نتایج

**بررسی سطح فعالیت آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (SOD):** نتایج به‌دست آمده از تاثیر دیازینون بر سطح فعالیت آنزیم SOD در انتهای هفته دوم نشان داد که سطح این آنزیم در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) نسبت به گروه شاهد دارای کاهش معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). از طرفی طی هفته چهارم کاهش سطح SOD در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) جبران شد به طوری که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت (شکل 1). همچنین یافته‌های به‌دست آمده از تاثیر ویتامین C بر سطح فعالیت SOD در انتهای هفته دوم و چهارم نشان می‌دهد گروه تحت تیمار ویتامین  $C_{300}$ +دیازینون، فاقد اختلاف معنی‌داری با گروه دیازینون (DZN) بود. از طرفی سطح فعالیت این آنزیم در ماهی‌های تحت تیمار ویتامین  $C_{1000}$ +دیازینون دارای کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) نسبت به ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (DZN) در هفته دوم بود (شکل 1).

### سنجش آنزیم کاتالاز (CAT): جهت سنجش آنزیم

کاتالاز سرم خون از روش Goth استفاده شد (Goth, 1991). در این روش ابتدا سرم خون نمونه‌ها با محلول پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) به مدت 10 دقیقه (در دمای اتاق) در مجاورت هم قرار گرفتند، سپس از محلول آمونیوم مولیبدات ( $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ ) جهت توقف فرایند اکسیداسیون جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد. براساس این روش هرچقدر میزان فعالیت این آنزیم در سرم بیشتر باشد جذب نوری نمونه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد در طول موج 410 نانومتر کاهش می‌یابد. در این روش هر واحد فعالیت آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند 1 میلی‌مول آب اکسیژنه ( $H_2O_2$ ) را طی مدت زمان یک ثانیه متلاشی کند.

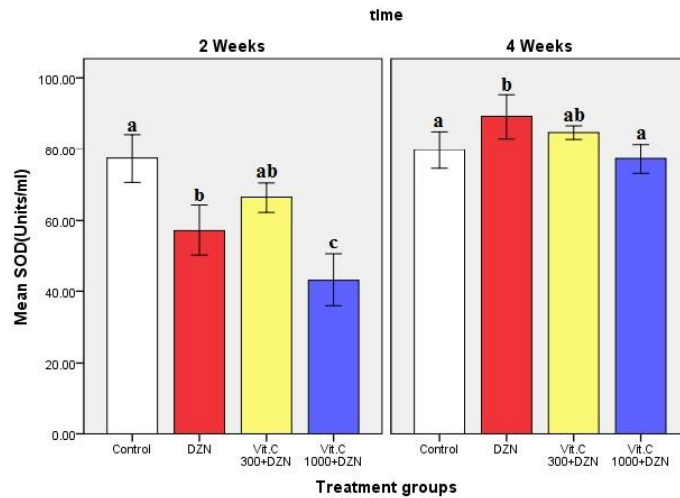
### روش سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC):

جهت سنجش سطح آنتی‌اکسیدان کل از روش FRAP (Ferric-reducing ability of plasma assay) استفاده شد (Koracevic و همکاران، 2001). براساس این روش در ابتدا محلول استاندارد شده کمپلکس Fe-EDTA با پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) در طی واکنش فنتون (Fenton) رادیکال‌های هیدروکسیل تولید کرده، سپس اکسیژن فعال حاصله موجب آزاد شدن تیوباربیتریک اسید (TBA) که یک اسید واکنش‌پذیر است می‌شود. در این روش با توجه به مجموع آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه سرم مورد آزمایش تولید (TBA) مهار شد، به طوری که کاهش جذب نوری در طول موج 532 نانومتر به‌دنبال کاهش تولید رنگ صورت گرفت.

### سنجش میزان پراکسیداسیون لیپید (LPO) با استفاده

از شاخص مالون دی‌الدهاید (MDA): جهت سنجش شاخص (MDA) از روش Ledwozyw استفاده شد (Ledwozyw و همکاران، 1986). در این روش 1 میلی-لیتر نمونه سرم تهیه شده با 2 میلی‌لیتر محلول تری-کلرواستیک اسید، تیوباربیتریک اسید (TBA) و اسید هیدروکلرویک ضمن شرایط اسیدی مخلوط شدند سپس توسط آب مقطر تا حجم 200 میلی‌لیتر رقیق شدند. در مرحله بعد لوله‌های حاوی این محلول طی مدت 30 دقیقه



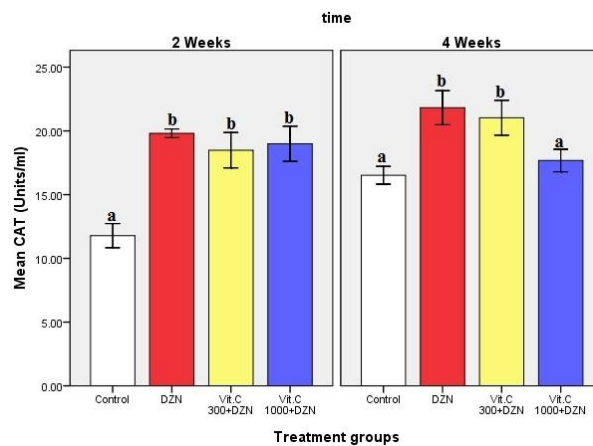


شکل 1: نمودار تغییر سطح فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز در سرم خون ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (0/1 میلی‌گرم در لیتر) و ویتامین C (300 و 1000 میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) پس از گذشت دو و چهار هفته. تعداد 5 قطعه ماهی از هر گروه نمونه‌برداری شدند. حروف متفاوت (a,b,c,d) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) و حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشند.

(DZN) و ماهی‌های تحت تیمار ویتامین  $C_{300}$  و ویتامین  $C_{1000}$  نشان ندادند. از طرفی در هفته چهارم سطح آنزیم CAT در ماهی‌های تحت تیمار ویتامین  $C_{1000}$  نسبت به گروه‌های دیازینون (DZN) و ویتامین  $C_{300}$  دارای کاهش معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ), درحالی‌که بین گروه تحت تیمار ویتامین  $C_{300}$  و گروه دیازینون اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل 2).

