



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره دوم، شماره چهارم، زمستان ۹۳

<http://jair.gonbad.ac.ir>

بررسی تأثیر افزودن ویتامین E سلیوم و C به جیره بر پارامترهای شاخص در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

علیرضا میرواقفی^۱، محسن علی^{۲*}، فرزاد اسدی جمنانی^۳

^۱دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۲ دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

^۳ استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۹۳/۱۲/۱۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۱۶

چکیده

ویتامین‌ها و عناصر مغذی از جمله عوامل آنتی‌اکسیدانی هستند که در پیشگیری از بروز استرس‌های اکسیداتیو و مهار رادیکال‌های آزاد نقش مهمی ایفا می‌کنند. مطالعه حاضر به منظور بررسی سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکساید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) و شاخص پراکسیداسیون لیپید (MDA) در سرم خون قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مکمل‌های ویتامین E سلیوم و ویتامین C صورت گرفت. تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی 18 ± 121 گرم و میانگین طولی $1/65 \pm 22/92$ سانتی‌متر در چهار گروه ۱۵ عددی در سه تکرار، شامل: شاهد؛ V_{C300} (۳۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از جیره)؛ V_{C1000} (۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از جیره)؛ و V_{C1000} (۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از جیره)؛ V_{ESe} (سلیوم ۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از جیره) در مخازن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری تقسیم شدند و میزان جیره دریافتی معادل ۲ درصد وزن بدنی آنها در نظر گرفته شد. سپس نمونه‌برداری و سنجش آنزیم‌ها در روزهای ۱۴ و ۲۸ پس از شروع آزمایش انجام شد. فعالیت SOD و CAT در سرم خون پس از ۱۴ روز در گروه‌های V_{C1000} و V_{ESe} نسبت به شاهد کاهش و پس از ۲۸ روز افزایش معنی‌دار نشان داد ($P < 0/05$). سطح TAC تیمارهای V_{C1000} و V_{ESe} در هر دو زمان نمونه‌برداری افزایش معنی‌دار داشت. همچنین شاخص MDA در تیمار V_{ESe} به‌طور معنی‌دار کاهش داشت، ولی تیمار V_{C1000} تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. از طرفی بین تیمارهای V_{C300} و شاهد در پارامترهای TAC و MDA تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. سنجش‌های صورت گرفته نشان داد افزودن V_{ESe} و C به جیره به عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی می‌تواند هم‌سو با عوامل آنتی‌اکسیدانی آنزیمی عمل کرده و موجب

*نویسنده مسئول: mohsenali@ut.ac.ir

تعدیل سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی؛ افزایش سطح آنتی‌اکسیدان کل و همچنین کاهش فرآیند مخرب پراکسیداسیون لیپید شود. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد ماهی‌های تیمار شده با V_{ESe} از توان آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به ماهی‌های تیمار شده با ویتامین C برخوردار هستند. امروزه با توجه به احتمال حضور طیف وسیعی از آلاینده‌ها به‌عنوان عوامل اکسیداتیو در منابع آبی مورد استفاده در امر پرورش، دانستن نحوه استفاده از مکمل‌های مذکور به جیره با در نظر گرفتن زمان و میزان مناسب به‌کارگیری، جهت افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی و پیشگیری از آسیب‌های استرس اکسیداتیو مفید و ضروری به‌نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ویتامین، سلنیوم، رادیکال آزاد، جیره

