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: ۴۱۱۱
- **علیرضا میرواقفی*:** گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، صندوق‌پستی: ۴۱۱۱
- **هادی پورباقر:** گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، صندوق‌پستی: ۴۱۱۱
- **فرزاد اسدی‌جمنانی:** گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صندوق‌پستی:۱۳۱۸-۱۳۱۴۵

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۳

چکیده

آفت‌کش‌های ارگانوفسفره ازجمله دیازینون امروزه در طیف وسیعی از فعالیت‌های کشاورزی وکنترل حشرات و آفات به‌کارگرفته می‌شوندکه می‌توانند 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 آبزیان 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 ۶۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۱۸±۱۲۱ گرم به ٤ گروه مساوی تقسیم شدند که شامل گروه‌های: شاهد؛ تحت تیمار دیازینون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)؛ تحت تیمار ویتامین C (۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و دیازینون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)؛ تحت تیمار ویتامین C (۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و دیازینون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر). نمونه‌برداری‌ها پس از گذشت مدت زمان دو و چهار هفته جهت سنجش آنزیم‌های سوپراکساید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، سطح آنتی‌اکسیدان کل (TAC) و شاخص مالون دی آلدهاید (MDA)، برروی سرم خون آن‌ها صورت گرفت. یافته‌های این مطالعه نشان داد ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (فاقد ویتامینC در جیره) به‌طور معنی‌دار ($p<0/05$) با کاهش سطح فعالیت آنزیم SOD و TAC بعد از دوهفته، 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 اکسی رادیکال‌های آزاد از جمله رادیکال‌های سوپراکساید وهیدروکسیل حاصل از متابولیسم دیازینون نسبت داد. هم‌چنین طبق نتایج به‌دست آمده دوز ۱۰۰۰ 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 وکاهش سطح MDA نسبت به گروه فاقد ویتامین شود. ازطرفی دوز ۳۰۰ میلی‌گرم ویتامین تاثیری 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 درفرایند حذف و پاکسازی اکسی 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 وکاهش آسیب‌های اکسیداتیو امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

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

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: avaghefi@ut.ac.ir

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 آبزی اکوسیستم‌های مختلفی را تحت تأثیر قرار دهد (Zhang و همکاران، ۲۰۰۴؛ Hai و همکاران، ۱۹۹۷). 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، ۱۹۹۷). 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، ۲۰۰۰). فرمول شیمیایی دیازینون به‌صورت (O_3 P S $C_{12}H_{21}N_2$) و دارای وزن مولکولی ۳۰۴/۳۵ گرم بر مول می‌باشد (WHO، ۱۹۹۸). طبق مطالعات صورت گرفته زمان ماندگاری (نیمه‌عمر) دیازینون در آب دریاچه‌ها به‌طور میانگین ۳۰ روز (۱۸۴- ۱۴روز) و در رودخانه‌ها ۳۹روز تخمین زده شده است (Arthur و همکاران، ۱۹۸۳؛ Jarvinen و Tanner، ۱۹۸۲).

مصرف دیازینون از سال ۱۹۷۶ در مبارزه با کرم ساقه‌خوار برنج در شمال ایران شروع شد (Sokhansanj، ۱۹۸۴). براساس گزارش وزرات کشاورزی میزان مصرف سالیانه دیازینون معادل ۳۷۷۵ تن برآورد شد (Annual Report of performance of the Ministry of Protection Agency, Environmental Monitoring and Agriculture of Iran، ۲۰۰۶-۲۰۰۵). طی مطالعات متعدد صورت گرفته حضور این سم در بسیاری از منابع آبی داخلی ایران ازجمله 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 ۱میلی‌گرم در لیتر) در روزهای اولیه مصرف در فعالیت‌های کشاورزی تا مقادیر تحت حاد آن (۰/۱میلی‌گرم در لیتر) پس از گذشت چندین ماه تایید شده است (Abbasian و همکاران، ۲۰۱۲؛ Shayeghi و همکاران، Shayeghi و همکاران، ۲۰۰۱).

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 آبزی 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، ۱۹۹۸). 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، تیلاپیا و کپورمعمولی در مواجهه با سمیت دیازینون تائید شده است (Uner، ۲۰۰۶). روند تجزیه این سم در بدن ماهی‌ها بدین صورت است که در ابتدا این سم به‌وسیله فعالیت آنزیم‌های فاز اول متابولیسم، ازجملهٔ آن‌ها سایتوکروم‌های نوع CYP1A2 و CYP3A2 طی فرایند دسولفوراسیون (گوگردزدایی) به دیازوکسون (Diazoxon) تبدیل می‌شود (Schlenk، ۲۰۰۵). قزل‌آلای رنگین‌کمان، کپور، گوپی و گورخرماهی (Zebra Fish) همگی توانایی تبدیل دیازینون به دیازوکسون را دارند (Keizer و همکاران، ۱۹۹۵).