#### بررسی سطح فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): نتایج

نشان دادند تاثیر دوز تحت حاد دیازینون در انتهای هفته دوم موجب افزایش سطح فعالیت CAT در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) نسبت به گروه شاهد شد، همچنین در انتهای هفته چهارم نیز افزایش سطح فعالیت CAT در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ) (شکل 2). همچنین یافته‌های به‌دست آمده از تاثیر ویتامین C افزوده شده به جیره بر سطح فعالیت CAT در انتهای هفته دوم، اختلاف معنی‌داری بین گروه دیازینون



شکل 2: نمودار تغییر سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در سرم خون ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (0/1 میلی‌گرم در لیتر) و ویتامین C (300 و 1000 میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) پس از گذشت دو و چهار هفته. تعداد 5 قطعه ماهی از هر گروه نمونه‌برداری شدند. حروف متفاوت (a,b,c,d) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) و حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است.

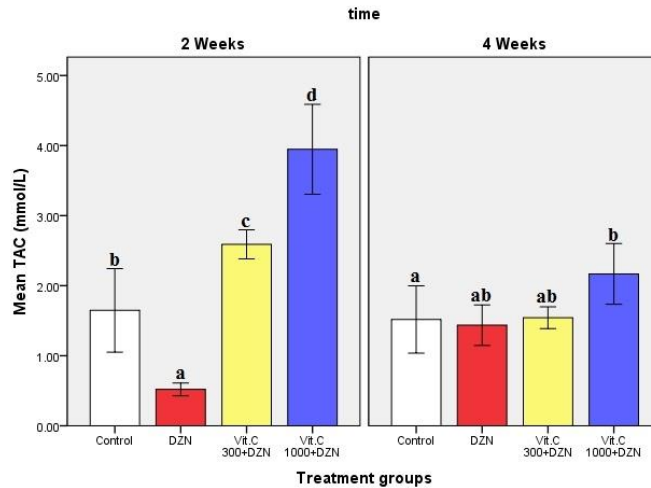
TAC در گروه تحت تیمار دیازینون اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت (شکل 3). همچنین بررسی‌های انجام شده بر روی تاثیر ویتامین C بر فعالیت این شاخص نشان می‌دهد، در انتهای هفته دوم سطح TAC در ماهی‌های تحت تیمار ویتامین  $C_{300}$  و ویتامین  $C_{1000}$  دارای افزایش

#### بررسی سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (TAC): نتایج

به‌دست آمده در انتهای هفته دوم نشان می‌دهند، طی الفاء دیازینون میزان فعالیت TAC در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) با کاهش معنی‌دار نسبت به گروه شاهد مواجه شد ( $P < 0/05$ ). از طرفی در انتهای هفته چهارم کاهش سطح

بالا تری از آنتی اکسیدان کل نسبت به گروه های ویتامین C<sub>300</sub> و دیازینون (DZN) بود ولی این افزایش سطح معنی دار نبود (P<0/05) (شکل 3).

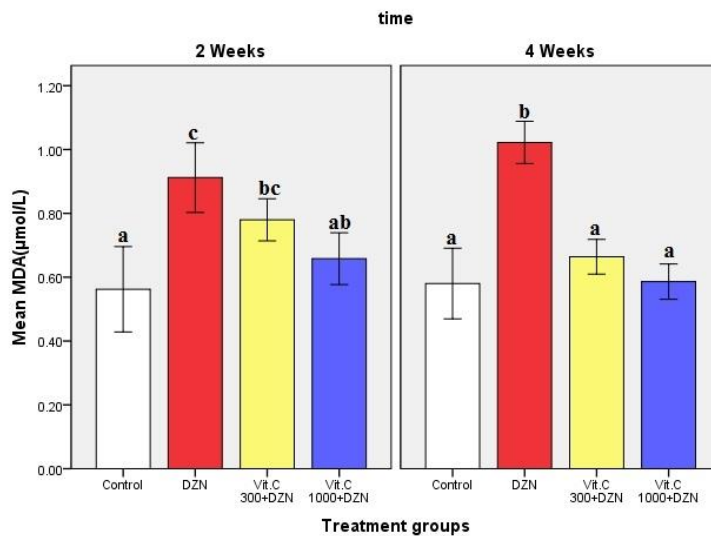
معنی دار (P<0/05) نسبت به گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) بود. ولی یافته ها در انتهای هفته چهارم نشان داد ماهی های تحت تیمار ویتامین C<sub>1000</sub> هر چند دارای سطح



شکل 3: نمودار تغییر سطح ظرفیت آنتی اکسیدان کل در سرم خون ماهی های تحت تیمار دیازینون (0/1 میلی گرم در لیتر) و ویتامین C (300 و 1000 میلی گرم در کیلوگرم جیره) پس از گذشت دو و چهار هفته. تعداد 5 قطعه ماهی از هر گروه نمونه برداری شدند. حروف متفاوت (a,b,c,d) نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار (P<0/05) و حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروه ها می باشند.

دیازینون (DZN) نسبت به گروه شاهد شد، همچنین یافته های هفته چهارم نشان داد سطح MDA در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) نسبت به گروه شاهد دارای افزایش معنی دار بود (شکل 4).

بررسی سطح شاخص مالون دی آلد هایید (MDA) طی فرایند پراکسیداسیون لیپید: نتایج به دست آمده از سنجش های هفته دوم نشان دادند القاء دیازینون سبب افزایش معنی دار (P<0/05) سطح MDA در گروه تحت تیمار



شکل 4: نمودار تغییر سطح شاخص مالون دی آلد هایید در سرم خون ماهی های تحت تیمار دیازینون (0/1 میلی گرم در لیتر) و ویتامین C (300 و 1000 میلی گرم در کیلوگرم جیره) پس از گذشت دو و چهار هفته. تعداد 5 قطعه ماهی از هر گروه نمونه برداری شدند. حروف متفاوت (a,b,c,d) نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار (P<0/05) و حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروه ها است.

