14(1) 209-218, Spring 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effect of vitamin B6 on hematological indicator of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to diazinon

Amin Khazaei [1], Alireza Mirvaghefi [1], Vasiqeh Sadat Mirbagheri [2], Mehrnaz Heibatian [3], Hamed Ghafari Farsani [4*]

[1]*Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran*
[2]*Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran*
[3]*Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran*
[4]*Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Urmia, Urmia, Iran*

Key Words
Protective effect
Pesticides
Vitamin supplement
Hematology

Abstract

Introduction: Diazinon organophosphate toxin by affecting on non-target organisms, cause changes in blood indicator count. The aim of this study was to evaluate the effect of vitamin B6 (pyridoxine) on the hematological indicators of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the treatment of diazinon toxicity.

Materials & Methods: A total of 120 fish (75.31±0.24 g) were fed on a basal diet for 2 weeks to acclimatize the laboratory condition, then they were fed with diet containing B6 in 2 treatments of 5 and 10 mg B6 per kg of food and a control treatment (with commercial diet) for 3 weeks. Treatments of vitamin B6 were exposed to 0.12 mg/l diazinon toxic for 10 days. The hematological indicator was measured at the end of days 1, 5 and 10.

Results: The lowest RBC and MCH were observed in 5 mg B6-diazinon treatment compared to control ($p<0.05$). The effect of time on reduction of RBC was significant in all days ($p<0.05$). Indicators of RBC, HB, HCT, MCH and MCV and lymphocyte percentage on day 10 showed a higher amount compared to the fifth day ($p<0.05$). The fifth day showed the highest WBC relative to the first day ($p<0.05$).

Conclusion: The results showed that vitamin B6 at the level of 10 mg was able to prevent the negative effects of diazinon on fish and show improved hematologic function, especially red blood cells, leukocytes and lymphocytes, by treating the toxin with increasing time during the tenth day.

* Corresponding Author's email: hamed_ghafari@alumni.ut.ac.ir
Received: 24 December 2020; Reviewed: 27 January 2021; Revised: 4 April 2021; Accepted: 8 May 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.281552.2506

مقاله پژوهشی

تأثیر ویتامین B6 بر شاخص‌های خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه با سم دیازینون

امین خزایی[۱]، علیرضا میرواقفی[۱]، وثیقه‌السادات میرباقری[۲]، مهرناز هیبتیان[۳]، حامد غفاری‌فارسانی[۴*]

[۱] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
[۲] گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۳] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
[٤] گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

کلمات کلیدی

اثر محافظتی
آفت‌کش
مکمل ویتامینی
هماتولوژی

چکیده

مقدمه: سم ارگانوفسفره دیازینون با تأثیر روی موجودات غیرهدفی نظیر ماهیان باعث تغییر شاخص‌های خونی آن‌ها می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر ویتامین B6 (پیریدوکسین) برشاخص‌های خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه با سم دیازینون بود.

مواد و روش‌ها: ۱۲۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/۲٤±۷۵/۳۱ گرم با جیره غذایی پایه به‌مدت ۲ هفته و سپس با جیره حاوی B6 در ۲ تیمار ۵ و ۱۰ میلی‌گرم B6 به‌ازای هر کیلوگرم غذا) و یک تیمار شاهد (با جیره‌غذایی تجاری) طی ۳ هفته تغذیه شدند. تیمارهای ویتامین B6 با غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر دیازینون به‌مدت ۱۰ روز مواجه شدند. سنجش شاخص خون‌شناسی در پایان روزهای ۱، ۵ و ۱۰ انجام شد.

نتایج: کم‌ترین RBC و MCH در تیمار ۵ میلی‌گرم B6-دیازینون در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد ($p<0/05$). اثر زمان بر کاهش RBC در تمام روزها معنی‌دار بود ($p<0/05$). شاخص‌های RBC، HB، HCT، MCH و MCV و درصد لنفوسیت در روز دهم میزان بیش‌تری را در مقایسه با روز پنجم نشان داد ($p<0/05$). روز پنجم بیش‌ترین WBC را نسبت به روز یکم نشان داد ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری و بحث: درنتیجه ویتامین B6 در سطح ۱۰ میلی‌گرم توانست ازتأثیرات‌منفی دیازینون برماهی‌جلوگیری کند و بهبودشاخص خون‌شناسی به‌ویژه گلبول‌های قرمز، لوکوسیت و لنفوسیت تیمارهای مواجه شده با سم را با افزایش زمان طی روز دهم نشان دهد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Hamed_ghafari@alumni.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ٤ دی ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۸ بهمن ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۵ فروردین ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۸ اردیبهشت ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.281552.2506

مقدمه

دیازینون [o-o-دی‌اتیل o-(۲-ایزوپروپیل-۴متیل-۶-پایریمینیل) فسفوروتیوایت] با فرمول مولکولی، $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ و اثرات تماسی، گوارشی و تنفسی روی آبزیان است (۱). یکی از پرمصرف‌ترین سموم ارگانوفسفره در کشاورزی (سم‌پاشی درختان میوه، سبزیجات و مزارع برنج) است (۲). سمیت حشره‌کش‌های ارگانوفسفره بالا بوده و از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر ناشی از مسمومیت‌ها در کشورهای در حال توسعه می‌باشند (۳). این حشره‌کش‌ها پس از استفاده، در طی آبیاری بیش از حد و یا بعداز بارش باران‌های فصلی، از سطح گیاهان و خاک شسته می‌شوند و به آب‌های سطحی و زیرزمینی راه می‌یابند (۴، ۵). آلودگی این منابع تأمین‌کننده آبی می‌تواند تهدیدی جدی برای تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی باشد. تأثیرات حشره‌کش‌ها روی ماهیان با به‌کار بردن روش‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژی و رفتاری مورد بررسی قرار می‌گیرد (۶). این ماده سمی در محیط آبی و بدن موجودات زنده به Diazoxon شکسته و سمیت را در موجودات زنده سبب می‌شود (۷). مکانیسم اثرات سمی دیازینون همانند سایر حشره‌کش‌ها موجب مهار شدن کلیه آنزیم‌ها به‌ویژه استیل کولین استراز در پایانه‌های سیناپسی سمپاتیک و پاراسمپاتیک و در نتیجه تجمع نوروترنسمیتر استیل کولین در سیناپس‌های عصبی و تحریک بیش از حد گیرنده‌های کولینرژیک نیکوتنی و موسکارینی است (۸، ۹). از طرفی اثرات سمی دیازینون محدود به مهار آنزیم استیل کولین استراز نبوده بلکه به‌دنبال تحریک بیش از حد گیرنده‌های کولینرژیک، باعث آسیب غشاهای سلولی، تولید رادیکال‌های آزاد و مختل نمودن سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن می‌شوند (۳، ۱۰). در پی اختلال سیستم آنتی‌اکسیدانی تعادل بین تولید و حذف رادیکال آزاد از بین می‌رود و استرس اکسیداتیو را سبب می‌شود و با افزایش استرس اکسیداتیو، گلوتاتیون عامل اصلی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد تخلیه شده و تخلیه آن افزایش میزان رادیکال‌های آزاد را به‌دنبال دارد (۱۱). به‌دنبال افزایش غلظت رادیکال‌های آزاد، کمبود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در بدن داریم. در این‌جا مصرف آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند ویتامین‌ها موجب افزایش توانایی بدن و به‌عنوان راهکاری در جهت حذف رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شود (۱۲). ویتامین‌ها جزء مواد مغذی غیر انرژی‌زا در جیره با نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی در بدن هستند. ماهیان توانایی کمی در سنتز ویتامین دارند و یا اصلاً قادر به سنتز آن نیستند. بنابراین لازم است در جیره غذایی ماهیان مقادیر لازم و کافی ویتامین درنظر گرفته شود (۱۳). کوآنزیم پیریدوکسال ۵-فسفات پیریدوکسین (ویتامین B6) آنزیم اصلی در متابولیسم اسیدهای آمینه است. ماهیان تمایل زیادی به خوردن گوشت به‌ویژه در اوایل زندگی دارند و به سرعت علائم کمبود پیریدوکسین به شکل مشکلات عصبی (شامل تشنج، شنای غیرعادی و حساسیت فوق‌العاده) بروز می‌نمایند که ناشی از کاهش سنتز حدواسط‌هاست (۱۴). شاخص‌های خون‌شناسی یکی از گروه‌های شاخص زیستی هستند که به‌منظور ارزیابی سمیت حشره‌کش‌ها، وضعیت سلامت سیستم ایمنی و آسیب بافت‌شناسی در ارگانیسم‌های زنده از آن‌ها استفاده می‌شود (۱۵، ۱۶). شاخص‌های خون‌شناسی به‌دلیل حساس بودن به تغییرات عوامل محیطی، شاخص قابل اعتمادی جهت ارزیابی زیستی محسوب می‌شوند (۱۷). علاوه بر این شاخص خون‌شناسی اطلاعات مناسبی در مورد شرایط فیزیولوژیکی ارگانیسم‌ها فراهم می‌کنند (۱۸، ۱۹). مشتقات ویتامین B6 با سه روش شامل، ترکیب با گونه‌های فعال اکسیژن، تحریک سنتز گلوتاتیون و عدم ترکیب رادیکال‌های آزاد با گلوتاتیون، رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند (۱۴). تحقیقات زیادی در زمینه تأثیر سم ارگانوفسفره دیازینون روی ماهیان و تأثیر ویتامین‌ها در جیره غذایی آن‌ها و بهبود شرایط زیستی ماهیان مواجه شده با سم انجام شده است و می‌توان بررسی‌هایی از قبیل، تأثیر آفت‌کش دیازینون بر رفتار و برخی شاخص خون‌شناسی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (۲۰)، ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) (۲۱)، بچه ماهی کلمه ترکمنی (*Rutilus caspius*) (۲۲)، بچه‌ماهی سیم دریای خزر (*Abramis brama*) (۲۳) و جنس نر ماهی سفید (*Rutilus kutum*) (۲۴) را نام برد. در ارتباط با تأثیر ویتامین‌ها بررسی‌هایی از قبیل، اثر مکمل‌های ویتامین در مقابل سمیت دیازینون از جمله، لیکوپن و ویتامین E بر بهبود برخی پارامترهای خونی و بیوشیمیایی تیلاپیا موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) توسط (۲۵)، ویتامین E بر شاخص‌های رشد و تغییرات خون‌شناسی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان توسط (۲۶)، مکمل‌های ویتامین E، سلنیوم و C بر فعالیت دفاعی و آنتی‌اکسیدانی و شاخص پراکسیداسیون لیپید قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با غلظت تحت حاد دیازینون (۲۷) و اثر محافظتی بالقوه ویتامین E بر تخریب DNA و برخی تغییرات خون‌شناسی و بیوشیمیایی خون موش صحرایی مورد آزمایش قرار گرفت (۲۸). تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی اثر محافظتی ویتامین B6 بر پارامترهای خونی ماهی در مواجهه با سم انجام نشده است. و از آن‌جا که بیش‌تر منابع آبی سطحی مورد استفاده مزارع پرورشی، حاوی سموم پرمصرفی مثل دیازینون می‌باشند و خطر جدی برای ماهیان در معرض سم محسوب می‌شود و با توجه به افزایش روز افزون پرورش ماهی در مناطق کوهستانی و در مجاورت رودخانه‌های سرد و پر آب و ارزش اقتصادی و حساسیت بالای این ماهی به‌خصوص در مراحل ابتدایی زندگی، بنابراین این مطالعه با هدف بررسی تاثیر ویتامین B6 بر شاخص‌های

خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با سم دیازینون انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلا با میانگین وزنی ۰/۲۴±۷۵/۳۱ گرم از یک مزرعه خصوصی پرورش ماهیان خریداری و به کارگاه بیماری‌های آبزیان گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران انتقال داده شدند. پس از هم‌دمایی، جهت سازگاری، ماهیان با جیره تجاری فرموله به‌مدت ۲ هفته غذادهی شدند. سپس ماهیان در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل، بر اساس ۴ تیمار (جیره حاوی ویتامین B6 در ۲ تیمار ۵ و ۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم غذا) و یک تیمار شاهد (جیره تجاری فرموله) با ۳ تکرار در گروه‌های ۱۲تایی در مخازن ۱۰۰ لیتری نگه‌داری شدند. با توجه به میانگین وزن و طول ماهیان اندازه‌گیری شده جیره غذایی در سایز (۵/۵-۴) میلی‌متر تهیه شد. جیره غذایی از شرکت بهپرور طبق جدول ۱ با ترکیب تقریبی پروتئین خام (۴۵۳/۲)، لیپید خام (۹۱/۴)، خاکستر (۱۱۰/۲) و GE (۲۰/۷۱ میلی‌ژول بر کیلوگرم) خریداری شد. قبل از غذادهی روزانه، جیره غذایی توسط ترازو با دقت ۰/۱ گرم توزین و داخل ظرف‌های پلاستیکی درب‌دار در جای خنک نگه‌داری می‌شد. غذادهی به‌میزان ۳ درصد وزن بدن به‌صورت دستی و در سه نوبت در طی ساعات ۷، ۱۲ و ۱۸ انجام گردید(۲۶). جیره‌های پایه، فقط حاوی مکمل ویتامینی در ساختار جیره بودند. در تهیه جیره حاوی ویتامین B6 مقادیر مورد نیاز B6 برای قزل‌آلای رنگین‌کمان ۱۵-۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن است (۲۹). ابتدا مقادیر ویتامین توسط ترازو با دقت ۰/۱ گرم، با در نظر گرفتن مقدار جیره روزانه توزین شدند. در مرحله بعد مقدار ویتامین توزین شده در ۱۰ سی‌سی آب حل شد و به‌منظور جدا نشدن ویتامین B6 از پلت‌ها، مقداری روغن کانولا به محلول آب و ویتامین B6 اضافه شد و سپس به‌صورت اسپری روی سطح پلت‌ها پخش شد. روش مخلوط کردن جیره با ویتامین B6 بر اساس روش روغن پوش‌سازی (Oil coating) بود (۳۰).

جدول ۱: فرمولاسیون جیره غذایی (گرم بر کیلوگرم ماده خشک) و ترکیبات تقریبی جیره غذایی تجاری فرموله شرکت بهپرور

عناصر غذایی	آرد ماهی	کنجاله سویا	نشاسته ذرت	روغن سویا	روغن ماهی	ویتامین	مواد معدنی	CMC
مقدار	۴۵۵	۱۸۰	۲۱۳	۴۸/۸	۲۳/۱	۳۰	۳۰	۲۰

در این مطالعه دیازینون به شکل امولسیون ۶۰ درصد آماده شد. در مرحله بعد تهیه غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون انجام گرفت. با توجه به تعویض ۵۰ درصدی آب مخازن، میزان سم خارج شده در حین تعویض آب، محاسبه و به‌طور روزانه به مخازن آب افزوده می‌شد. با توجه به‌میزان LC_{50} گزارش شده توسط Banaee و همکاران، در طی مدت ۹۶ ساعته که (۹۲/۴۳-۰/۱) ۱/۱۷ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (۲۱)، میزان دوز به‌کار برده شده ۰/۱۲ میلی‌گرم دیازینون، در هر لیتر آب مخازن بود (۳۱). ماهیان براساس طرح آزمایشی در ۳ تیمار آزمایشی به‌مدت ۳ هفته با جیره غذایی حاوی ویتامین B6(پیریدوکسین) با دوز صفر (شاهد)، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن غذای ماهیان تغذیه شدند (۱۴). سپس، گروه‌های آزمایشی به‌مدت ۱۰ روز در مجاورت سم دیازینون قرار گرفتند. در پایان روزهای ۱، ۵ و ۱۰ از هر تیمار به‌طور تصادفی حداقل سه تا پنج ماهی انتخاب و توسط محلول پودر گل میخک به‌روش Mehrabi با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌مدت ۱۰ دقیقه بی‌هوش شدند (۳۲). خونگیری به‌میزان ۱/۵ سی‌سی به‌روش Ruane و همکاران، از ورید ساقه دمی توسط سرنگ هپارینه ۲ سی‌سی استریل انجام شد و نمونه‌ها به تیوپ‌های ۱/۵ سی‌سی برای اندازه‌گیری به آزمایشگاه انتقال داده شدند (۳۳). اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب مخازن، به‌صورت روزانه صورت گرفت. به‌طوری‌که، دمای آب توسط دماسنج ^{oC} ۰/۵±۱۶/۵۷، pH توسط دستگاه pH سنج قابل حمل ۰/۰۴±۷/۶، اکسیژن محلول با دستگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن ۰/۲۵±۸/۳۴ میلی‌گرم بر لیتر و شوری با دستگاه شوری‌سنج ۰/۳ (ppt) بود. هم‌چنین جهت حفظ کیفیت آب و خروج مواد زائد، غذاهای خورده نشده سیفون و تعویض آب روزانه انجام می‌گرفت. شرایط نوری به‌صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی بود.