مقدمه

رادیکال‌های آزاد به واسطه چندین مکانیسم در بدن موجود زنده ایجاد می‌شوند، این عوامل با گرفتن الکترون یا با از دست دادن اتم هیدروژن از ترکیبات شیمیایی تشکیل می‌شوند (Halliwell and Gutteridge, 1999). رادیکال‌های آزاد در بدن موجودات زنده تحت عنوان گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species) شناخته می‌شوند که دارای دو منشأ داخلی و خارجی هستند. منشأ داخلی همان متابولیسم‌های طبیعی بدن از جمله زنجیره تنفسی میتوکندری، فعالیت آنزیمی سائتوکروم P_{450} در سلول و منشأ خارجی انواع عوامل استرس‌زای محیطی از جمله تغییرات دمایی، اکسیژنی و حضور آلاینده‌های مختلف از جمله آفت‌کش‌ها و فلزات سنگین و ترکیبات مختلف زئوبیوتیک و غیره را شامل می‌شود (Payne et al., 1987; Cortopassi et al., 1992; Livingstone, 2001). افزایش مقادیر ROS می‌تواند موجب آسیب‌های جدی از جمله تغییر در اندازه، شکل ترکیبات و اجزاء مختلف سلولی، همچنین جهش‌های DNA سلول شود (Devasagayam et al., 2004; Reardon and Bhat, 2007).

ماهیان همانند تمامی موجودات زنده هوای برای حذف گونه‌های اکسیژن فعال، دارای مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی پیشرفته می‌باشند (Rudneva, 1997). آنتی‌اکسیدان‌ها ساختارهای آنزیمی و غیر آنزیمی هستند که به طرق مختلف سبب کاهش استرس‌های اکسیداتیو شده و به نوعی نقش پاکسازی رادیکال‌های آزاد را در سلول ایفاء می‌کنند (El-Gendy et al., 1990; Halliwell and Gutteridge, 1990). آنزیم سوپراکساید دیسموتاز (SOD) به‌عنوان دفاع اصلی، وظیفه تبدیل یون سوپراکساید آنیون به اکسیژن مولکولی و هیدروژن پراکساید را بر عهده دارد (McCord and Fridovich, 1969). همچنین آنزیم CAT موجب تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شود (Aebi, 1984). سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی SOD و CAT به‌عنوان اولین خط دفاعی در برابر مسمومیت‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند ما را از خطرات در حال وقوع داخل یک اکوسیستم آبی از جمله حضور انواع سموم کشاورزی و فلزات سنگین و غیره آگاه نمایند (Pandey et al., 2003). علاوه بر مکانیسم دفاع

آنزیمی مذکور، عوامل آنتی اکسیدانی غیرآنزیمی مهمی از جمله ویتامین ها و انواع مواد مغذی مثل آلفاتوکوفرول (ویتامین E)، اسید آسکوربیک (ویتامین C)، رتینول (ویتامین A)، کاروتنوئیدها و غیره وجود دارند (Niki *et al.*, 1995). این عوامل آنتی اکسیدانی در پی فرآیندهای اکسیداتیو، با جلوگیری از تشکیل، غیر فعال کردن و به دام انداختن رادیکال های آزاد نقش اساسی در حفاظت از اجزای مختلف سلول ایفا می کنند (Mruka *et al.*, 2002).

ویتامین E یک ویتامین محلول در چربی و یک آنتی اکسیدان اصلی محسوب می شود. فرم آلفاتوکوفرول اصلی ترین شکل آن و دارای بیشترین پایداری است که در جیره غذایی جانوران کاربرد فراوانی دارد (Dandapat *et al.*, 2000; Adams, 2001; Lu and Liu, 2002). از مهمترین نقش های این ویتامین جلوگیری از فرآیند پراکسیداسیون لیپید است که با استقرار در غشاء سلولی، این ساختار مهم را در برابر رادیکال های آزاد حفاظت می کند (Di Giulio and Meyer, 2008). علاوه بر ویتامین ها، سلنیوم از جمله عناصری است که جزو آنتی اکسیدان های غیرمستقیم محسوب می شود چرا که نقش یک کوفاکتور را برای آنتی اکسیدان گلوکاتیون پراکسیداز (GPX) ایفا می کند (Bell *et al.*, 1986). از طرفی ویتامین E و سلنیوم به عنوان یک ترکیب مغذی اثر هم افزایی در مسمومیت زدایی حاصل از هیدرو پرواکسیدها داشته و عمل محافظت از غشاهای بیولوژیک در برابر اکسیداسیون لیپیدها را نیز بر عهده دارند (Bell *et al.*, 1985; Combs and Combs, 1986).