MDA در گروه ویتامین C<sub>300</sub> اختلاف معنی داری با دو گروه دیگر نداشت. ولی نتایج هفته چهارم نشان می دهد که گروه های تحت تیمار ویتامین C<sub>300</sub> و C<sub>1000</sub> هر دو با کاهش معنی دار (P<0/05) سطح MDA نسبت به

همچنین یافته های به دست آمده از تاثیر ویتامین C بر سطح شاخص MDA نشان داد، در انتهای هفته دوم ماهی های دریافت کننده ویتامین C<sub>1000</sub> با کاهش معنی دار سطح MDA نسبت به ماهی های تحت تیمار دیازینون (DZN) مواجه شدند (P<0/05). در حالی که سطح



ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (DZN) مواجه شدند (شکل 4).

## بحث

در مطالعه حاضر اثرات اکسیداتیو ناشی از القاء دوز تحت حاد دیازینون بر فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و هم-چنین ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل TAC و شاخص MDA مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین به بررسی تاثیر ویتامین C در سطوح 300 و 1000 میلی‌گرم در هر کیلوگرم از جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر سطح فعالیت فاکتورهای بیوشیمیایی مذکور طی القاء حشرمکش دیازینون پرداخته شد.

نتایج به‌دست آمده نشان داد القاء دیازینون (0/1 میلی‌گرم در لیتر) می‌تواند منجر به کاهش سطح فعالیت آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (SOD) به‌دلیل افزایش رادیکال‌های سوپر اکساید آنیون - O<sub>2</sub> حاصل از متابولیت‌های دیازینون شود، که دلیل آن مصرف SOD در جهت خنثی کردن عوامل اکسیداتیو است. طی مطالعه‌ای قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه با دیازینون با غلظت‌های 0/5-1 میلی‌گرم در لیتر در طی مدت 24، 48 و 72 ساعت با کاهش سطح SOD مواجه شد (Celik و Isik، 2008). همچنین در مطالعه مشابه دیگری تاثیر دیازینون در غلظت‌های 0/1 و 1 میلی‌گرم در لیتر بر ماهی تیلاپیا (*Tilapia*) طی دو هفته با کاهش سطح SOD همراه بود (Durmaz و همکاران، 2006).

از طرفی یافته‌های پژوهش حاضر در انتهای هفته چهارم نشان می‌دهند که سطح SOD در نمونه‌های تحت تیمار دیازینون (DZN) نسبت به هفته دوم افزایش می‌یابد به نحوی که در مقایسه با گروه شاهد فاقد اختلاف معنی‌دار می‌شود.

علت این افزایش ممکن است به‌دلیل تولید مداوم سوپر اکساید آنیون - O<sub>2</sub> در سلول‌ها و القاء و تحریک مجدد سلول برای تولید آنزیم بوده، همچنین با توجه به دوز تحت حاد دیازینون ماهی‌های تحت تیمار سعی در ایجاد پاسخ‌های جبرانی و تطابقی سلول با افزایش سطح این آنزیم دارند. افزایش بیش از حد رادیکال‌های - O<sub>2</sub> تولید شده در نمونه‌های بافت ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) ضمن مواجهه با سم ارگانو فسفره کلرپیریفوس (*chlorpyrifos*) طی مدت 30 روز توانسته موجب افزایش معنی‌دار در سطح SOD شود (Oruc، 2010).

نتایج به‌دست آمده از سنجش آنزیم کاتالاز نشان می‌دهند ماهی‌های تحت تیمار دیازینون در هفته‌های دوم و چهارم پس از مواجهه با سم دچار افزایش سطح آنزیم کاتالاز شدند که نشان‌دهنده افزایش مقادیر پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) است، که یکی از دلایل آن می‌تواند فعالیت آنزیم SOD در خنثی‌سازی رادیکال‌های سوپر اکساید باشد. به‌عبارتی دیگر پراکسید هیدروژن تولید شده توسط آنزیم SOD بایستی در مرحله بعد توسط کاتالاز تجزیه شود. یعنی

نوع خاص متابولیسم این سم در تولید آکسی رادیکال‌های آزاد در داخل سلول منجر به افزایش سطح آنزیم CAT می‌شود. طبق یک پژوهش القاء دوز تحت حاد سموم آترازین (*Atrazin*) و کلرپیریفوس (*chlorpyrifos*) به‌صورت مجزا و ترکیبی بر بافت کبد و آبشش ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پس از گذشت 40 روز باعث افزایش سطح فعالیت CAT شد (Xing و همکاران، 2012). در مطالعه مشابه دیگر افزایش سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در طی مصرف دیازینون در موش‌های صحرایی در بافت‌های قلب و گلبول قرمز گزارش شده است (Akturk و همکاران، 2006). همچنین براساس مطالعه‌ای تجویز خوراکی دیازینون به موش‌ها می‌تواند سبب افزایش غلظت رادیکال آزاد اکسیژن و به‌دنبال آن تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی خون شود (El-Abdou و Mazoudy، 2007).

از جمله یافته‌های دیگر این مطالعه کاهش سطح آنتی‌اکسیدان کل TAC سرم خون ماهی‌های تحت تیمار دیازینون نسبت به گروه شاهد پس از گذشت دو هفته است که می‌توان آنرا ناشی از تولید مداوم رادیکال‌های آزاد حاصل از متابولیسم دیازینون دانست، به‌عبارتی کاهش سطح TAC به‌دنبال فرایند پاک‌سازی و مهار رادیکال‌های آزاد توسط عوامل آنزیمی و غیر آنزیمی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و مصرف این عوامل ایجاد می‌شود. در طی یک بررسی تاثیر غلظت‌های تحت حاد دیازینون بر سلول‌های هپاتوسیت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) موجب کاهش سطح TAC شد (Bannaee و همکاران، 2011). در یک مطالعه مشابه القاء دیازینون بر موش‌های مورد آزمایش موجب کاهش سطح آنتی‌اکسیدانی کل در بافت عضله نمونه‌های تحت تیمار شد (Amirkabirian و همکاران، 2007). به‌طور کلی براساس تحقیقات صورت گرفته تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد در طول فرایند سم‌زدایی آفت‌کش‌ها می‌تواند با کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در سلول‌های کبد همراه شود. به‌عبارتی دیگر با افزایش فرایندهای اکسیداتیو توسط گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نیز کاهش می‌یابد (Turkez و Togar، 2011؛ Monteiro و همکاران، 2006). از طرفی یافته‌های پژوهش حاضر در پایان هفته چهارم افزایش سطح TAC نسبت به هفته دوم را نشان داد به‌طوری‌که با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. دلیل این جبران در سطح TAC ممکن است به‌دلیل افزایش سطح آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکساید دیسموتاز در هفته چهارم دانست، چرا که به‌واسطه دوز تحت حاد دیازینون امکان پاسخ‌های جبرانی و تطابقی سلول‌ها برای رسیدن به نوعی هموستازی فراهم شده است. طی برخی پژوهش‌های صورت گرفته، در سیستم‌های بیولوژیک افزایش سطح آنتی‌اکسیدانی کل در نتیجه استرس‌های اکسیداتیو می‌تواند به‌دنبال افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط مکانیسم دفاع سلولی برای رسیدن به حالت هموستازی و به‌نوعی آداپتاسیون در مقابله