شمارش گلبول‌های قرمز و سفید براساس روش Haghighi، با استفاده از لام هماسیتومتر در یک میلی‌لیتر از حجم خون طبق فرمول زیر محاسبه شد (۳۴):

$RBC= N \times 10000$

N= مجموع گلبول‌های سفید در ۵ مربع کوچک لام هماتوسیتومتر با درشت نمایی ۴۰

$WBC= N \times 500$

N = مجموع گلبول‌های سفید در ۵ مربع کوچک لام هماتوسیتومتر با درشت نمایی ۴۰

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون WBC (میلی‌متر مکعب)، پس از تهیه گسترش‌های خونی شمارش آن‌ها براساس روش Simons،

از طریق دو لامی انجام گرفت (۳۵). درصد هماتوکریت (HCT) بر اساس روش Haghighi، توسط لوله‌های موئینه هماتوکریت به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند (۳۴). در پایان میزان هماتوکریت برحسب درصد توسط خط‌کش میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد. هموگلوبین HB (گرم بر دسی‌لیتر) به‌روش Haghighi، به‌وسیله کیت مخصوص شرکت پارس آزمون و به‌صورت کلرومتریک با طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل JENWAY 6305 انگلیس) اندازه‌گیری شد. مقدار قرائت شده از روی دستگاه برای محاسبه میزان هموگلوبین با منحنی استاندارد مقایسه شد و برحسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر به‌دست آمد (۳۰). متوسط حجم گلبولی MCV (فمتولیتر)، متوسط میزان هموگلوبین در هر سلول خونی (MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین موجود در واحد حجمی سلول‌های قرمز خون (MCHC) براساس روش Stoskopf، طبق فرمول‌های زیر به‌دست آمد (۳۶):

$$MCHC = Hb \times 10/Hct$$

$$MCV = Hct \times 10/RBC\ (million)$$

$$MCH = Hb \times 10/RBC\ (million)$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: پس از نرمال بودن داده‌ها با آزمون Kolmogronov-Smirnov، تأثیر تیمارهای مختلف آزمایشی و روزهای نمونه‌برداری و تأثیر متقابل آن‌ها بر هریک از شاخص‌های اندازه‌گیری شده، از آزمون یک متغیره General linear model استفاده شد. هم‌چنین، از آنالیز واریانس دوطرفه (Tow-way ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ برای بررسی تفاوت میانگین با انحراف معیار تیمارهای مختلف در هر روز نمونه‌برداری استفاده گردید. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از بسته نرم‌افزاری SPSS نسخه ۲۰ انجام گرفت.

نتایج

زمان، براساس ارزش F از تجزیه واریانس دوطرفه اثر قوی‌تری بر میزان شاخص خون‌شناسی در مقایسه با غلظت نشان داد. براساس نتایج آزمون معنی‌داری بیش‌ترین میزان WBC در روز پنجم با اختلاف معنی‌داری در مقایسه با روز یکم نشان داده شد ($p<۰/۰۵$) هم‌چنین تیمار ۱۰ میلی‌گرم B6-دیازینون بالاترین سطح WBC را بدون اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($p>۰/۰۵$). بیش‌ترین میزان درصد لنفوسیت روز دهم با اختلاف معنی‌داری در مقایسه با روز پنجم نشان داده شد ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین بیش‌ترین میزان شاخص لنفوسیت، بدون اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها در تیمار ۱۰ میلی‌گرم B6-دیازینون نتیجه شد ($p>۰/۰۵$). بیش‌ترین میزان درصد مونوسیت را در تیمار ۱۰ میلی‌گرم B6-دیازینون در روز پنجم بین تیمارها نشان داد. ولی این اختلاف معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$). نتایج به‌دست آمده از آزمون معنی‌داری کم‌ترین میزان درصد نوتروفیل را در تیمار ۱۰ میلی‌گرم B6-دیازینون در روز دهم بدون اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($p>۰/۰۵$). نتایج تغییر شاخص خون‌شناسی گلبول‌های سفید خون به‌ترتیب در جدول ۲ نشان داده شده است.

سلول‌های قرمز خون (RBC)، زمان، براساس ارزش F از تجزیه واریانس دوطرفه اثر قوی‌تری بر شاخص خون‌شناسی نشان داد. نتایج به‌دست آمده از آزمون معنی‌داری کم‌ترین میزان RBC با اختلاف معنی‌داری با سایر روزها را در روز پنجم نشان داد ($p<۰/۰۵$) هم‌چنین تیمار ۵ میلی‌گرم B6-دیازینون کم‌ترین میزان شاخص را با اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان داده شد ($p<۰/۰۵$). کم‌ترین میزان HB در روز پنجم با اختلاف معنی‌داری با روزهای دهم و یکم مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) و کم‌ترین میزان این شاخص در تیمار ۵ میلی‌گرم B6-دیازینون بدون اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داده شد ($p>۰/۰۵$). کم‌ترین میزان درصد HCT در روز پنجم با اختلاف معنی‌داری با روزهای دهم و یکم مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) هم‌چنین کم‌ترین میزان این شاخص در تیمار ۱۰ میلی‌گرم B6-دیازینون نشان داده شد ولی هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). نتایج حاصل از آزمون معنی‌داری بیش‌ترین میزان MCH را در روز ۱۰ اختلاف معنی‌داری با روز پنجم نشان داد ($p<۰/۰۵$). در بین تیمارها کم‌ترین میزان شاخص در تیمار دیازینون اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). نتایج حاصل از آزمون معنی‌داری بیش‌ترین میزان MCV را در روز ۱۰ با اختلاف معنی‌داری با روز پنجم نشان داد ($p<۰/۰۵$). در بین تیمارها کم‌ترین میزان شاخص در تیمار دیازینون مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نداشت ($p>۰/۰۵$). نتایج به‌دست آمده از آزمون معنی‌داری کم‌ترین میزان MCHC را تیمار ۵ میلی‌گرم B6-دیازینون بدون اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($p>۰/۰۵$). هم‌چنین با افزایش زمان تا روز دهم میزان شاخص افزایش نشان داد ولی این افزایش معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$). نتایج تغییر شاخص خون‌شناسی گلبول‌های قرمز خون به‌ترتیب در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲: تغییر شاخص خون‌شناسی گلبول‌های سفید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با غلظت‌های مختلف ویتامین B6 در مواجهه با سم دیازینون در زمان‌های ۱، ۵ و ۱۰ روز