ویتامین C یا اسید آسکوربیک یک ویتامین محلول در آب است که توسط اکثر حیوانات از مولکول گلوکز ساخته می شود (Moreau *et al.*, 1999). در ماهی ها (به جز چند مورد استثنا در میان آنها) به دلیل عدم وجود آنزیم آل- گلوکونولاکتون اکسیداز، سنتز این ویتامین صورت نمی گیرد که نیازمند تأمین این ویتامین از طریق منابع خارجی می باشد (Verlhac and Gabaudan, 1997). همچنین ویتامین C یک آنتی اکسیدان بسیار مهم در مایعات خارج و داخل سلولی بوده و توانایی خنثی سازی رادیکال هیدروکسیل، یون سوپر اکساید آنیون، رادیکال پروکسیل اسیدهای چرب را داراست (Doba *et al.*, 1985). به طور کلی تمامی عوامل آنتی اکسیدانی چه فاکتورهای آنتی اکسیدانی آنزیمی و چه ترکیبات مغذی آنتی اکسیدانی همگی تحت عنوان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (TAC) نامیده می شوند (Mahfouz *et al.*, 2009).

یکی از فرآیندهای مخرب در استرس های اکسیداتیو، واکنش های زنجیره ای اکسیداسیون لیپیدها است که موجب آسیب به دیواره فسفو لیپیدی غشاء سلول می شوند (Pereira *et al.*, 1995). به طور کلی اکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در سیستم های بیولوژیک به عنوان پراکسیداسیون لیپیدها خوانده می شود و از جمله محصولات آن تولید مالون دی آلدیید (MDA) است که می تواند به عنوان شاخصی در تعیین آسیب های ناشی از استرس اکسیداتیو به ما کمک کند (Doba *et al.*, 1985).

به دلیل آلودگی‌های محتمل موجود در آب‌ها و اکوسیستم‌های طبیعی و مورد استفاده برای پرورش ماهی و افزایش پتانسیل استرس‌های اکسیداتیو در آبزیان، به کارگیری عوامل آنتی‌اکسیدانی مغذی امری ضروری به نظر می‌رسد. در پژوهش حاضر، اثر مکمل‌های ویتامین C و E سلنیوم بر روی برخی از پارامترهای شاخص سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در متن اشاره شد رادیکال‌های آزاد با منشاء داخلی ضمن فرآیند متابولیسم طبیعی نیز در پیکره آبزیان ایجاد می‌شوند و هدف این مطالعه پاسخ به این پرسش بود که آیا مکمل‌های مذکور می‌توانند تأثیری در افزایش توان آنتی‌اکسیدانی بدن آبزی قبل از مواجهه با هرگونه عوامل استرس‌زا (انواع آلاینده‌های آبی از جمله سموم کشاورزی - فلزات سنگین و غیره) داشته و نقش پیشگیری کننده ایفا کنند؟ به نوعی آیا می‌توان یک سطح بالایی از دفاع آنتی‌اکسیدانی را در سلول قبل از مواجهه احتمالی با خطر ایجاد کرد؟