تأثیر تعدیل‌کننده‌ای برفعالیت آنزیمی دفاع آنتی‌اکسیدانی خواهد داشت (Deshpande و همکاران، 1996؛ Sies و Stahl، 1995).

در یک مطالعه نقش ویتامین C به‌عنوان آنتی‌اکسیدان جهت حفاظت از استرس اکسیداتیو القاء شده به‌وسیله آفت-کش ایمیداکلوپراید (Imidacloprid) در بافت کبد موش‌های جنس نر آلبینو سونبسی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد استفاده از ویتامین C در جیره قبل و بعد از مواجهه با این آفت‌کش می‌تواند سبب تعدیل فعالیت‌های SOD و CAT در بافت کبد شود (El-Gendy و همکاران، 2010). همچنین در یک پژوهش تأثیر ویتامین E در جیره به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در مواجهه با سمیت مزمن آترازین (Atrazin) در گربه‌ماهی آفریقایی ماده (Clarias gariepinus) در بافت کبد موجب کاهش سطح آنزیم‌های SOD و CAT شد (Jialal و همکاران، 1990). نتایج به-دست آمده از این پژوهش با نتایج مطالعات تعدادی از پژوهشگران مطابقت داشت (Singh و همکاران، 2011؛ El-Gharieb و همکاران، 2010).

از طرفی یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهند که استفاده از ویتامین C به‌عنوان بخش آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی می‌تواند موجب افزایش سطح آنتی‌اکسیدان کل (TAC) در ماهی‌های تحت تیمار دیازینون شود. به‌طور کلی از آنجائی‌که بخش غیرآنزیمی دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول از جمله ویتامین‌ها سهم اساسی و مهمی از میزان (TAC) را به‌خود می‌دهند، در نتیجه افزایش مقدار این بخش از دفاع سلولی در پی استفاده از مکمل‌های ویتامین و به‌خصوص ویتامین C می‌تواند نقش اساسی در جهت افزایش سطح دفاع آنتی-اکسیدانی کل سلول ایفاء کند.

به‌طور کلی می‌توان گفت که آنتی‌اکسیدان کل، مجموعه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های موجود در سلول موجود زنده و شاخصی برای بیان کل مقادیر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی است (Cao و Prior، 1999). به-عبارتی دیگر TAC وابسته به فعالیت یک یا دو آنزیم نیست و علاوه بر آنزیم‌های داخل سلولی، مجموعه‌ای از ویتامین C، E، آلبونین، بتاکاروتن و غیره را نیز در برمی‌گیرد (Miller و همکاران، 1993). طبق پژوهشی که توسط Winston و همکاران (1998) صورت گرفت اعتقاد بر این است که گلوکاتایون، اسیدآسکوربیک (ویتامین C)، یوریک اسید و ویتامین E در حدود 70 درصد از سهم آنتی‌اکسیدانی کل را به‌خود اختصاص می‌دهند.

طی یک مطالعه توسط Geetha و همکاران (2010) استفاده از مکمل عصاره جلبک کلرلا به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در جیره کفال خاکستری (*Mugil sephalus*) در محیط پرورش می‌تواند موجب افزایش سطح آنتی-اکسیدان کل TAC شود. همچنین طی مطالعه دیگری تأثیر حفاظتی عصاره گیاه شیرین‌بیان (*Liquorice plant*) در سمیت ناشی از تترا کلرید کربن (CCL4) در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد بررسی قرار گرفت این مطالعه نشان داد که

با تنش‌های اکسیداتیو باشد (Castillo و همکاران، 2006؛ Kohen و همکاران، 2000).

از جمله یافته‌های دیگر این مطالعه بررسی میزان آسیب‌های سلولی تحت عنوان پراکسیداسیون لیپید (LPO) طی القاء دیازینون است که میزان آن توسط شاخص MDA سنجیده شد. براساس سنجش سطح MDA سرم خون نمونه‌ها طی هفته‌های دوم و چهارم، افزایش سطح این شاخص در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) نسبت به گروه شاهد مشاهده شد، که نشان‌دهنده بالارفتن سطح پراکسیداسیون لیپید در سلول است. دلیل این افزایش را می‌توان تولید رادیکال‌های هیدروکسیل (OH<sup>-</sup>) به‌عنوان یک اکسید کننده قوی و عامل کلیدی در شروع فرایند اکسیداسیون لیپیدها دانست که این عوامل طی فرایند متابولیسم دیازینون حاصل می‌آیند.

طبق مطالعات انجام گرفته آگاهی از فرایند مخرب پراکسیداسیون چربی‌ها با استفاده از سنجش و اندازه‌گیری محصولات حاصل از این فرایند همچون آلدنیدها، استن و مالون‌دی‌آلد‌هاید (MDA) است. در این میان بالا رفتن سطح MDA می‌تواند نمایانگر افزایش پراکسیداسیون لیپید و آسیب به غشاء سلول باشد (Valavanidis و همکاران، 2006؛ De Zwart و همکاران، 1999). از جمله عوامل مهم در ایجاد پراکسیداسیون لیپیدها می‌توان به سموم ارگانوفسفره اشاره کرد که می‌توانند میزان پراکسیداسیون لیپید را با تأثیر بر غشاء پلاسمایی سلول افزایش دهند. برای مثال تجزیه دیازینون می‌تواند سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن از جمله یون‌های سوپراکساید آنیون و رادیکال قوی هیدروکسیل را کرده و موجبات افزایش سطح MDA را فراهم آورد (Abdou و El-Mazoudy، 2007؛ Hazarika و همکاران، 2003).