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

ازطرفی 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 هردو متابولیت‌ها دارای عامل هیدروکسیل هستند (Schlenk، ۲۰۰۵؛ Fujii و Asaka، ۱۹۸۲).

به‌طور کلی انواع مختلف آفت‌کش‌های ارگانوفسفره توانایی ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال در طی آزمایشات invitro و invivo را دارند که ازجمله مهم‌ترین آن‌ها رادیکال‌های آزاد سوپراکسایدآنیون ($O_2^{\cdot -}$) ورادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) می‌باشند که اثرات بیولوژیک خود را از طریق حمله الکتروفیلی به اجزاء و ارگان‌های موجود در ساختار سلول‌ها انجام می‌دهند (Cnubben و همکاران، ۲۰۰۱؛ Yang و همکاران، ۲۰۰۰؛ Anderson و همکاران، ۱۹۹۵). 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، ۲۰۰۳). ازجمله محصولات فرایند پراکسیداسیون لیپید، تولید مالون دی آلدهاید (MDA) است که می‌تواند به‌عنوان شاخصی در تعیین سطح این فرایند طی القاء استرس اکسیداتیو کمک کند به‌عبارتی این ماده محصول ثانویه تولید شده و رابطه مستقیم با صدمات وارده به سلول توسط فرایند مذکور را دارد (Durmaz و همکاران، ۲۰۰۶).

در مقابل چنین تهدیداتی از سوی محیط ماهی‌ها نیز دارای مکانیسم‌هایی برای دفاع می‌باشند که ازجمله آن‌ها می‌توان به آنزیم‌های اختصاصی دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل: سوپراکساید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) اشاره کرد که به‌همراه تعداد دیگری از آنزیم‌ها مجموعه‌ای از دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی را تشکیل می‌دهند که نقش پاکسازی رادیکال‌های آزاد را برعهده دارند (El-Gendy و همکاران، ۱۹۹۰). در این میان آنزیم سوپراکساید دیسموتاز (SOD) یک دفاع اصلی علیه رادیکال‌های سوپراکساید آنیون محسوب می‌شود و به‌نوعی اولین خط دفاعی علیه استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد. به‌طورکلی این آنزیم وظیفه تسریع تبدیل یون سوپراکساید آنیون را به اکسیژن مولکولی و هیدروژن پراکساید برعهده دارد (Das و همکاران، ۱۹۹۷؛ McCord و Fridovich، ۱۹۶۹). آنزیم کاتالاز (CAT) جزء آنزیم‌های معمول در سلول موجودات هوازی است و مکانیسم عمل آن شامل تجزیه پراکسیدهیدروژن به آب و اکسیژن است (Aebi، ۱۹۸۴).

ازطرفی مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی 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 به‌طرق مختلف سعی در مهار و جلوگیری از شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد را داشته و همگی در ایجاد وضعیت هموستازی در بدن آبزی نقش‌های مهمی ایفا می‌کنند (Zama و همکاران، ۲۰۰۷). در یک جمع‌بندی کلی می‌توان گفت که 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 (TAC) نامیده می‌شوند (Mahfouz و همکاران، ۲۰۰۹). به عبارتی این فاکتور بیوشیمیایی بیانگر میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل موجود زنده جهت از بین بردن رادیکال‌های آزاد است (Miller و همکاران، ۱۹۹۳).

از جمله عوامل آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی 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 به‌خصوص ماهیان استخوانی و از جمله آن‌ها قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌علت عدم وجود آنزیم ال-گلونولاکتون 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، ۱۹۹۹؛ Verlhac و Gabaudan، ۱۹۹۷).

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، ۲۰۰۸). اما یکی از مهم‌ترین نقش‌های حیاتی این ویتامین عملکرد آنتی‌اکسیدانی آن است. این ویتامین یک آنتی‌اکسیدان بسیار مهم در مایعات خارج‌سلولی (آب میان‌بافتی و بین‌سلولی)، مایع داخل‌سلولی (سیتوزول) بوده، به‌طوری‌که توانایی خنثی‌سازی بسیاری از اُکسی‌رادیکال‌ها را داراست (Bigard، ۲۰۰۱). در تایید این مطلب عملکرد این ویتامین به‌عنوان یک عامل احیاءکننده برای بی‌اثر کردن انواع گسترده‌ای از رادیکال‌های آزاد تولید شده طی متابولیسم آفت‌کش‌ها به اثبات رسیده است (Tsao، ۱۹۹۷).