مواد و روش‌ها

ماهی‌های مورد مطالعه، شرایط نگهداری و تیمار: مراحل اجرایی این پژوهش در کارگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشگاه تهران صورت گرفت. تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان $W_{average} = 121 \pm 18 \text{ gr}$, $TL_{average} = 22.92 \pm 1.65 \text{ cm}$ از ماهی‌سرای کرج خریداری شد. سازگاری ابتدایی ماهی‌ها بعد از انتقال به مخازن فایبرگلاس ۱۰۰۰ لیتری به مدت یک هفته در ترکیبی از آب مزرعه و کارگاه همراه با هوادهی صورت گرفت و سپس ماهی‌ها در مخازن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری در ۴ گروه ۱۵ قطعه‌ای در سه تکرار تیمار بندی شدند که شامل گروه‌های شاهد؛ V_{C300} (۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره)؛ V_{C1000} (ویتامین C به میزان ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره)؛ V_{ESe} (سلنیوم ۵ / میلی‌گرم؛ ویتامین E ۱۰۰ میلی‌گرم، در هر کیلوگرم از جیره) بودند. ماهی‌ها به مدت ۲۸ روز تحت تیمارهای مذکور قرار گرفتند و میزان جیره دریافتی معادل ۲ درصد وزن بدنی آنها در نظر گرفته شد. میانگین دما در کل دوره 12.5 ± 1.2 درجه سانتی‌گراد، میانگین pH آب معادل 7.8 ± 0.1 ، میزان اکسیژن محلول معادل 8.5 ± 0.8 میلی‌گرم در لیتر و میزان سختی آب 205 ± 16 میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم ($\text{CaCO}_3 \text{ mg/l}$) بود. در مطالعه حاضر مقدار سطح ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین C در کیلوگرم جیره برای تیمارها، با توجه به پژوهش‌های انجام شده توسط ورلهاک و همکاران (Verlhac *et al.*, 1998) تعیین شد. میزان بهینه سلنیوم مورد نیاز در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان معادل ۰/۱۵ - ۰/۳۸ میکروگرم در گرم (که معادل ۰/۴ - ۰/۱۵ میلی‌گرم در هر کیلوگرم) از جیره در شرایط طبیعی پرورش در نظر گرفته شده است (Hillton *et al.*, 1980). از طرفی میزان ویتامین E مورد نیاز بر طبق پژوهش‌هایی قبلی صورت گرفته معادل ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره قزل‌آلا بود (Watanabe *et al.*, 1981).

ویتامین C مورد استفاده در جیره به فرم پودر پوشش دار و پایدار در آب با ساختار شیمیایی آن ال-آسکوربات-۲- فسفات و نام تجاری Tiger C-35 ($C_6H_9O_9P$, $Weight_m=256.11 \text{ gr.mol}^{-1}$) ساخت شرکت چینی بود. همچنین مکمل ویتامین ویتامین E سلینیوم با نام تجاری Selenomax، ساخت شرکت داروسازی داملران رازک بود. این مکمل به صورت محلول خوراکی یک لیتری، حاوی ۵۰۰ میلی گرم سلینیوم (به فرم شیمیایی سلنیت سدیم) در لیتر و ۱۰۰۰۰۰ میلی گرم ویتامین E در لیتر است. مواد شیمیایی مورد نیاز جهت سنجش های فاکتورهای بیوشیمیایی شامل: محلول پیروگالول، محلول بافر تریس، محلول پراکسید هیدروژن، آمونیوم مولیبدات، تیوباربیتوریک اسید، بافر فسفات نمکی، بنزوات سدیم، اسید اوریک، سود (NaCl)، اسید استیک، بوتیل هیدروکسی تولوئن بود. مواد شیمیایی مذکور از شرکت های معتبر SIGMA و Merck تهیه شد. از دستگاه اسپکتروفتومتر Unico مدل UV-2100، حمام بخار یا بن ماری ساخت شرکت شیماز، سانتیفریوژ Genofuge مدل M۱۶ جهت انجام فرآیندهای مورد نیاز در آزمایش استفاده شد.