از جمله اهداف دیگر این مطالعه استفاده از ویتامین C به‌منظور کاهش اثرات مخرب اکسیداتیو بر ماهی‌های تحت تیمار دیازینون بود. نتایج به‌دست آمده از سنجش آنزیم‌های SOD و CAT نشان دادند که ویتامین C می‌تواند موجبات کاهش و تعدیل سطح فعالیت این دو آنزیم را فراهم آورد. در واقع تعدیل سطح فعالیت‌های آنزیم‌های مذکور را می‌توان

به‌واسطه نقش این ویتامین در فرایند خنثی‌سازی رادیکال آزاد سوپراکساید آنیون (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) دانست که به‌دنبال آن کاهش سطح فعالیت دو آنزیم مذکور را باعث می‌شود. به‌طور کلی عملکردهای بیولوژیک اسیدآسکوربیک مبتنی بر توانایی آن بر کاهش و تعدیل واکنش‌های بیوشیمیایی در طی استرس-های اکسیداتیو بوده است، به‌طوری‌که این ویتامین می‌تواند میزان گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را که از طرق مختلف فیزیولوژیک ایجاد شده‌اند کاهش دهد (Castillo و همکاران، 2006). همچنین طی تحقیقات انجام شده ویتامین C با خصوصیت الکترون‌دهی به‌عنوان یک احیا کننده، مهار کننده و رُباینده (Scavenger) گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) عمل می‌کند، به‌عبارتی فرم آسکوربات ویتامین C می‌تواند تا دو مرحله الکترون‌دهی را جهت خنثی‌سازی و احیاء آکسی رادیکال‌ها انجام دهد. بدین ترتیب این ترکیب



گروه‌های تغذیه شده با ویتامین‌های E و C به‌طور معنی‌دار کاهش پیدا کرد (Gokalp و همکاران، 2005).

در یک جمع‌بندی کلی القاء دوز تحت حاد دیازینون (0/1 میلی‌گرم در لیتر) می‌تواند موجب کاهش سطح آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (SOD) و سطح آنتی‌اکسیدان کل (TAC)، همچنین افزایش سطح آنزیم کاتالاز (CAT) شود، همچنین در بررسی آسیب‌های سلولی در ماهی‌های تحت تیمار دیازینون، افزایش سطح شاخص MDA مشاهده شد. از طرفی استفاده از ویتامین C با دوز 1000 میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا می‌تواند به‌عنوان یک عامل تقویت‌کننده سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، موجب تعدیل و کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و افزایش سطح آنتی‌اکسیدان کل (TAC) شود. از طرفی با بررسی نتایج به‌دست آمده از شاخص MDA، مشخص شد که دوز 1000 میلی‌گرم ویتامین می‌تواند به شکل کاملاً موثری موجب کاهش سطح پراکسیداسیون لیپید شود. از طرفی استفاده از دوز 300 میلی‌گرم ویتامین نمی‌تواند سبب تعدیل و کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT شود. از طرفی این سطح از ویتامین با اثر بخشی کمتر در مقایسه با دوز 1000 میلی‌گرم ویتامین، در نهایت می‌تواند موجب افزایش سطح آنتی‌اکسیدان کل (TAC) و همچنین کاهش سطح پراکسیداسیون لیپید شود.

حال باتوجه به‌حضور آلاینده‌ها به‌خصوص سموم کشاورزی و آفت‌کش‌ها در منابع آب‌های داخلی و اثرات مخرب ناشی از این‌گونه ترکیبات بر گونه‌های مختلف ماهیان که در طی مقالات متعدد به آن پرداخته شده است در چنین شرایطی به‌کارگیری یک ماده مناسب دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی در رژیم غذایی گونه‌های پرورشی جهت افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

### تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با استفاده از امکانات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران و آزمایشگاه آذر تهران به انجام رسید، از تمامی کسانی که در انجام این طرح یاری کردند تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

### منابع

1. Abbasian, H.; Ashayeri, A.; Meigooni, H.G. and Hosseinmarzeh, S., 2012. Aquatic ecosystem pollution and ecological impacts of agricultural sewage in the Caspian Sea watershed. *J. Ecol. Nat. Environ.* Vol. 4, No. 9, pp: 241-246.
2. Abdou, H.M. and El-Mazoudy, R.H., 2007. Myotoxic and hyperlipidemic effects of diazinon in female rats. *JMRI.* Vol. 28, No. 3, pp: 292-298.
3. Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* Vol. 105, pp: 121-126.
4. Akturk, O.; Demirin, H.; Sutcu, R.; Yilmaz, N.; Koylu, H. and Altuntas, I., 2006. The

به‌دنبال استفاده از این ترکیب آنتی‌اکسیدان سطح TAC به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Malekinejad و همکاران، 2010).

باتوجه مطالب مذکور می‌توان گفت که سطح آنتی‌اکسیدان کل به‌نوعی توانایی موجود زنده در حذف و پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد را نشان می‌دهد به‌طوری‌که، هر چقدر سطح TAC افزایش یابد توانایی موجود زنده جهت خنثی‌سازی و مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش می‌یابد (Karaoz و همکاران، 2002).

نتایج آزمایشات حاضر نشان داد که استفاده از ویتامین C می‌تواند سبب کاهش سطح شاخص MDA و در نتیجه آسیب‌های ناشی از فرایند پراکسیداسیون لیپید شود. دلیل این کاهش را می‌توان دو ویژگی مهم و اساسی ویتامین C دانست که عبارت است از ویژگی Scavenger یا همان عملکرد پاک‌سازی این ویتامین در حذف رادیکال‌های آزاد به‌خصوص رادیکال هیدروکسیل و ویژگی دیگر احیای مجدد رادیکال ویتامین E تحت عنوان توکوفرول‌کسیل که نقش بسیار حیاتی و مهم در ممانعت از فرایندهای اکسیداسیون لیپیدها برعهده دارد.