طی پژوهش‌های صورت گرفته افزودن ویتامین C به جیرهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند سبب خنثی‌سازی و احیای رادیکال‌های آزاد $O_2^{\cdot -}$، $OH^{\cdot}$ و H_2O_2 شده و از آسیب‌های حاصل از استرس‌های اکسیداتیو جلوگیری به‌عمل آورد (Verlhac و Gabaudan، ۱۹۹۷؛ Fujii و Asaka، ۱۹۸۲). 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 به‌عمل آورد (Jialal و همکاران، ۱۹۹۰؛ Frei و همکاران، ۱۹۸۸). به‌طورکلی استفاده از ویتامین C جهت افزایش مقاومت ماهی در برابر تنش‌های محیطی با تأثیر بر پارامتر بیوشیمیایی خون مؤثر واقع شده است. به‌عبارتی عملکرد اسیدآسکوربیک مبتنی بر کاهش و تعدیل عملکردهای بیوشیمیایی در طی استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد که در نهایت می‌تواند میزان ROS تولید شده در بدن موجود زنده را به‌طرق مختلف فیزیولوژیک کاهش دهد (Fabianaو همکاران، ۲۰۰۷؛ Buettner و Moseley، ۱۹۹۳).

تاکنون مطالعات وسیعی در مورد تاثیر آفت‌کش‌ها برروی گونه‌های مختلف جانوران صورت گرفته که نتایج به‌دست 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 (Isik وCelik، ۲۰۰۸). در مطالعه مشابه دیگری تأثیر دیازینون بر ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) با افزایش میزان CAT و کاهش فعالیت SOD همراه بود. از طرفی نتایج این مطالعه افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید سلولی را به‌واسطه سنجش شاخص MDA بافت‌های مورد بررسی نشان می‌داد (Durmaz و همکاران، ۲۰۰۶). هم‌چنین طبق پژوهش صورت گرفته دیگری تأثیر سم ارگانوفسفره متیل پاراتیون بر کبد ماهی(*Brycon cephalus*)، حاکی از افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT بوده است (Monterio و همکاران، ۲۰۰۹). 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، ۲۰۱۱؛ Sepici-dinçel و همکاران، ۲۰۰۹).

باتوجه‌به تحقیقات‌صورت‌گرفته‌تجویز 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 دریک 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، ۲۰۰۵). 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 را به‌دنبال داشت (Shokrzadeh و همکاران، ۲۰۱۲). 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، ۲۰۱۲).

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 CAT،SOD، تغییر سطح آنتی‌اکسیدان کل TAC و هم‌چنین شاخص MDA سرم خون انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و دستگاه‌ها: از دیازینون به‌شکل امولسیون ۶۰ درصد، به‌صورت محلول در زایلون ۴۰ درصد ساخت شرکت پرتونار (ساخت ایران) استفاده شد. برای تهیه غلظت تحت حاد (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) دیازینون، محلول استوک ۱۰ گرم در هزار لیتر آن تهیه شد (Koprucu و همکاران، ۲۰۰۶). این مقدار از دیازینون براساس ۰/۱ میزان LC_{50} آن در نظر گرفته شد (Eisler، ۱۹۸۶). ویتامین C مورد نیاز به‌شکل پودر ویتامین C پوشش‌دار و پایدار در آب با ساختار شیمیایی ال-آسکوربات-۲- فسفات و نام تجاری Tiger C-35 ساخت شرکت چینی Tiger تهیه شد. هم‌چنین این ویتامین دارای فرمول شیمیایی $C_6H_9O_9P$، با وزن مولکولی ۲۵۶/۱۱ گرم بر مول است. مواد شیمیایی مورد نیاز جهت سنجش‌های فاکتورهای بیوشیمیایی شامل؛ محلول پیروگالول، محلول بافرتریس، محلول پراکسید هیدروژن ۳۳٪(H2O2)، آمونیوم مولیبدات ۴٪، تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷٪، بافر فسفات نمکی (Na_2HPO_4)، بنزوات سدیم، اسیداوریک، سود (Nacl)، اسیداستیک، بوتیل هیدروکسی تولوئن. 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 M۱۶ استفاده شد.