شاخص‌ها / تیمار	شاهد	۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر دیازینون	۵ میلی‌گرم B_6+ ۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر دیازینون	۱۰ میلی‌گرم B_6+ ۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر دیازینون
گلبول سفید (میلی‌متر مکعب) WBC				
روز یکم	۱۳۲۶۶/۶۶ ± ۹۰۱/۸۴^{b}	۱۲۷۶۶/۶۶ ± ۷۳۷/۱۱^{b}	۱۱۵۰۰/۰۰ ± ۲۹۰۵/۱۶^{b}	۱۴۰۳۳/۳۳ ± ۵۵۰/۷۵^{b}
روز پنجم	۱۶۷۳۳/۳۳ ± ۱۷۲۴/۳۳^{a}	۱۲۰۳۳/۳۳ ± ۱۴۵۷/۱۶^{a}	۱۷۳۰۰/۰۰ ± ۶۸۹۴/۲۰^{a}	۱۸۴۰۰/۰۰ ± ۲۶۴۵/۷۵^{a}
روز دهم	۱۶۰۶۶/۶۶ ± ۲۶۰۲/۵۶^{ab}	۱۵۵۳۳/۳۳ ± ۴۲۰۹/۹۰^{ab}	۱۳۴۶۶/۶۶ ± ۹۴۵/۱۶^{ab}	۱۴۱۳۳/۳۳ ± ۱۲۲۲/۰۲^{ab}
لنفوسیت (درصد) Lymphocyte				
روز یکم	۸۴/۶۶ ± ۱/۵۲^{ab}	۸۵/۰۰ ± ۵/۲۹^{ab}	۸۶/۶۶± ۳/۰۵^{ab}	۸۵/۳۳ ± ۳/۵۱^{ab}
روز پنجم	۸۶/۶۶ ± ۲/۵۱^{b}	۸۳/۳۳ ± ۶/۴۲^{b}	۷۹/۶۶ ± ۳/۷۸^{b}	۸۶/۳۳ ± ۶/۰۲^{b}
روز دهم	۸۶/۳۳ ± ۳/۲۱^{a}	۸۷/۶۶ ± ۲/۳۰^{a}	۸۹/۳۳ ± ۲/۵۱^{a}	۸۹/۰۰ ± ۳/۰۰^{a}
مونوسیت (درصد) Monocyte				
روز یکم	۶/۳۳ ± ۱/۵۲	۴/۰۰ ± ۱/۰۰	۴/۶۶ ± ۱/۱۵	۹/۰۰ ± ۳/۰۰
روز پنجم	۵/۶۶ ± ۱/۵۲	۷/۰۰ ± ۲/۶۴	۹/۳۳ ± ۲/۰۸	۵/۰۰ ± ۲/۰۰
روز دهم	۵/۶۶ ± ۲/۰۸	۵/۶۶ ± ۳/۷۸	۴/۳۳ ± ۰/۵۷	۵/۶۶ ± ۱/۵۲
نوتروفیل (درصد) Neutrophil				
روز یکم	۹/۰۰ ± ۳/۰۰	۱۱/۰۰ ± ۴/۵۸	۸/۶۶ ± ۳/۰۵	۵/۶۶ ± ۳/۰۵
روز پنجم	۷/۶۶ ± ۲/۰۸	۹/۶۶ ± ۳/۷۸	۱۱/۰۰ ± ۴/۵۸	۸/۶۶ ± ۴/۰۴
روز دهم	۸/۰۰ ± ۳/۰۰	۶/۶۶ ± ۱/۵۲	۶/۳۳ ± ۲/۰۸	۵/۳۳ ± ۱/۵۲

داده‌های جدول بیانگر میانگین ± انحراف معیار سه تکرار می‌باشند. حروف کوچک متفاوت (a, b) در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار طی زمان مواجهه با سم در سطح (p<۰/۰۵) می‌باشد.

جدول ۳: تغییر شاخص خون‌شناسی گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با غلظت‌های مختلف ویتامین B6 در مواجهه با سم دیازینون در زمان‌های ۱، ۵ و ۱۰ روز

شاخص‌ها / تیمار	شاهد	۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر دیازینون	۵ میلی‌گرم B_6+ ۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر دیازینون	۱۰ میلی‌گرم B_6+ ۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر دیازینون
گلبول قرمز (۱۰^{۶}/ میکرولیتر) RBC				
روز یکم	۴/۶۳ ± ۰/۱۵^{Aa}	۵/۱۶ ± ۰/۵۱^{ABa}	۴/۵۶ ± ۰/۷۰^{Ba}	۴/۶۰ ± ۰/۵۲^{ABa}
روز پنجم	۴/۵۳ ± ۰/۲۵^{Ac}	۳/۵۶ ± ۰/۷۰^{ABc}	۳/۵۶ ± ۰/۳۲^{Bc}	۳/۲۶ ± ۰/۲۰^{ABc}
روز دهم	۴/۳۳ ± ۰/۱۵^{Ab}	۴/۳۶ ± ۰/۵۱^{ABb}	۳/۹۳ ± ۰/۱۵^{ABb}	۴/۷۳ ± ۰/۵۰^{ABb}
هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر) HB				
روز یکم	۱۴/۳۶ ± ۱/۲۰^{a}	۱۵/۶۶ ± ۲/۸۳^{a}	۱۴/۰۳ ± ۳/۰۸^{a}	۱۴/۷۶ ± ۱/۰۵^{a}
روز پنجم	۱۵/۳۶ ± ۲/۸۵^{b}	۹/۹۶ ± ۳/۴۵^{b}	۱۰/۸۶ ± ۲/۲۵^{b}	۸/۹۶ ± ۱/۱۸^{b}
روز دهم	۱۵/۲۳ ± ۱/۷۱^{a}	۱۳/۷۰ ± ۲/۵۵^{a}	۱۳/۵۳ ± ۰/۹۶^{a}	۱۵/۲۶ ± ۰/۷۵^{a}
هماتوکریت (درصد) HTC				
روز یکم	۴۲/۳۳ ± ۲/۵۱^{a}	۴۸/۰۰ ± ۸/۶۶^{a}	۴۳/۳۳ ± ۸/۹۶^{a}	۴۵/۳۳ ± ۳/۵۱^{a}
روز پنجم	۴۶/۶۶ ± ۹/۶۰^{b}	۳۱/۶۶ ± ۱۰/۴۰^{b}	۳۲/۶۶ ± ۶/۸۰^{b}	۲۶/۳۳ ± ۲/۸۸^{b}
روز دهم	۴۶/۰۰ ± ۶/۰۰^{a}	۴۰/۶۶ ± ۷/۷۶^{a}	۴۲/۶۶ ± ۰/۵۷^{a}	۴۲/۶۶ ± ۰/۵۷^{a}
متوسط هموگلوبین گلبولی (پیکوگرم) MCH				
روز یکم	۳۱/۰۰ ± ۲/۶۴^{Aab}	۳۰/۳۳ ± ۳/۰۵^{Bab}	۳۰/۶۶ ± ۲/۵۱^{ABab}	۳۲/۳۳ ± ۲/۰۸^{ABab}
روز پنجم	۳۳/۶۶ ± ۴/۵۰^{Ab}	۲۷/۰۰ ± ۴/۴۴^{Bb}	۳۰/۳۳ ± ۳/۷۸^{ABb}	۲۷/۵۰ ± ۲/۷۸^{ABb}
روز دهم	۳۴/۱۶ ± ۳/۶۱^{Aa}	۳۱/۱۶ ± ۲/۷۵^{Ba}	۳۴/۳۳ ± ۲/۰۸^{ABa}	۳۲/۱۶ ± ۲/۰۲^{ABa}
متوسط حجم گلبولی (فمتولیتر) MCV				
روز یکم	۸۸/۱۶ ± ۵/۵۳^{ab}	۹۲/۶۶ ± ۸/۷۳^{ab}	۹۴/۳۳ ± ۷/۵۰^{ab}	۹۸/۶۶ ± ۴/۱۶^{ab}
روز پنجم	۹۷/۳۳ ± ۲۰/۲۰^{b}	۸۶/۸۳ ± ۱۳/۷۱^{b}	۹۰/۸۳ ± ۱۱/۴۴^{b}	۸۰/۵۰ ± ۶/۷۶^{b}
روز دهم	۹۵/۶۶ ± ۱۲/۵۰^{a}	۹۲/۵۰ ± ۷/۴۶^{a}	۱۰۸/۶۶ ± ۴/۰۴^{a}	۹۴/۶۶ ± ۵/۰۳^{a}
متوسط هموگلوبین داخل گلبول قرمز (گرم بر دسی‌لیتر) MCHC				
روز یکم	۳۴/۰۰ ± ۲/۶۴	۳۲/۶۶ ± ۰/۵۷	۳۲/۳۳ ± ۰/۵۷	۳۲/۶۶ ± ۰/۵۷
روز پنجم	۳۳/۰۰ ± ۱/۰۰	۳۱/۶۶ ± ۳/۲۱	۳۳/۴۰ ± ۰/۵۲	۳۴/۰۰ ± ۱/۰۰
روز دهم	۳۳/۱۶ ± ۱/۰۴	۳۳/۶۶ ± ۰/۵۷	۳۲/۰۰ ± ۲/۰۰	۳۴/۳۳ ± ۰/۵۷

داده‌های جدول بیانگر میانگین ± انحراف معیار سه تکرار می‌باشند. حروف بزرگ متفاوت (A, B) در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح (p<۰/۰۵) می‌باشد. حروف کوچک متفاوت (a, b, c) در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار طی زمان مواجهه با سم در سطح (p<۰/۰۵) می‌باشد.