خونگیری از نمونه ها تهیه سرم و سنجش های آنزیمی: جهت انجام آنالیزهای مربوط به سنجش های آنزیمی نمونه برداری از ماهیان در روزهای ۱۴ و ۲۸ پس از شروع آزمایش خونگیری انجام شد. برای بیهوشی ماهی ها جهت خونگیری، از محلول پودر گل میخک با غلظت ۱۰۰ ppm استفاده شد. خونگیری توسط سرنگ ۲ سی سی (فاقد ماده ضد انعقاد هپارین) از ناحیه کمان خونی ساقه دمی انجام شد و به اپندورف های ۲ سی سی منتقل شد و جهت جداسازی سرم از سانتیفریوژ Genofuge مدل M۱۶ با تنظیم (۴۵۰۰ دور در ۱۵ دقیقه) استفاده شد. سپس نمونه ها بلافاصله به فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شد. تعداد ۱۵ عدد ماهی به طور تصادفی از هر تیمار برای خونگیری انتخاب شد.

سنجش آنزیم سوپراکساید دیسموتاز سرم خون نمونه ها با استفاده از روش Marklund صورت گرفت (Marklund, 1974). در این روش کاهش جذب نوری در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر میزان این کاهش را ارزیابی می کند. بر اساس سنجش انجام شده یک واحد فعالیت آنزیمی SOD برابر است با مقدار آنزیمی که موجب مهار ۵۰ درصدی اتواکسیداسیون پیروگالول شود.

جهت سنجش آنزیم CAT سرم از روش Goth استفاده شد (Goth, 1991). براساس این روش هر چقدر میزان فعالیت این آنزیم در سرم بیشتر باشد جذب نوری نمونه های تیمار نسبت به گروه کنترل در طول موج ۴۱۰ نانومتر کاهش می یابد. در این روش هر واحد فعالیت آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند یک میلی مول آب اکسیژنه را طی مدت زمان یک ثانیه متلاشی کند. افزایش هیدروژن پراکساید در سرم موجب افزایش سطح این آنزیم در سرم خون می شود و هرچه مقادیر هیدروژن پراکساید در سرم کمتر باشد میزان فعالیت این آنزیم کاهش می یابد.

سنجش سطح آنتی‌اکسیدان تام (TAC) با روش (FRAP: Ferric-reducing ability of plasma assay) صورت گرفت (Koracevic *et al.*, 2001). در این روش با توجه به مجموع آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه سرم خون مورد آزمایش تولید TBA مهار می‌شود، به‌طوری‌که کاهش جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر به دنبال کاهش تولید رنگ صورت می‌گیرد. افزایش TAC نشان دهنده توان مجموع آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه سرم مورد آزمایش است که تولید رادیکال‌های آزاد را مهار کرده و کاهش می‌دهد.

جهت سنجش شاخص (MDA) یا سطح پراکسیداسیون لیپید با استفاده از شاخص مالون دی‌آلدهاید از روش Ledwozyw استفاده شد (Ledwozyw *et al.*, 1986). سنجش مذکور بر اساس میزان مهار تیوباربیتوریک اسید توسط MDA موجود در سرم صورت می‌گیرد. به‌طوری‌که هرچقدر سطح MDA افزایش یابد میزان مهار بیشتر شده در نتیجه رنگ کمتری در محلول تولید می‌شود در نتیجه جذب نوری نیز کاهش می‌یابد. در این روش نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شدند. افزایش MDA نشان دهنده وقوع فرآیند زنجیره‌ای پراکسیداسیون و آسیب سلولی است. لازم به ذکر است که جهت سنجش‌های آنزیمی مذکور از دستگاه اسپکتروفتومتر Unico مدل UV-2100 استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تحلیل آماری داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون آماری توکی (Tukey) در سطح اطمینان ۹۵ درصد و سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) انجام شد. قبل از انجام آزمون آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد.