تأثیر استفاده از ویتامین C در محافظت از پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک در مقابل حمله رادیکال‌های آزاد در طول سوخت و ساز طبیعی بدن در جانوران به‌اثبات رسیده است (Maxwell و Jakeman، 1993). در تائید نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر، طی مطالعه مشابهی نقش ویتامین C در جهت حفاظت از استرس اکسیداتیو القاء شده توسط سم ایمیداکلوپراید (Imidaclopride) در کبک موش‌های نر مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان می‌دهد استفاده از ویتامین در جیره خوراکی موش‌ها قبل و بعد از مواجهه با سم سبب کاهش سطح (MDA) می‌شود (El-Gendy و همکاران، 2010). همچنین استفاده از لیکوپین در جیره کبک معمولی (*Cyprinus carpio*) که یک ماده کاروتنوئیدی و آنتی‌اکسیدان است، توانست اثرات (LPO) ناشی از سم ارگانوفسفره کلرپیریفوس (chlorpyrifos) را کاهش دهد (Ural، 2013).

از طرفی طبق تحقیقات صورت گرفته ویتامین C به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم و قابل‌حل در آب مطرح است که توانایی احیای ویتامین E از فرم توکوفرول‌کسیل (Tocopheroxyl radical) را داشته و با این عمل ظرفیت پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد را در حالت و وضعیت مناسبی حفظ می‌کند (Benzie و همکاران، 1999). به‌عبارتی دیگر ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم مسئول پایان دادن به واکنش‌های زنجیره‌ای در فرایند اکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده (Polyunsaturated fatty acid) است (Liu و Lu، 2002). در جهت تایید مطالب مذکور نقش ویتامین‌های C و E به‌صورت ترکیبی بر ضدسمیت دیازینون در بافت پانکراس موش Wistar مورد بررسی قرار گرفت که طی آن میزان MDA در گروه‌های فاقد ویتامین افزایش یافت در حالی‌که سطح این شاخص در



15. **Castillo, C.; Hernandez, J.; Valverde, I.; Pereira, V.; Sotillo, J.; Lopez Alonso, M. and Benedito, J.L., 2006.** Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* Vol. 80, pp: 133-139.
16. **Cnubben, N.H.P.; Rietjens, I.M.C.M.; Wortelboer, H.; Van Zenden, J. and Van Bladeren, P.J., 2001.** The interplay of glutathione related processes in antioxidant defence. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* Vol. 10, pp: 141-152.
17. **Das, K.C.; Lewis-Molock, Y. and White, C.W., 1997.** Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* Vol. 17, pp: 713-726.
18. **Deshpande, S.S.; Deshpande, U.S. and Salunkhe, D.K., 1996.** Nutritional and health aspects of food antioxidants. In: *Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives*, D.L. Madhavi, S.S. Deshpande and D.K. Salunkhe (Eds.), Marcel Dekker. New York. pp: 361-470.
19. **De Zwart, L.; Meerman, J.; Commandeur, J. and Vermeulen, N., 1999.** Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Medic.* Vol. 26, pp: 202-226.
20. **Di Giulio, R.T. and Meyer, J.N., 2008.** Reactive oxygen species and oxidative stress. In: *Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), the Toxicology of Fishes.* CRC Press, Boca Raton, FL. pp: 273-324.
21. **Doba, T.; Burton, G.W. and Ingold, K.U., 1985.** Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta.* Vol. 835, No. 2, pp: 298-303.
22. **Durmaz, H.; Sevgiler, Y. and Uner, N., 2006.** Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in oreochromis niloticus. *Pest. Biochem. Physiol.* Vol. 84, pp: 215-26.
23. **Eisler, R., 1986.** Diazinon Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC. Biological Report No. 85.
24. **El-Gendy, K.S.; Ahmed, N.S.; Aly, N.M.; Saber, N. and El-Sebae, A.H., 1990.** Effect of some pesticides on the antioxidant enzymes effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat heart and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. *Cell Biol Toxicol.* Vol. 22, No. 6, pp: 455-461.
5. **Amirkabirian, N.; Teimouri, F.; Esmaily, H.; Mohammadirad, A.; Aliahmadi, A. and Abdollahi, M., 2007.** Protection by pentoxifylline of diazinon-induced toxic stress in rat liver and muscle. *Toxicol Mech Methods.* Vol. 17, No. 4, pp: 215-221.
6. **Anderson, C.; Hehr, A.; Robbins, R.; Hasan, R.; Athar, M.; Mukhtar, H.; Elmets, C.A.; Fong, T.A.; Mosmann, T.R. and Xu, H., 1995.** Metabolic requirements for induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons. *J. Immunol.* Vol. 155, pp: 3530-3537.
7. **Annual Report of performance of the Ministry of Agriculture of Iran. 2005-2006.** pp: 215-217.
8. **Arthur, J.W.; Zischke, J.A.; Allen, K.N. and Hermanutz, R.O., 1983.** Effects of diazinon on macroinvertebrates and insect emergence in outdoor experimental channels. *Aquat. Toxicol.* Vol. 4, pp: 283-301.
9. **Attia, A.M. and El-Demerdash, F.M., 2002.** Potent protective effects of melatonin on cypermethrin induced oxidative damage in rats in vivo. *J. Pest. Cont. Environ. Sci.* Vol. 10, pp: 91-104.
10. **Bailey, H.C.; Deanovic, L.; Reyes, E.; Kimball, T.; Larson, K.; Cortright, V.; Connor, F. and Hinton, D.E., 2000.** Diazinon and chlorpyrifos in urban waterways in northern California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 19, No. 1, pp: 82-87.
11. **Banaee, M.; Sureda, A.; Mirvaghefi, A.R. and Ahmadi, K., 2011.** Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology.* Vol. 99, pp: 1-6.
12. **Benzie, I.F.F.; Chung, W.Y. and Strain, J.J., 1999.** Antioxidant (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *J. Nutr. Biochem.* Vol. 10, pp: 146-150.
13. **Bigard, A.X., 2001.** Lesions musculaires induites par l'exercice et surentrainement. *Sci. Sports.* Vol. 16, pp: 204-215.
14. **Buettner, G.R. and Moseley, P.L., 1993.** EPR spin trapping of free radicals produced by bleomycin and ascorbate. *Free Radic Res Commun.* Vol. 19, pp: S89-S93.