بحث

خون‌شاخصی مناسب در تعیین سلامت موجود زنده است و در تشخیص اثرات سمیت بر تغییرات شاخص‌های خون‌شناسی ماهیانی که در معرض سم بوده‌اند نقش مهمی ایفا می‌کند (۳۷). در این مطالعه اثر غلظت ویتامین B6 و هم‌چنین مدت زمان قرار گرفتن ماهیان در معرض سم دیازینون بر شاخص‌های خون‌شناسی شامل تغییراتی بود که زمان اثر قوی‌تری نشان داد. بروز این تغییرات نشان‌دهنده دومین سطح پاسخ ماهی به عوامل تحریک کننده است (۳۸). در مطالعه حاضر، شاخص‌های گلبول قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در مواجهه با سم در مقایسه با تیمار شاهد کاهش نشان دادند. میزان کم‌تر گلبول قرمز در تیمار ۵ میلی‌گرم B6-دیازینون در مقایسه با تیمار شاهد دیده شد. زمان، اثر بیش‌تری بر تغییرات پارامترهای خون‌شناسی نشان داد به‌طوری‌که بیش‌ترین کاهش در روز پنجم مشاهده شد. علت سیر کاهشی شاخص‌های خون‌شناسی در روز پنجم می‌تواند مرتبط با کاهش مقاومت ماهی و فرصت تأثیرگذاری بیش‌تر سم روی ماهی باشد و در صورت تجمع در اندام‌های خون‌ساز باعث تشدید اثرات منفی سم می‌شود (۳۹). شاخص‌های خون‌شناسی در روز دهم به سطحی نزدیک به روز یکم رسیدند. محققین علت افزایش مجدد شاخص‌ها را با افزایش زمان در ارتباط با سازگاری‌های فیزیولوژیک ماهی در گذشت زمان و در نتیجه کاهش اثر سمیت گزارش دادند (۴۰). هم‌چنین کاهش گلبول‌های قرمز در طول زمان در مقایسه با روز یکم، می‌تواند به‌علت مرگ گلبول‌های قرمز در اثر آلاینده‌ها و تا حدودی مرتبط با کاهش گلبول‌های سفید ماهی باشد (۴۱). سطح بالای شاخص‌های مذکور در تیمار دیازینون می‌تواند مرتبط با اثر استرسی سم و افزایش فعالیت تنفسی ماهی باشد. به این ترتیب که ماهیان در مواجهه با عوامل استرسی نظیر آفت‌کش‌ها در اولین واکنش سبب تحریک اندام‌های تولیدکننده گلبول‌های قرمز نظیر طحال شده و باعث افزایش رهاسازی گلبول‌های خونی به جریان خون می‌شوند (۴۲). به‌دنبال افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، افزایش هموگلوبین در داخل گلبول‌های قرمز به‌عنوان عامل انتقالی اکسیژن و افزایش هماتوکریت به جهت افزایش اندازه یا تعداد گلبول قرمز شکل می‌گیرد (۴۳) و در پی تجمع در سلول‌های آبششی جهت رفع نیاز تنفسی، سبب کاهش تعداد و یا تغییر اندازه گلبول‌های قرمز در جریان خون می‌شود و به‌عبارتی ماهی دچار کم‌خونی می‌شود (۴۴). B6-دیازینون در مقایسه با دیازینون مقادیر کم‌تری در کاهش گلبول‌های قرمز نشان داد. البته مکانیسم اثر محافظتی B6 روی تیمارها دقیق مشخص نیست، ولی از مهم‌ترین شاخص‌های رفتاری ماهیان در معرض سم دیازینون به‌دنبال افزایش نیاز اکسیژنی، شنای عصبی و افزایش حساسیت به شرایط استرسی محیط است (۴۵). Saberi و همکاران،اثر استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون بر میزان گلوتاتیون در سلول‌های نوروگلیای رده U373MG و میان کنش آن با ویتامین B6 را مورد بررسی قرار دادند (۴۶). در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که دیازینون احتمالاً با ایجاد استرس اکسیداتیو و کاهش میزان گلوتاتیون، برای سلول‌های رده U373MG سمی است و تجویز ویتامین B6 به‌صورت پیش‌درمانی یا پس درمانی می‌تواند اثر محافظتی نموده و از کاهش گلوتاتیون و نیز مرگ سلولی ناشی از دیازینون جلوگیری نماید. هم‌چنین با توجه به توانایی تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال سیستم آنتی‌اکسیدانی توسط دیازینون، نقش ویتامین B6 در مطالعات اخیر به‌عنوان یک حذف کننده قوی اکسیژن منفرد در قارچ (*Cercospora nicotiana*) نشان داده شد (۴۷). مکانیسم دقیق توسط ویتامین B6 که در برابر استرس اکسیداتیو مقابله می‌نماید در دسترس نیست. با این وجود پیشنهاد شده است که با حضور OH، NH_2 و حلقه پیریدین در ویتامین B6 می‌تواند به پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن کمک کند (۴۸). در تطابق با نتایج اثر ویتامین B6 روی کاهش استرس اکسیداتیو در مطالعه حاضر، می‌توان به گزارش Mirvaghefi و همکاران اشاره داشت (۲۷). آزمایش‌های مشابهی قبلاً با استفاده از آفت‌کش‌ها بر روی دیگر ماهیان دیگر انجام گرفته است ازجمله Casillas و Smith، اثرات استرس را روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را بررسی نمودند و نشان دادند که استرس به هر دلیلی افزایش گلبول‌های قرمز خون و در نتیجه هموگلوبین و هماتوکریت را سبب می‌شود (۴۹) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین نتایج تحقیقات Koprocu و همکاران، روی گربه‌ماهی اروپایی (*Silurus glanis*) مواجه شده با سم دیازینون با تحقیق حاضر مطابقت دارد (۱). Vani و همکاران، تغییرات شاخص خون‌شناسی و بیوشیمیایی ماهی انگشت‌قد کاتلا (*Catla catla*) و هم‌چنین بهبود جیره غذایی با مکمل ویتامین C را بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند کاهش مقدار هموگلوبین و هماتوکریت در طول زمان در ارتباط با مهار گلبول قرمز، اختلال در تنظیم اسمزی و سنتز هموگلوبین به‌دلیل افزایش تخریب گلبول‌های قرمز در اندام‌های خون‌ساز است (۵۰) و نتایج تحقیق حاضر این نتایج را تأیید می‌کند. در مطالعه دیگری Veness و همکاران، اثر محافظتی ویتامین E روی تخریب DNA و تغییرات برخی شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی موش صحرایی را بررسی نمودند و نشان دادند با افزایش زمان، مقدار گلبول‌های قرمز در تمام تیمارها کاهش یافت و این کاهش در تیمارهای حاوی سم معنی‌دار بود (۲۸) که با تحقیق حاضر مطابقت نشان داد. افزایش مقادیر گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت ماهی تیلاپیا را در تیمارهای حاوی ویتامین E/لیکوپن/دیازینون در مقایسه با سایر تیمارها گزارش نمودند. این مغایرت می‌تواند به‌دلیل اثرات استرسی