مشخصات ماهی‌های مورد مطالعه، شرایط نگه‌داری و تیماربندی آن‌ها: این مطالعه در پاییز سال ۱۳۹۱ در کارگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. در این پژوهش تعداد ۶۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۱۸±۱۲۱ گرم و میانگین طولی ۱/۶±۲۲/۹ سانتی‌متر از ماهی‌سرای کرج خریداری شد. ماهی‌ها توسط یک مخزن ۱۰۰۰ لیتری که توسط آب مزرعه آب‌گیری و توسط کپسول اکسیژن هوادهی شد به ۴ مخزن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری منتقل شدند. طول دورهٔ آداپتاسیون (سازگار نمودن)ماهی‌ها، ۷ روز در نظر گرفته شد. در طول دوره آزمایش روزانه به‌میزان ۱۰درصد از حجم کل مخازن تعویض آب صورت گرفت. میانگین دما در کل دوره ۱±۱۲/۵ درجه سانتی‌گراد، میانگین pH آب معادل ۰/۱±۷/۸، میزان اکسیژن محلول معادل ۰/۵±۸ و میزان سختی آب ۱۶±۲۰۵ میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم ($CaCo_3$) اندازه‌گیری شد. جهت تیماربندی، ماهی‌ها به ۶ گروه ۱۵ قطعه‌ای تقسیم شامل گروه‌های: ۱- شاهد؛ ۲- تحت تیمار دیازینون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)؛ ۳-تحت تیمار دیازینون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و ویتامین C به‌میزان ۳۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره؛ ۴- گروه تحت دیازینون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و ویتامین C به‌میزان ۱۰۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره. گروه‌های مذکور به‌مدت چهار هفته تحت آزمایش قرار گرفتند و میزان جیره دریافتی معادل ۲٪ 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 ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر یا (۱:۱۰۰۰۰) استفاده شد، خون‌گیری توسط سرنگ۲سی سی (فاقد مادهٔ ضدانعقاد هپارین) از ناحیه کمان خونی ساقه دمی انجام شد و به اپندورف‌های ۲سی سی منتقل شدند و جهت جداسازی سرم از سانتریفیوژ با تنظیم (۴۵۰۰ دور در ۱۵ دقیقه) استفاده شد. سپس نمونه‌ها بلافاصله به فریزر با دمای ۷۰- 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، ۱۹۷۴). در این روش فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز براساس فرایند اتواکسیداسیون پیروگالول (pyrogallol) در حضور هیدروژن پراکساید (H_2O_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 ۴۲۰ نانومتر این سنجش صورت می‌گیرد. براساس سنجش انجام شده یک واحد فعالیت آنزیمی SOD برابر است با مقدار آنزیمی که موجب مهار ۵۰ درصدی اتواکسیداسیون پیروگالول شود.

سنجش آنزیم کاتالاز (CAT): جهت سنجش آنزیم کاتالاز سرم خون از روش Goth استفاده شد (Goth، ۱۹۹۱). در این روش ابتدا سرم خون نمونه‌ها با محلول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به‌مدت ۱۰ 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 ۴۱۰ نانومتر کاهش می‌یابد. در این روش هر واحد فعالیت آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند ۱میلی‌مول 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، ۲۰۰۱). براساس این روش در ابتدا محلول استاندارد شده کمپلکس Fe-EDTA با پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در طی واکنش فنتون (Fentone) رادیکال‌های هیدروکسیل تولید کرده، سپس اکسیژن فعال حاصله موجب آزادشدن تیوباربیتوریک 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، به‌طوری‌که کاهش جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر به‌دنبال کاهش تولید رنگ صورت گرفت.

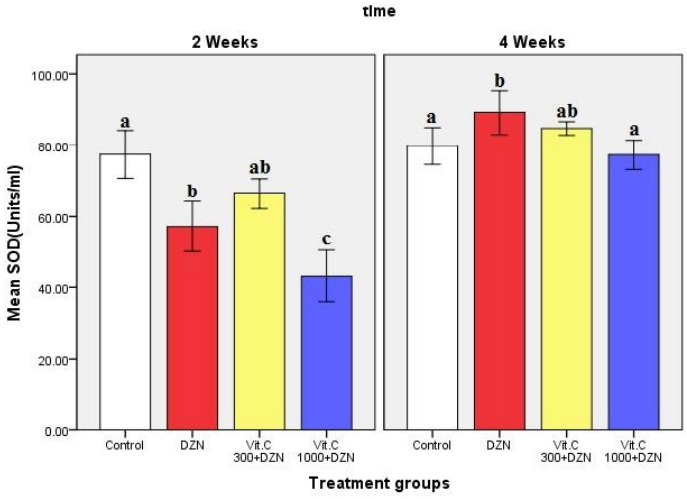
سنجش میزان پراکسیداسیون لیپید (LPO) با استفاده از شاخص مالون دی‌آلدهاید (MDA): جهت سنجش شاخص (MDA) از روش Ledwozyw استفاده شد (Ledwozyw و همکاران، ۱۹۸۶). در این روش ۱ میلی‌لیتر نمونه سرم تهیه شده با ۲ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید، تیوباربیتوریک اسید (TBA) و اسیدهیدروکلرویک ضمن شرایط اسیدی مخلوط شدند سپس توسط آب مقطر تا حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رقیق شدند. در مرحله بعد لوله‌های حاوی این محلول طی مدت ۳۰

دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند و پس از سپری شدن این زمان جهت سرد شدن در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند. سپس نمونه‌های به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) شدند و در نهایت محلول رویی نمونه‌ها به‌آرامی جدا گردید و در طول موج ۵۳۵ نانومتر میزان جذب قرائت شد. این واکنش براساس میزان مهار تیوباربیتوریک اسید (TBA) توسط MDA موجود درسرم صورت گرفت. به‌طوری‌که 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 وتحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری به‌روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون آماری توکی(Tukey) در سطح اطمینان ۹۵ درصد و سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵) انجام شد. میانگین داده‌ها (S.D±Mean) با استفاده از نمودار میله‌ای و با نرم‌افزار EXCEL 2007 رسم و اختلاف بین تیمارها با حروف الفبای انگلیسی نشان داده شد.