35. **Isik, I. and Celik, I., 2008.** Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Vol. 92, pp: 38–42.
36. **Jakeman, P. and Maxwell, S., 1993.** Effect of antioxidant vitamin supplementation on muscle function after eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* Vol. 67, pp: 426–430.
37. **Jarvinen, A.W. and Tanner, D.K., 1982.** Toxicity of selected controlled release and corresponding unformulated technical grade pesticides to the fathead minnow *Pimephales promelas*. *Environ. Pollut.* Vol. 27A, pp: 179–195.
38. **Jialal, I.; Vega, G.I. and Grundy, S.M., 1990.** Physiological levels of ascorbate inhibit the active modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis*. Vol. 82, pp: 185–191.
39. **Kadry, S.M.; Marzouk, M.S.; Amer, A.F.; Hanna, M.I.; Azmy, A.H. and Hamed, H.S., 2012.** Vitamin E as antioxidant in female African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to chronic toxicity of atrazine. *Egypt. J. Aquat. Biol. & Fish.* Vol. 16, No. 2, pp: 83–98.
40. **Karaoz, E.; Gultekin, F.; Akdogan, M.; Oncu, M. and Gokcimen, A., 2002.** Protective role of melatonin and a combination of vitamin C and E on lung toxicity induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* Vol. 54, No. 2, pp: 97–108.
41. **Keizer, J.; D'Agostino, G.; Nagel, R.; Volpe, T.; Gnemi, P. and Vittozzi, L., 1995.** Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. *Sci. Total Environ.* Vol. 171, pp: 213–220.
42. **Kohen, R.; Vellaichamy, E. and Hrbac, J., 2000.** Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. *Free. Radic. Biol. Med.* Vol. 28, No. 6, pp: 871–879.
43. **Koprucu, S.S.; Koprucu, K.; Ural, M.S.; Ispir, U. and Pala, M., 2006.** Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Vol. 86, pp: 99–105.
- and lipid peroxidation in carp tissues. *J.Pest. Cont. Environ. Sci.* Vol. 2, pp: 21–27.
25. **El-Gendy, K.S.; Aly, N.M.; Mahmoud, F.H.; Kenawy, A. and El-Sebae, A.H., 2010.** The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food Chem. Toxicol.* Vol. 48, pp: 215–221.
26. **El-Gharieb, M.A.; El-Masry, T.A.; Emar, A.M.; Mohammed, A. and Hashem, M.A., 2010.** Potential hepatoprotective effects of vitamin E and *Nigella sativa* oil on hepatotoxicity induced by chronic exposure to Malathion in human and male albino rats. *Toxicol. Environ. Chem.* Vol. 92, No. 2, pp: 391–407.
27. **Fabiana, K.; Garcia, F.; Pilarski, E.M.; Onaka, F.R.D.; Moraes, M.L. and Martins, M.L., 2007.** Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*. Vol. 271, pp: 39–46.
28. **Frei, B.; Stocker, R. and Ames, B.N., 1988.** Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol. 85, No. 24, pp: 9748–9752.
29. **Fujii, Y. and Asaka, S., 1982.** Metabolism of diazinon and diazoxon in fish liver preparations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 29, pp: 455–460.
30. **Geetha, B.V.; Navasakthi, R. and Padmini, E., 2010.** Investigation of antioxidant capacity and phytochemical composition of *Sun Chlorella* an in vitro study. *J Aquac Res Development*. Vol. 1, pp: 104.
31. **Gokalp, O.; Buyukvanli, B.; Cicek, E.; Ozer, M.K.; Koyu, A.; Altuntas, I. and Koylu, H., 2005.** The effects of diazinon on pancreatic damage and ameliorating role of vitamins E and C. *Pestic. Biochem. Phys.* Vol. 81, pp: 123–128.
32. **Goth, L., 1991.** A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta.* Vol. 196, pp: 143–152.
33. **Hai, D.Q.; Varga, S.z. and Matkovics, I.M., 1997.** Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 117, pp: 83–88.
34. **Hazarika, A.; Sarkar, S.N.; Hajare, S.; Kataria, M. and Malik, J.K., 2003.** Influence of Malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology*. Vol. 185, pp: 1–8.