دیازینون روی ماهی باشد و علت این عملکرد را می‌توان به مطالعات محققین زیر در تطابق با نتایج این تحقیق ارجاع داد. Nilson و همکاران، در بررسی خود روی ماهی کاد (*Gadus morhua*) نیز گزارش دادند تحریکات عصبی هورمون آدنرژیکی ناشی از استرس، افزایش سه شاخص RBC، PCV و HB را سبب می‌شوند (۵۱). هم‌چنین Jaddi و همکاران، در مطالعه خود اثر سمیت تحت‌کشنده دیازینون در غلظت‌های مختلف بر برخی پارامترهای خونی ماهی سیم دریای خزر را به‌مدت ۱۴ روز بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند پس از مدت زمان ۷ و ۱۴ روز در معرض قرارگیری با سم دیازینون، مقادیر گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت کاهش معنی‌دار نشان دادند (۲۳) که با مطالعه حاضر، تنها در کاهش گلبول‌های قرمز با افزایش زمان مطابقت نشان داد. هم‌چنین در مغایرت با نتایج این تحقیق، Ibrahim و Banaee (۲۵) و هم‌چنین Bansal و Dalela (۵۲)، اثر مواد شیمیایی روی پارامترهای خون‌شناسی ماهی را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که یک‌سری از مواد شیمیایی مثل آلدرین، کلروان، متاسیستوکس، مس و ازون باعث افزایش HB، PCV و RBC در ماهیان می‌شوند و دسته دیگر مثل کادمیوم، سرب، جیوه، روی و مالاتیون باعث کاهش HB، HTC و RBC و کم‌خونی می‌شوند. البته استرس در صورتی باعث افزایش شاخص‌های نام برده می‌شود که مواد شیمیایی در دوز حاد وارد محیط شوند. در مطالعه حاضر با وجود غلظت تحت حاد سم دیازینون اثر استرسی سم روی تیمار دیازینون دیده شد. در تأیید این وضعیت محققین بیان کردند دیازینون حتی در غلظت‌های تحت‌کشنده روی سیستم عصبی ماهیان از طریق توقف فعالیت استیل کولین استراز مؤثر است (۷). در رابطه با هموگلوبین موجود خون، سه شاخص حجم سلول‌های قرمز (MCV)، متوسط میزان هموگلوبین در هر سلول خونی (MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین موجود در واحد حجمی سلول‌های قرمز خون (MCHC) مطرح می‌گردد (۵۳). MCHC شاخص مناسبی برای بررسی میزان حمل اکسیژن است. در تحقیق حاضر در مقایسه شاخص‌های مذکور بین تیمارها فقط MCH در تیمار دیازینون در مقایسه با تیمار شاهد کم‌ترین میزان را به‌صورت معنی‌داری نشان داد و در دو شاخص دیگر تیمارهای B6-دیازینون مقادیر نزدیک‌تری به گروه شاهد نشان دادند. در بررسی تأثیر زمان کاهش معنی‌دار شاخص‌های MCH و MCV را فقط در روز پنجم نشان داد. مکانیسم دقیق تغییرات شاخص خونی MCV، MCH و MCHC مشخص نیست و احتمالاً این تغییرات ناشی از تأثیر مستقیم سم بر بافت‌های خون‌ساز کلیه و طحال باشد (۵۴). در مشابهت با نتایج تحقیق حاضر، در گزارش Ibrahim و Banaee (۲۵)، پارامترهای خون‌شناسی MCH، MCV و MCHC در تیمارهای حاوی E/لیکوپن/دیازینون هم بین تیمارها و هم در گذر زمان از ۱۴ روز به ۲۸ روز افزایش نشان دادند. Nourian و همکاران، در بررسی تأثیر سم دیازینون بر پارامترهای خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان افزایش MCV و MCH را گزارش دادند (۳۱) و با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نشان داد. Jaddi و همکاران، کاهش در شاخص‌های مذکور را با پس از مدت زمان ۷ و ۱۴ روز مواجهه با سم دیازینون نشان دادند (۲۳). البته این کاهش در MCV معنی‌دار نبود و نتایج این محققین با نتایج تحقیق حاضر مغایرت نشان داد. در مغایرت با نتایج این تحقیق، Dorucu و Girgin، با بررسی تأثیر سم دیازینون بر روی پارامترهای خون‌شناسی گربه‌ماهی اروپایی (*Silurus glanis*) افزایش محتوای MCV، MCH و MCHC را گزارش دادند (۵۵). Kopruku و همکاران، در مطالعه خود اثرات سم دیازینون روی رفتار و برخی از پارامترهای خون‌شناسی گربه‌ماهی اروپایی را بررسی و به این نتیجه رسیدند که ماهیان بعد از تأثیر غلظت حاد دیازینون به صورت معنی‌داری در میزان اریتروسیت (گلبول‌های قرمز)، لوکوسیت (گلبول‌های سفید)، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH و MCHC کاهش نشان دادند (۱) که با نتایج تحقیق حاضر به‌جز در مقادیر MCV، MCH و MCHC مغایرت دارد. علت مغایرت می‌تواند در ارتباط با متفاوت بودن حساسیت ماهیان به مواد سمی باشد و در واقع شدت سمیت دیازینون بین گونه‌های مختلف متغیر است و تابع عواملی چون سن، جنس، اندازه بدن، شرایط اقلیمی، ترکیب شیمیایی سم، شیمی محیط زیست، غلظت سم و سایر فاکتورها باشد (۵۵، ۵۶). در بررسی حاضر بهبودی اثر محافظتی B6 بر شاخص‌های WBC، لنفوسیت، نوتروفیل و مونوسیت تفاوت معنی‌داری بین تیمارها را فقط در تیمار ۱۰ میلی‌گرم B6-دیازینون در شاخص WBC نشان داد. بیش‌ترین میزان لنفوسیت در روز دهم نسبت به روز پنجم و بیش‌ترین میزان WBC با اختلاف معنی‌داری در مقایسه با روز یکم مشاهده شد. کاهش لنفوسیت در روز پنجم به‌علت تحریک سیستم دفاعی بدن و دیگری ترشح کورتیکول یکی از هورمون‌های استروئیدی در شرایط استرسی است (۵۷). تعداد گلبول‌های سفید خون تحت تأثیر عوامل استرسی و بیماری ممکن است کاهش یا افزایش نشان دهد (۵۲). محققین افزایش سطح گلبول‌های سفید خون را در ماهیان قرار گرفته در معرض استرس به سبب توانایی ماهی در تقویت سیستم ایمنی خود و سازگاری با شرایط محیطی سمی بیان نمودند (۱۷). محققین علت افزایش گلبول‌های سفید خون و آزادسازی آن از طحال به جریان خون را در ارتباط با مکانیسم دفاعی بدن در مقابل عامل استرس بیان نمودند. تغییرات شاخص خونی ممکن است از طریق تحریک خون‌سازی و یا اختلال در سوخت و ساز بدن در اثر مواجهه با سم باشد (۵۶، ۵۸). در شباهت با نتایج این تحقیق Veness و همکاران، اثر محافظتی ویتامین E بر بهبود پارامترهای خون‌شناسی و محتوای

گلبول‌های سفید در مقایسه با گروه شاهد، دیازینون و E-دیازینون به‌طور قابل توجهی بالاتر بود (۲۸). مکانیسم ویتامین E از طریق خنثی‌سازی پراکسیداسیون چربی‌های غیراشباع و لیپیدهای غشایی با مهار اکسیژن آزاد گزارش شد(۵۹). در مطالعه Ibrahim و Banaee، اثر محافظتی لیکوپن-E بر کاهش اثرات مخرب سم دیازینون روی پارامترهای خون‌شناسی قزل‌آلای رنگین‌کمان و حفظ سطح مطلوب مقادیر خونی گزارش شد (۲۵). هم‌چنین در این مطالعه تیمارهای دیازینون به‌صورت معنی‌داری محتوای بالایی در درصد شاخص‌های مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل نشان دادند و با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نشان داد. Mohammadnejad Shamoshaki و همکاران، اثر مواجهه با سم دیازینون به‌مدت ۹۶ ساعت با غلظت کشنده ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر را روی مولدین نر ماهی سفید بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند شاخص‌های خون‌شناسی ماهی تحت تأثیر اثرات منفی دیازینون قرار گرفت و کاهش محتوای گلبول‌های سفید و لنفوسیت خون را گزارش دادند (۲۴) و مطابق با نتایج تحقیق حاضر در تیمار دیازینون می‌باشد. در بررسی تأثیر مدت زمان، شاخص‌های مونوسیت و نوتروفیل با افزایش زمان روند افزایشی- کاهشی نشان دادند. نوتروفیل با وظیفه فاگوسیتوز عامل خارجی بیش‌ترین سطح را در تیمار دیازینون در روز پنجم نشان داد. مکانیسم عمل فاگوسیتوز از طریق آنزیم منحصر به فرد میلوپراکسیداز در پی تولید رادیکال اکسیداتیو H_2O_2، هالیدها و اسیدهای هیپوهالیک است (۵۴) و علت این افزایش را در نتیجه آسیب اندام‌های خون‌ساز گزارش نمودند. در واقع مسمومیت و بیماری‌های شدید مانند نارسایی کلیه باعث نوتروفیلی شدن می‌شوند (۶۰). در مطابقت با نتایج تحقیق، Saeedi Far و همکاران، کاهش لنفوسیت‌ها و افزایش لنفوسیت‌ها را در ارتباط با اثرات سمی دیازینون بر رفتار و برخی شاخص‌های خون‌شناسی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیان نمودند(۲۰). هم‌چنین Svoboda و همکاران، کاهش معنی‌دار گلبول‌های سفید، درصد لنفوسیت خون، گرانوله شدن گلبول‌های سفید و افزایش نوتروفیل را در بچه‌ماهیان کپور مواجهه شده با سم دیازینون گزارش نمودند (۶۱). Jaddi و همکاران، طی گذشت زمان به ۷ و ۱۴ روز کاهش گلبول‌های سفید، لنفوسیت و افزایش معنی‌دار نوتروفیل را گزارش نمودند و علت این کاهش را ضعف سیستم ایمنی بدن ماهی و مستعد شدن به عوامل بیماری‌زا دانستند (۲۳) که با نتایج تحقیق حاضر مغایرت داشت. در مطابقت با تحقیق حاضر، میزان مونوسیت خون هیچ تفاوت معنی‌داری نشان نداد. هم‌چنین Saeedi Far و همکاران، در مطالعه خود تأثیر سم دیازینون را بر رفتار و برخی شاخص‌های خون‌شناسی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی نمودند که نتایج نشان داد تغییرات به‌وجود آمده در شاخص‌های اریتروسیت و لوکوسیت پس از مواجهه با سم دیازینون ناشی از بروز اختلال در روند خون‌سازی و کاهش ایمنی غیراختصاصی ماهی است (۲۰). در مشابهت با نتایج این تحقیق گزارش‌های دیگری ارائه شده است (۶۲، ۱۳، ۶۳). در مجموع با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و نتایج سایر محققین می‌توان گفت آفت‌کش دیازینون اثرات زیانبار مستقیم و غیرمستقیمی بر اکوسیستم‌های آبی و شاخص‌های خون‌شناسی آبزیان می‌گذارد. دیازینون در غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر، اثر سمی خود را با افزایش نیاز تنفسی ماهی و به‌دنبال آن افزایش محتوای گلبول‌های قرمز خون، هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار حاوی سم نشان داد. و به‌مرور زمان، کاهش بیش‌تر محتوای گلبول‌های قرمز که درنتیجه تجمع گلبول‌های خونی در سلول‌های آبششی را سبب شد. به‌دنبال این تغییر، افزایش گلبول‌های سفید خون مشاهده شد. با توجه به نقش‌های فیزیولوژیک متعدد ویتامین‌ها در بدن ماهیان، تیمارهای B6-دیازینون در عملکرد شاخص‌های ایمنی (محتوای گلبول‌های سفید خون، لنفوسیت، مونوسیت و نوتروفیل) حتی بهتر از تیمار شاهد نقش نشان دادند. حجم MCH، MCV و MCHC در تیمار حاوی B6-دیازینون مقدار نزدیک‌تری با تیمار شاهد نشان داد. زمان اثر قوی‌تری بر بهبود شاخص‌های خون‌شناسی را در روز دهم نشان داد که در واقع بیان‌کننده ارتباط منفی بین شاخص‌های خون‌شناسی و اثرات سمی دیازینون است. درنتیجه ویتامین B6 به‌خصوص در سطح ۱۰ میلی‌گرم B6-دیازینون توانست از تأثیرات منفی دیازینون بر ماهی جلوگیری کند و بهبود شاخص‌های خون‌شناسی به‌ویژه گلبول‌های قرمز، لوکوسیت و لنفوسیت تیمارهای مواجه شده با سم را با افزایش زمان طی روز دهم نشان دهد. پیشنهاد می‌شود کنترل روند استفاده از سموم ارگانوفسفره و یا حداقل جایگزینی مناسب‌تر به‌جای این سم در مزارع به‌کار رود تا عواقب بقایای آن در ذخایر آبی به کم‌ترین حد برسد.