نتایج

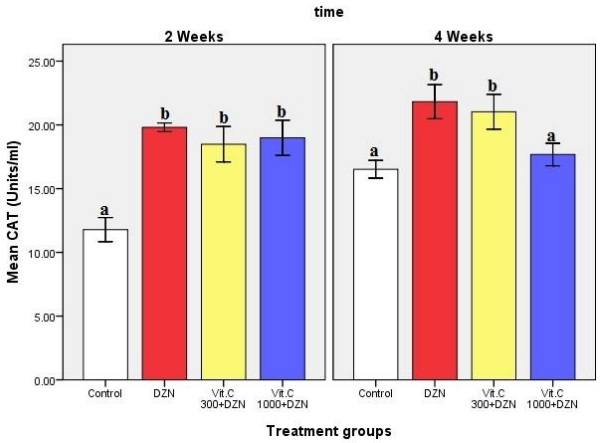
بررسی سطح فعالیت آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (SOD): نتایج به‌دست آمده از تاثیر دیازینون بر سطح فعالیت آنزیم SOD در انتهای هفته دوم نشان داد که سطح این آنزیم در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) نسبت به گروه شاهد دارای کاهش معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). ازطرفی طی هفته چهارم کاهش سطح SOD در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) جبران شد به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت (شکل ۱). هم‌چنین یافته‌های به‌دست آمده از تاثیر ویتامین C بر سطح فعالیت SOD در انتهای هفته دوم و چهارم نشان می‌دهد گروه تحت تیمار ویتامین $C_{۳۰۰}$+دیازینون، فاقد اختلاف معنی‌داری با گروه دیازینون (DZN) بود. ازطرفی سطح فعالیت این آنزیم در ماهی‌های تحت تیمار ویتامین $C_{۱۰۰۰}$+دیازینون دارای کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) نسبت به ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (DZN) در هفته دوم بود (شکل ۱).



شکل ۱: نمودار تغییر سطح فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز در سرم خون ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و ویتامین C (۳۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) پس از گذشت دو و چهار هفته. تعداد ۵ قطعه ماهی از هر گروه نمونه‌برداری شدند. حروف متفاوت (a,b,c,d) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) و حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می باشند.

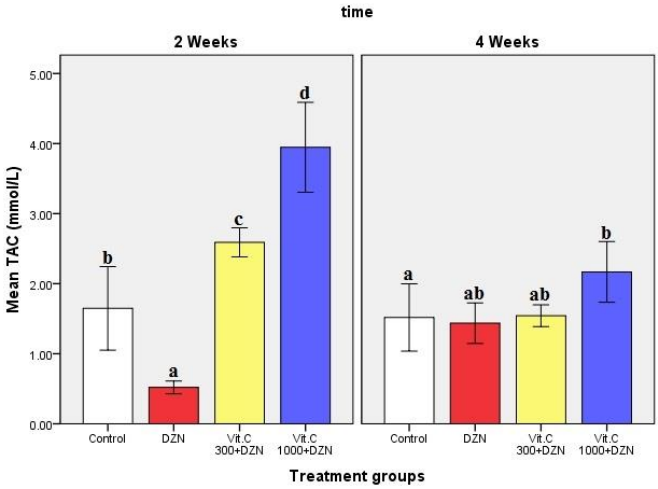
بررسی سطح فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): نتایج نشان دادند تاثیر دوز تحت حاد دیازینون در انتهای هفته دوم موجب افزایش سطح‌فعالیت CAT در گروه تحت‌تیمار دیازینون (DZN) نسبت به گروه شاهد شد، هم‌چنین در انتهای هفته چهارم نیز افزایش سطح فعالیت CAT در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل ۲). 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(DZN)و ماهی‌های تحت تیمار ویتامین $C_{۳۰۰}$ و ویتامین $C_{۱۰۰۰}$ نشان ندادند. از طرفی در هفته چهارم سطح آنزیم CAT در ماهی‌های تحت تیمار ویتامین $C_{۱۰۰۰}$ نسبت به گروه‌های دیازینون (DZN) و

ویتامین $C_{۳۰۰}$ دارای کاهش معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$)، درحالی‌که بین گروه تحت تیمار ویتامین $C_{۳۰۰}$ و گروه دیازینون اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲).