- Biochem Physiol. Vol. 149, pp: 40-49.
54. **Moreau, R.; Dabrowski, K.; Czesny, S. and Chila, F., 1999.** Vitamin C, vitamin E interaction in juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*), a fish able synthesize ascorbic acid. J. Appl. Ichthyol. Vol. 15, pp: 205-257.
  55. **Oruç, E.O., 2010.** Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. Pestic. Biochem. Physiol. Vol. 96, pp: 160-166.
  56. **Prior, R.L. and Cao, G., 1999.** In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free. Radic. Biol. Med. Vol. 27, No. 11-12, pp: 1173-1181.
  57. **Schlenk, D., 2005.** Pesticide biotransformation in fish. In: Mommsen TP, Moon TW (eds) Biochemistry and molecular biology of fishes. Elsevier, Amsterdam. Vol. 6, pp: 171-190.
  58. **Sepici-dinçel, A.; Benli, A.C.K.; Selvi, M.; Sarikaya, R.; Sahin, D.; Özkul, I.A. and Erkoç, F., 2009.** Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: Biochemical, hematological, histopathological alterations. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 72, pp: 1433-1439.
  59. **Shayeghi, M.; Darabi, H.; Abtahi, H.; Sadeghi, M.; Pakbaz, F. and Golestaneh, S.R., 2007.** Assessment of Persistence and Residue of Diazinon and Malathion in Three Rivers (Mond, Shahpour and Dalaky) of Bushehr Province; 2004-2005. Iranian South Medical Journals. Vol. 10, No. 1, pp: 54-60. (In Persian)
  60. **Shayeghi, M.; Shahtaheri, J. and Selseleh, M., 2001.** Organophosphorus insecticides residue in Mazandaran River and waters (Iran). Iranian. J. Public. Health. Vol. 30, No. 3-4, pp: 115-119.
  61. **Shokrzadeh, M.; Hosseini Payam, S.S.; Zargari, M.; Abasi, A.; Abedian, S.; Layali, I.; Shadborestan, A.; Omid, M. and Ahmadi Basiri, E., 2012.** Evaluation of protective effect of vitamins E, C and A on superoxide dismutase enzyme activity in rat erythrocytes exposed to Diazinon. J. Mazand. Univ. Med. Sci. Vol. 22, pp: 31-39.
  62. **Sies, H. and Stahl, W., 1995.** Vitamins E and C, betacarotene, and other carotenoids as antioxidants. Am. J. Clin. Nutr. Vol. 62, pp: 1315S-1321S.
  63. **Singh, M.; Sandhir, R. and Kiran, R., 2011.** Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by
  44. **Koracevic, D.; Koracevic, G.; Djordjevic, V.; Andrejevic, S. and Cosic, V., 2001.** Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. Journal of Clinical Pathology. Vol. 54, pp: 356-361.
  45. **Ledwozyw, A.; Michalak, J.; Stepień, A.K. and Adziolka, A., 1986.** The relationship between plasma triglycerides, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. Clinica. Chimica. Acta. Vol. 155, pp: 275-284.
  46. **Lu, C. and Liu, Y., 2002.** Interaction of lipoic acid radical cations with vitamins C and E analogue and hydroxycinnamic acid derivatives. Arch. Biochem. Biophys. Vol. 406, No. 1, pp: 78-84.
  47. **Mahfouz, R.; Sharma, R.; Sharma, D.; Sabanegh, E. and Agarwal, A., 2009.** Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. Fertility and Sterility. Vol. 91, pp: 805-811.
  48. **Malekinejad, H.; Alizadeh, A. and Cheraghi, H., 2010.** The protective effect of liquorice plant extract on CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). J. Veterinary Research Forum. Vol. 1, No. 3, pp: 158-164.
  49. **Marklund, S. and Marklund, G., 1974.** Involvement of the superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. Vol. 47, pp: 469-474.
  50. **McCord, J.M. and Fridovich, I., 1969.** Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. J. Biol. Chem. Vol. 244, pp: 6049-6055.
  51. **Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V. and Milner, A., 1993.** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci. Vol. 84, pp: 407-412.
  52. **Monteiro, D.A.; Almeida, J.A.D.; Rantin, F.T. and Kalinin A.L., 2006.** Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 141, pp: 143-149.
  53. **Monterio, D.A.; Rantin, F.T. and Kalinin, A.L., 2009.** The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish *matrinxa*, *brycon cephalus* exposed to organophosphate insecticide folisuper 600 br® (methyl parathion). Comp



- Chemical Safety. World Health Organization. Geneva. 140 p.
75. **Winston, G.W.; Regoli, F.; Dugas, J.R., Fong, J.H. and Blanchard, K.A., 1998.** A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic. Biol. Med.* Vol. 24, pp: 480–493.
  76. **Xing, H.; Li, S.; Wong, Z.; Gao, X.; Xu, S. and Wang, X., 2012.** Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pesticide Biochemistry & Physiology.* Vol. 103, No. 1, pp: 74-80.
  77. **Yang, M.C.; Mclean, A.J.; Rivory, L.P. and Le Couteur, D.G., 2000.** Hepatic disposition of neurotoxins and pesticides. *Pharmacology and Toxicology.* Vol. 87, pp: 286-291.
  78. **Zama, D.; Meraihi, Z.; Tebibel, S.; Benayssa, W.; Benayache, F.; Benayache, S. and Vlitinck, A.J., 2007.** Chlorpyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: the protective role of the butanolic extract of *Paronychia argentea* L. *Indian Pharmacol.* Vol. 39, pp: 145–150.
  79. **Zhang, J.; Shen, H.; Wang, X.; Wu, J. and Xue, Y., 2004.** Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *J. Chem.* Vol. 55, pp: 167–174.
  - vitamin E. *Exp. Toxicol. Pathol.* Vol. 63, No. 3, pp: 269-276.
  64. **Sokhansanj, M., 1984.** An analysis of the problems and determine the best fighting chemical spraying time against stem warm Rice eater *Chilosupersalis* in Mazandaran province. *Plants Preserving the Journal.* Vol. 8, pp: 30-120.
  65. **Turkez, H. and Togar, B., 2011.** Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract counteracts genotoxicity and oxidative stress of permethrin in human lymphocytes. *J. Toxicol Sci.* Vol. 36, No. 5, pp: 531-537.
  66. **Tsao, C.S., 1997.** An overview of ascorbic acid chemistry and biochemistry. In: L. Packer and J. Fuchs (eds), *Vitamin C in health and disease.* Marcel Dekker, NY. pp: 25-58.
  67. **Ural, M.S., 2013.** Chlorpyrifos-induced changes in oxidant/antioxidant status and haematological parameters of *Cyprinus carpio*: Ameliorative effect of lycopene. *Chemosphere.* Vol. 90, pp: 2059-2064.
  68. **Uner, N.; Oruç, E.O.; Sevgiler, Y.; Sahin, N.; Durmaz, H. and Usta, D., 2006.** Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* Vol. 21, pp: 241–245.
  69. **Valavanidis, A.; Vlahogianni, T.; Dassenakis, M. and Scoullos, M., 2006.** Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.* Vol. 64, No. 2, pp: 178-189.
  70. **Vale, J.A., 1998.** Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus OP insecticide poisoning. *Toxicology Letters.* Vol. 64, No. 9, pp: 102–103.
  71. **Verlhac, V. and Gabaudan, J., 1997.** The effect of vitamin C on Fish Health. Roche Technical Buletin, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland. 30 p.
  72. **Verlhac, V.; Obach, A.; Gabaudan, J.; Schüep, W. and Hole, R., 1998.** Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology.* Vol. 8, pp: 409-424.
  73. **Virtue, W.A. and Clayton, J.W., 1997.** Sheep dip chemicals and water pollution. *Sci. Total Environ.* Vol. 194-195, pp: 207- 217.
  74. **WHO. 1998.** Environmental Health Criteria, 198- Diazinon. International Programme on