منابع

1. **Koprucu, S.O., Koprucu, K., Mevlut, S., Ural, E., Ispir, U. and Pala, M., 2006.** Acute toxicity of organo phosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). Pesticide Biochemistry and Physiology. 86(3): 99-105
2. **Sarabia, L., Maurer, I. and Bustos-Obrego'n E., 2009.** Melatonin prevents damage elicited by the organo phosphorous pesticide diazinon on the mouse testis. Ecotoxicology and Environmental Safety. 72(2): 663-668.
3. **Peter, H. and Edward, R., 1984.** Free radicals and disease in man. Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR. 16(3): 175-195.
4. **Shisheiyan, B. and Saiedi, F., 1999.** Medical hematology. Student Publications. 210 p.

5. **Jafari Kenari, S. and Adhami, B., 2017.** Short-term effect of Aloe vera (*Aloe vera*) on blood factors and tissue damage induced by diazinon in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Animal Environmental. 8(4): 195-202. (In Persian)

6. **Crane, M. and Maltby, L., 1991.** The lethal and sublethal responses of *Gammarus pulex* to stress: sensitivity and sources of variation in an in situ bioassay. Environmental Toxicology and Chemistry. 10(10): 1331-1339.

7. **Dutta, H.M. and Arends, D.A., 2004.** Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. Environmental Research. 91(3): 157-162.

8. **Civen, M., Brown, C.B. and Morin, R.J., 1977.** Effects of organophosphate insecticides on adrenal cholesteryl ester and steroid metabolism. Biochemical Pharmacology. 26(20): 1901-1907.

9. **Shadnia, S., Azizi, E., Hosseini, R., Khoei, S., Fouladdel, S., Pajoumand, A., Jalali, N. and Abdollahi, M., 2005.** Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. Human and experimental toxicology. 24(9): 439-445.

10. **Fekri, N., Jamili, Sh., Ehteshami, F., Valipoor, A. and Zamini, A., 2013.** Effects of diazinon on Hematological factors of Caspian White fish (*Rutilus frisii kutum*). Journal of Animal Environmental. 4(4): 155-162. (In Persian)

11. **Chumnantana, R., Yokochi, N. and Yagi, T., 2005.** Vitamin B_6 compounds prevent the death of yeast cells due to menadoine, a reactive oxygen generator. Journal of Cellular Physiology. 1722(1): 84-91.

12. **Hundekari, I.A., Suryakar, A.N. and Rathi, B.D., 2008.** Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous pesticides poisoning cases of North Karnataka. Environmental Health Research. 11(1): 39-44.

13. **Mekkawy, I.A.A., Mahmoud, U. M., Wassif, E. and Naguib, M., 2011.** Effects of cadmium on some hematological and biochemical characteristics of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) dietary supplemented with tomato paste and vitamin E. Fish Physiology and Biochemistry. 37(1): 71-84.

14. **Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. and Metailler, R., 2001.** Nutrition and feeding of fish and crustaceans. Springer Science and Business Media.

15. **Larsson, A., Haux, C. and Sjobeck, M.L., 1985.** Fish physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. Ecotoxicology and Environmental Safety. 9(3): 250-281.

16. **Kavitha, C., Malarvizhi, A., Senthil Kumaran, S. and Ramesh, M., 2010.** Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, biochemical and liver transaminases activity in an Indian major carp, *Catla catla*. Food and Chemical Toxicology. 48(10): 2848-2854.

17. **Remyla, S.R., Ramesh, M. and Sajwan, K.S., 2008.** Senthil Kumar K. Influence of zinc on cadmium induced haematological and biochemical responses in a freshwater teleost fish *Catla catla*. Fish Physiology and Biochemistry. 34(2): 169-174.

18. **Verma, S.R., Rani, S. and Dalela, R.C., 1982.** Indicators of stress induced by pesticides in *Mystus vittatus*: hematological parameters. Indian Journal of Environmental Health. 24(2): 58-64.

19. **Li, Z.H., Li, P. and Randak, T., 2010.** Ecotoxicological effects of short-term exposure to a human armaceutical Verapamil in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology. 152(3): 385-391.

20. **Saeedi Far, M., Vahabzadeh Roodsari, H., Zamini, A., Mirrasooli, E. and Kazemi, R., 2012.** The Effects of Diazinon on Behavior and Some Hematological Parameters of Fry Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fish Marine Science. 4(4): 369-375.

21. **Banaee, M., Mirvaghefi, A.R., Mojazi Amiri, B., Rafiee, G.R. and Nematdost, B., 2011.** Hematological and Histopathological effects of Diazinon Poisoning in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Res. 64(1): 1-13. (In Persian)

22. **Sheikh, M., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., Mollaei, M. and Khodanazary, A., 2011.** Effects of Diazinon concentrations on LC50, hematocrit and clinical signs of Roach Torkemani (*Rutilus rutilus caspius*) fries of Caspian Sea. Iranian Scientific Fisheries Journal. 20(3): 55-62. (In Persian)

23. **Jaddi, Y., Safahieh, A., Movahedinia, A.A., Dajandian, S., Hallajian, A. and Hashemi, R.S., 2015.** Study of sublethal toxicity of pesticide diazinon on certain hematological parameters of Caspian Sea common bream fingerlings (*Abramis brama*). Journal of Veterinary Research. 71(1): 17-25. (In Persian)

24. **Mohammadnejad Shamoshaki, M., Soltani, M., Sharifpour, A. and Imanpour, M., 2011.** The study of Diazinon effects on haematological factors of *Rutilus kutum* male brood stocks. Journal of Large Animal Clinical Science Research. 5(3): 23-32. (In Persian)

25. **Ibrahim, A.T.A. and Banaee, M., 2014.** Ameliorative Effect of Lycopene and Vitamin E on Some Hematological and Biochemical Parameters of *Oreochromis Niloticus* against Diazinon Toxicity. MedCrave Advance in Plants and Agriculture Research. 1(3): 1-9.