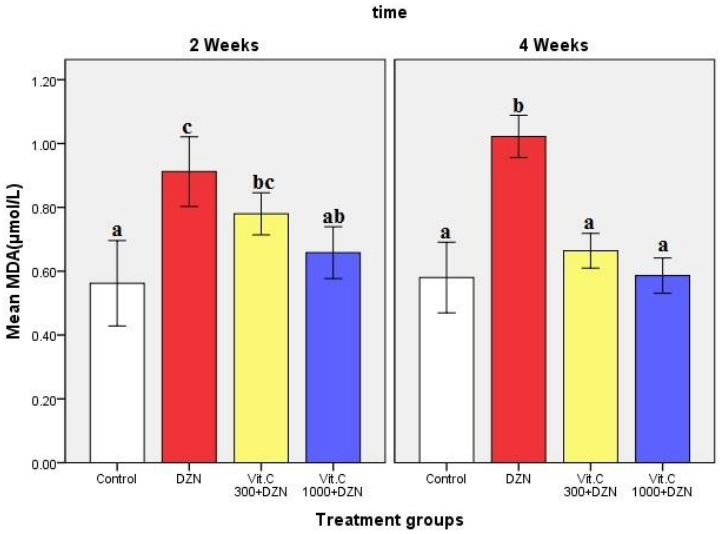
شکل ۲: نمودار تغییر سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در سرم خون ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و ویتامین C (۳۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) پس از گذشت دو و چهار هفته. تعداد ۵ قطعه ماهی از هر گروه نمونه‌برداری شدند. حروف متفاوت (a,b,c,d) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) و حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است.

بررسی سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (TAC): نتایج به‌دست آمده در انتهای هفته دوم نشان می‌دهند، طی القاء دیازینون میزان فعالیت TAC در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) با کاهش معنی‌دار نسبت به گروه شاهد مواجه شد ($P<۰/۰۵$). از طرفی در انتهای هفته چهارم کاهش سطح TAC در گروه تحت تیمار دیازینون اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت (شکل ۳). 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 $C_{۳۰۰}$ و ویتامین $C_{۱۰۰۰}$ دارای افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) نسبت به گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) بود. ولی یافته‌ها در انتهای هفته چهارم نشان داد ماهی‌های تحت تیمار ویتامین $C_{۱۰۰۰}$ هرچند دارای سطح بالاتری از آنتی‌اکسیدان کل نسبت به گروه‌های ویتامین $C_{۳۰۰}$ و دیازینون (DZN) بود ولی این افزایش سطح معنی‌دار نبود ($P<۰/۰۵$) (شکل ۳).



شکل ۳: نمودار تغییر سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل در سرم خون ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و ویتامین C (۳۰۰ و۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) پس از گذشت دو و چهار هفته. تعداد ۵ قطعه ماهی از هر گروه نمونه‌برداری شدند. حروف متفاوت (a,b,c,d) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) و حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشند.

بررسی سطح شاخص مالون دی‌آلدهاید (MDA) طی فرایند پراکسیداسیون لیپید: نتایج به‌دست آمده از سنجش‌های هفته دوم نشان دادند القاء دیازینون سبب افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) سطح MDA در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) نسبت به گروه شاهد شد، هم‌چنین یافته‌های هفته چهارم نشان داد سطح MDA در گروه تحت تیمار دیازینون (DZN) نسبت به گروه شاهد دارای افزایش معنی‌دار بود (شکل ۴).



شکل ۴: نمودار تغییر سطح شاخص مالون دی آلدهاید در سرم خون ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و ویتامین C (۳۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) پس از گذشت دو و چهار هفته. تعداد ۵ قطعه ماهی از هر گروه نمونه‌برداری شدند. حروف متفاوت (a,b,c,d) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵)و حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است.

هم‌چنین یافته‌های به‌دست آمده از تاثیر ویتامین C بر سطح شاخص MDA نشان داد، در انتهای هفته دوم ماهی‌های دریافت کننده ویتامین $C_{۱۰۰۰}$ با کاهش معنی‌دار سطح MDA نسبت به ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (DZN) مواجه شدند (P<۰/۰۵). درحالی‌که سطح MDA در گروه ویتامین $C_{۳۰۰}$ اختلاف معنی‌داری با دو گروه دیگر نداشت. ولی نتایج هفته چهارم نشان می‌دهد که گروه‌های تحت تیمار ویتامین $C_{۳۰۰}$ و $C_{۱۰۰۰}$ هر دو با کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) سطح MDA نسبت به ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (DZN) مواجه شدند (شکل ۴).

بحث

در مطالعه حاضر اثرات اکسیداتیو ناشی از القاء دوز تحت حاد دیازینون بر فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و هم‌چنین ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل TAC و شاخص MDA مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین به بررسی تاثیر ویتامین C در سطوح ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برسطح فعالیت فاکتورهای بیوشیمیایی مذکور طی القاء حشره‌کش دیازینون پرداخته شد.

نتایج به‌دست آمده نشان داد القاء دیازینون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) می‌تواند منجر به کاهش سطح فعالیت آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (SOD) به‌دلیل افزایش رادیکال‌های سوپر اکساید آنیون $O_2^{\cdot -}$ 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 ۰/۵- ۱ میلی‌گرم در لیتر در طی مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با کاهش سطح SOD مواجه شد (Isik و Celik، ۲۰۰۸). هم‌چنین در مطالعه مشابه دیگری تأثیر دیازینون درغلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بر ماهی تیلاپیا (Tilapia) طی دو هفته با کاهش سطح SOD همراه بود (Durmaz و همکاران، ۲۰۰۶).

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

علت این افزایش ممکن است به‌دلیل تولید مداوم سوپر اکساید آنیون $O_2^{\cdot -}$ 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 $O_2^{\cdot -}$ تولید شده در نمونه‌های بافت ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) ضمن مواجهه با سم ارگانو فسفره کلرپیریفوس (chlorpyrifos) طی مدت ۳۰ روز توانسته موجب افزایش معنی‌دار در سطح SOD شود (Oruc، ۲۰۱۰).

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 شدندکه نشان‌دهنده افزایش مقادیر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است، که یکی از دلائل آن می‌تواند فعالیت آنزیم SOD در خنثی سازی رادیکال‌های سوپراکساید 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 اُکسی 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 کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) پس از گذشت ۴۰ روز باعث افزایش سطح فعالیت CAT شد (Xing و همکاران، ۲۰۱۲). 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، ۲۰۰۶). هم‌چنین براساس مطالعه‌ای تجویز خوراکی دیازینون به موش‌ها می‌تواند سبب افزایش غلظت رادیکال آزاد اکسیژن و به‌دنبال آن تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی خون شود (Abdou و El-Mazoudy، ۲۰۰۷).

ازجمله 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 وغیرآنزیمی سیستم‌دفاع آنتی‌اکسیدانی و مصرف این عوامل ایجاد می‌شود. در طی یک بررسی تاثیرغلظت‌های تحت حاد دیازینون بر سلول‌های هپاتوسیت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) موجب کاهش سطح TAC شد(Bannaee و همکاران، ۲۰۱۱). دریک مطالعه مشابه القاء دیازینون بر موش‌های مورد آزمایش موجب کاهش سطح آنتی‌اکسیدانی کل در بافت عضله نمونه‌های تحت تیمار شد (Amirkabirian و همکاران، ۲۰۰۷). به‌طورکلی 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 ظرفیت‌آنتی اکسیدانی نیز کاهش می‌یابد (Turkez و Togar، ۲۰۱۱؛ Monteiro و همکاران، ۲۰۰۶). 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 سیستم های بیولوژیک افزایش‌سطح آنتی‌اکسیدانی کل درنتیجه استرس‌های اکسیداتیو می‌تواند به‌دنبال افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط مکانیسم دفاع سلولی برای رسیدن به‌حالت هموستازی و به‌نوعی آداپتاسیون در مقابله با تنش‌های اکسیداتیو باشد (Castillo و همکاران، ۲۰۰۶؛ Kohen و همکاران، ۲۰۰۰).

ازجمله یافته‌های‌دیگر 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 ($OH^{\cdot}$) 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 آلدئیدها، 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، ۲۰۰۶؛ De Zwart و همکاران، ۱۹۹۹). 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، ۲۰۰۷؛ Hazarika و همکاران، ۲۰۰۳).

ازجمله 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 ($O_2^{\cdot -}$) دانست که به‌دنبال آن کاهش سطح فعالیت دو آنزیم مذکور را باعث می‌شود. به‌طورکلی عملکردهای بیولوژیک اسیدآسکوربیک مبتنی بر توانایی آن بر کاهش و تعدیل واکنش‌های بیوشیمیایی در طی استرس‌های 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، ۲۰۰۶). 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 اُکسی‌رادیکال‌ها انجام دهد. بدین ترتیب این ترکیب تاثیر تعدیل‌کننده‌ای برفعالیت آنزیمی دفاع آنتی‌اکسیدانی خواهد داشت (Deshpande و همکاران، ۱۹۹۶؛ Sies و Stahl، ۱۹۹۵).

در یک مطالعه نقش ویتامین C به‌عنوان آنتی‌اکسیدان جهت حفاظت از استرس اکسیداتیو القاء شده به‌وسیلهٔ آفت‌کش ایمیداکلوپراید (Imidacloprid) در بافت کبد موش‌های جنس نر آلبینو سوئیسی 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 وCAT در بافت کبد شود (El-Gendy و همکاران، ۲۰۱۰). 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 وCAT شد (Jialal و همکاران، ۱۹۹۰). نتایج به‌دست آمده از این پژوهش با نتایج مطالعات تعدادی از پژوهشگران مطابقت داشت (Singh و همکاران، ۲۰۱۱؛ El-Gharieb و همکاران، ۲۰۱۰).

ازطرفی 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. به‌طورکلی از آن‌جائی‌که بخش غیرآنزیمی دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول از جمله ویتامین‌ها سهم اساسی و مهمی از میزان (TAC) را به‌خود اختصاص می‌دهند، در نتیجه افزایش مقدار این بخش از دفاع سلولی در پی استفاده از مکمل‌های ویتامین و به‌خصوص ویتامینC می‌تواند نقش اساسی درجهت افزایش سطح دفاع آنتی‌اکسیدانی کل سلول ایفاء کند.