26. **Ouraji, H. and Rahimi, M., 2014.** Effect of vitamin E on growth performance, survival rate and hematological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries Science and Technology. 2(4): 1-10. (In Persian)

27. **Mirvaghefi, A., Ali, M. and Asadi Jamnani, F., 2015.** Investigating the effect of adding vitamin E, Selenium and C to the diet on the index parameters on the antioxidant defense system in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum,1792). Journal of Applied Ichthyological Research. 2(4): 33-48. (In Persian)

28. **Venees, F., Yassa Shenouda, M. and Girgis Iman, M.K., 2011.** Abumourad Potential protective effects of vitamin E on diazinon-induced DNA damage and some haematological and biochemical alterations in rats. Journal of Mediterranean Ecology. 11(1): 31-39.

29. **Gholipour, F., Allameh Fani, S., Mohammadi Arani, M. and Nasr Esfhani, M., 2006.** Investigating the effect of density on the growth and feed conversion ratio of rainbow trout. Pajouhesh and Sazandegi. 19(1): 23-27. (In Persian)

30. **Treves-Brown, K.M., 2000.** Applied fish pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 309 p.

31. **Nourian, M., Shajiei, H. and Mohammadnejadshmoshki, M., 2015.** The Effectof Diazinon on Blood Factors of RainbowTrout (*Oncorhynchus mykiss*). 7(2): 99-106. (In Persian)

32. **Mehrabi, Y., 1998.** Effects of anesthesia clove powder on rainbow trout. Tehran Quarterly aquaculture. 21(3): 160-162.

33. **Ruane, N.M., Huisman, E.A. and Komen, J., 2001.** Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. Fish Biology. 59(1): 1-12.

amelioration by dietary supplement of vitamin C. Pesticide biochemistry and physiology. 101(1): 16-20.

51. **Nilsson, S. and Grove, D.J., 1984.** Adrenergic and cholinergic innervation of the spleen of the cod (*Gadus morhua*). European Journal of Pharmacology. 28(1): 135-137.

52. **Bansal, S.K. and Dalela, R.C., 1997.** Physiology haemopoietic system in a fresh water. Toxicology. 22(3): 18-20.

53. **Varadarajan, R., Sankar, H.S., Jose, J. and Philip, B., 2014.** Sublethal effects of phenolic compounds on biochemical, histological and ionoregulatory parameters in a tropical teleost fish *Oreochromis mossambicus* (Peters). International Journal of Environmental Research and Public Health. 4(3): 2250-3153.

54. **Luskova, V., Svoboda, M. and Kolarova, J., 2003.** The effect of Diazinon on blood plasma biochemistry in Carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Veterinaria Brno. 71(1): 117-123.

55. **Dorucu, M. and Girgin, A., 2002.** The effect of cypermethrin on some hematological parameters of *Cyprinus carpio*. Aquaculture International. 9(2): 183-187.

56. **Montz, E.J.R., 1983.** Effects of organophosphate insecticides on aspects of reproduction and survival in small mammal. Ph.D. thesis. Virginia Polytechnic State University, Blacsuburg. USA.179 p.

57. **Barnhoorn, I.E.J., 1996.** Effects of manganese on the hematology of *Oreochromis mossambicus* and the bioaccumulation of metals in *Labeo umbratus*. (Doctoral dissertation, University of Johannesburg). 68 p.

58. **Finny, D., 1971.** Probit analysis. Cambridge University Chemical Laboratory. 465-489.

59. **Kalender, Y., Uzunhisarcikli, M., Ogutcu, A., Acikgoz, F. and Kalender, S., 2006.** Effects of diazinon on pseudocholinesterase activity and hematological indices in rats: the protective role of vitamin E, Environmental Toxicology and Pharmacology. 22(1): 46-51.

60. **Holland, M.M., Steven, M. and Gallin, J.I., 1997.** Disorders of Granulocytes and Monocytes. In: Fauci, A.S., (eds.), Harrison's Principles of Internal Medicine. New York, McGraw-Hill. 2800 p.

61. **Svoboda, M., Luskova, V., Drastichova, J. and Zlabek, V., 2001.** The effect of diazinon on hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Veterinaria Brno. 70(4): 457-465.

62. **Mekkawy, I.A.A., Mahmoud, U.M. and Mohammed, R.H., 2013.** Protective effects of tomato paste and Vitamin E on Atrazine-induced hematological and biochemical characteristics of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology. 2(1): 11-21.

63. **Ural, M.S., 2013.** Chlorpyrifos-induced changes in oxidant/antioxidant status and hematological parameters of *Cyprinus carpio*: ameliorative effect of lycopene. Chemosphere. 90(7): 2059-2064.

34. **Haghighi, M., 2009.** Laboratory Methods of Fish Hematology. Iranian Fisheries Research Organization. Tehran, Iran. 29-71.

35. **Simons, A., 1997.** Hematology, Butterworth-Heinemann. 259-269.

36. **Stoskopf, M.K., 1993.** Clinial pathology. Saunders Company. Fish Medical. 113-131.

37. **Joshi, P.K., Bose, M. and Harish, D., 2002.** Changes in hematological parameters in a siluroid catfish *Clarias batrachus* (Linn) exposed to mercuric choloride, Pollution Research. 21(2): 129-132.

38. **Rogers, J.T., Richards, J.G. and Wood, C.M., 2003.** Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechani for lead in the rainbow trout. Aquatic Toxicology. 64(2): 215-234.

39. **Oh, H.S., Lee, S.K., Kim, Y.H. and Roh, J.K., 1991.** Mechanism of selective toxicity of diazinon to killifish (*Oryzias latipes*) and loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Aquatic Toxicology and Risk Assessment. 14(2): 343-353.

40. **Naghsh, N., Noori, A., Aqababa, H. and Amirkhani-Dehkordi, S., 2012.** Effect of nanosilver particles on alanin amino transferase (ALT) activity and white blood cells (WBC) level in male Wistar rats, *in vivo* condition, Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 14(7): 34-37.

41. **Adeyemo, O.K., 2007.** Haematological profile of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) exposed to lead. Turkish Journal Fish Aquatic Science. 7(2): 163-169.

42. **Ciftci, N., Cicik, B., Erdem, C. and Ay, O., 2008.** Effects of lead concentration on sera parameters and hematocrit levels in *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758). Journal of Fisheries Sciences. 2(4): 616-622.

43. **Banaee, M., Mirvaghefei, A.R., Rafei, G.R. and Majazi Amiri, B., 2008.** Effect of sub-lethal diazinon concentration on blood plasma biochemistry. International Journal of Environmental Research. 2(2): 189-198.

44. **Narain, A.S. and Srivastava, P.N., 1989.** Anemia in the freshwater teleost, *Heteropneustes fossilis*, under the stress of environmental pollution. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 43(4): 627-634.

45. **Viran, R., Erkoç, F.Ü., Polat, H. and Koçak, O., 2003.** Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). Ecotoxicology and environmental safety. 55(1): 82-85.

46. **Saberi, M., Zarichi Baghlani, K., Bahrami, F. and Zarei Mahmoudabadi, A., 2008.** The effect of oxidative stress caused by diazinon on glutathione level in U373MG neuroglial cells and its interaction with pyridoxine. Kausar Medical Journal. 14(1): 25-29. (In Persian)

47. **Bilski, P., Li, M.Y., Ehrenshaft, M., Daub, M.E. and Chignell, C.F., 2000.** Vitamin B_6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. Photochemistry and Photobiology. 71(2): 129-134.

48. **Kannan, K. and Jain, S.K., 2004.** Effect of vitamin B_6 on oxygen radicals, mitochondrial membrane potential, and lipid peroxidation in H_2O_2-treated U937 monocytes. Free Radical Biology and Medicine. Vol. 36, No. 4, pp: 423-428.

49. **Casillas, E. and Smith, L.S., 1977.** Effect of stress on blood coagulation and hematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). 10(5): 481-491.

50. **Vani, T., Saharan, N., Mukherjee, S.C., Ranjan, R., Kumar, R. and Brahmchari, R.K., 2011.** Deltamethrin induced alterations of hematological and biochemical parameters in fingerlings of *Catla catla* (Ham.) and their