به‌طورکلی می‌توان گفت که آنتی‌اکسیدان کل، مجموعه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های موجود در سلول موجود زنده و شاخصی برای بیان کل مقادیر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی است (Prior و Cao، ۱۹۹۹). به‌عبارتی 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، ۱۹۹۳). طبق پژوهشی که توسط Winston و همکاران (۱۹۹۸) صورت گرفت اعتقاد براین است که گلوتاتیون، اسیدآسکوربیک (ویتامینC)، یوریک اسید و ویتامین E در حدود ۷۰درصد از سهم آنتی‌اکسیدانی کل را به‌خود اختصاص می‌دهند.

طی یک مطالعه توسط Geetha و همکاران (۲۰۱۰) استفاده از مکمل عصاره جلبک کلرلا به‌عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان در جیره کفال خاکستری (*Mugil sephalus*) در محیط پرورش می‌تواند موجب افزایش سطح آنتی‌اکسیدان کل TAC شود. هم‌چنین طی مطالعه دیگری تأثیر حفاظتی عصاره گیاه شیرین‌بیان (*Liquorice plant*) درسمیت‌ناشی‌از تترا کلرید کربن (CCL4) در ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus*

carpio) مورد بررسی قرار گرفت این مطالعه نشان داد که به‌دنبال استفاده از این ترکیب آنتی‌اکسیدان سطح TAC به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Malekinejad و همکاران، ۲۰۱۰).

باتوجه مطالب مذکور می‌توان گفت که سطح آنتی‌اکسیدان کل به‌نوعی توانایی موجودزنده درحذف و پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد را نشان می‌دهد به‌طوری‌که، هر چقدر سطح TAC افزایش یابد توانایی موجود زنده جهت خنثی سازی و مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش می‌یابد (Karaoz و همکاران، ۲۰۰۲).

نتایج آزمایشات حاضر نشان داد که استفاده از ویتامین C می‌تواند سبب کاهش سطح شاخص MDA و درنتیجه 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 ویتامینE تحت عنوان توکوفروکسیل 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 رسیده‌است (Jakeman و Maxwell، ۱۹۹۳). 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 کبد 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، ۲۰۱۰). هم‌چنین استفاده از لیکوپن در جیره کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)که یک ماده کاروتنوئیدی و آنتی‌اکسیدان است، توانست اثرات (LPO) ناشی از سم ارگانوفسفره کلرپیریفوس (chlorpyrifos) را کاهش دهد (Ural، ۲۰۱۳).

ازطرفی طبق تحقیقات صورت گرفته ویتامین C به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم و قابل‌حل در آب مطرح است که توانایی احیای ویتامین E از فرم توکوفروکسیل (Tocopheroxyl radical) را داشته و با این عمل ظرفیت پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد را در حالت و وضعیت مناسبی حفظ می‌کند (Benzie و همکاران، ۱۹۹۹). به‌عبارتی دیگر ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم مسئوول پایان دادن به واکنش‌های زنجیره‌ای در فرایند اکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده (Polyunsaturated fatty acid) است (Lu و Liu، ۲۰۰۲). درجهت 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 گروه‌های تغذیه شده با ویتامین‌های E و C به‌طور معنی‌دار کاهش پیدا کرد (Gokalp و همکاران، ۲۰۰۵).

در یک جمع‌بندی کلی القاء دوز تحت حاد دیازینون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) می‌تواند موجب کاهش در سطح آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (SOD) و سطح آنتی‌اکسیدان کل(TAC)، هم‌چنین افزیش 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 ۱۰۰۰ 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 ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین می‌تواند به شکل کاملاً موثری موجب کاهش سطح پراکسیداسیون لیپید شود. ازطرفی استفاده از دوز ۳۰۰ میلی‌گرم ویتامین نمی‌تواند سبب تعدیل و کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT شود. ازطرفی این سطح از ویتامین با اثر بخشی کم‌تر در مقایسه با دوز ۱۰۰۰میلی‌گرم ویتامین، درنهایت می‌تواند موجب‌افزایش درسطح 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 منابع‌طبیعی دانشگاه تهران و آزمایشگاه آذر تهران به انجام رسید، از تمامی کسانی‌که 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 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.
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 glutathionerelated 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

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.
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 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 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.; Emara, 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

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 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. Ich-thyol. 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 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.
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.; Stepien, A.K. and Adziolka, A., 1986.** The relationship between plasma triglycerides, total lipids and lipid peroxidation products during huma 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 effectof liquorice plant extract on CCl4-induced hepatotoxicity in com-mon carp (*Cyprinus carpio*). J.Veterinary Research Forum. Vol. 1, No. 3, pp: 158-164.
49. **Marklund, S. and Marklund, G., 1974.** Involvement of the superoxyde anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxyde dismutase. Eur.J Biochem. Vol. 47, pp: 469-474.
50. **McCord, J.M. and Fridovich, I., 1969.** Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein. 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

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 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 *Paronychie 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.

(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.; Omidi, 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 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 biochemistryIn: 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 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.