نتایج

ارزیابی سطح آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (SOD): نتایج حاصل از این مطالعه در روز ۱۴ نشان داد، سطح فعالیت آنزیم SOD در ماهی‌های تیمار شده با V_{C1000} به میزان $6/19$ واحد، تیمار V_{ESe} به میزان $7/15$ واحد بر میلی‌لیتر سرم خون کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) را نسبت به گروه شاهد نشان داد (جدول ۱). از طرفی بین گروه V_{C300} و گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده نشد. سطح فعالیت SOD پس از گذشت ۲۸ روز در ماهی‌های تیمار شده با V_{ESe} در مقایسه با تیمار شاهد به مقدار $6/88$ واحد و در ماهی‌های تغذیه شده با V_{C1000} به میزان $5/87$ واحد افزایش نشان داد ($P < 0.05$) (جدول ۱). به‌طورکلی تیمارهای V_{ESe} و V_{C1000} در هر دو مرحله نمونه‌برداری تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد داشتند. بدین صورت که در طی ۱۴ روز ابتدا موجب کاهش سطح SOD شده و بعد از ۲۸ روز به‌طور معنی‌دار موجب افزایش سطح این آنزیم شدند.

بررسی تأثیر افزودن ویتامین E سلینیوم و C به جیره بر پارامترهای شاخص در سیستم دفاع....

جدول ۱- میانگین (MEAN±SD) سطح فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز (SOD) بر حسب Units/mL سرم خون در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مکمل‌های ویتامین C و E سلینیوم پس از مدت زمان ۱۴ و ۲۸ روز.

گروه‌های تیمار	شاهد	V _C 300	V _C 1000	V _{ESe}
۱۴ روز	۷۹/۹۳±۴/۶۶ ^a	۷۷/۰۰ ±۰/۸ ^{ab}	۷۳/۷۴±۲/۸۹ ^b	۷۲/۷۸±۱/۷۲ ^b
۲۸ روز	۷۸/۵۷±۴/۱۴ ^a	۸۱/۱۷±۲/۱۹ ^{ab}	۸۴/۴۴±۱/۰۱ ^b	۸۵/۴۵±۱/۱۴ ^b

*حروف متفاوت (a,b,c,d) نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) بین گروه‌ها می‌باشد.

ارزیابی سطح آنزیم کاتالاز (CAT): آنالیز یافته‌های این پژوهش در روز ۱۴ نمونه‌برداری کاهش معنی‌دار ($P<0/05$) سطح آنزیم CAT را در تیمارهای V_C1000 به میزان ۱/۷۶ واحد و همچنین V_{ESe} به میزان ۲/۹۷ واحد بر میلی‌لیتر سرم در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (جدول ۲). همچنین افت سطح CAT در گروه دریافت کننده مکمل V_{ESe} به‌طور معنی‌دار ($P<0/05$) و به مقدار ۱/۲۱ واحد پایین‌تر از ماهی‌های تیمار شده با سطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین C بود. از طرفی بین گروه V_C300 و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین (MEAN±SD) سطح فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بر حسب Units/mL سرم خون در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان طی مدت پس از گذشت مدت زمان ۱۴ و ۲۸ روز.

گروه‌های تیمار	شاهد	V _C 300	V _C 1000	V _{ESe}
۱۴ روز	۱۶/۰۱±۰/۷۳ ^a	۱۴/۸۹±۰/۷۰ ^{ab}	۱۴/۲۵±۰/۴۶ ^b	۱۳/۰۴±۰/۶۹ ^c
۲۸ روز	۱۶/۵۲±۰/۶۹ ^a	۱۸/۹۱±۱/۳۳ ^b	۱۹/۵۸±۱/۳۳ ^{bc}	۲۱/۵۰±۱/۰۷ ^c

*حروف متفاوت (a,b,c,d) نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) بین گروه‌ها می‌باشند.

بررسی‌ها در روز ۲۸، افزایش معنی‌دار آنزیم CAT را در تیمارهای V_C300 و V_C1000 و V_{ESe} به‌ترتیب به مقدار ۲/۳۹؛ ۳/۰۶؛ ۴/۹۸ واحد در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($P<0/05$) (جدول ۲). همچنین فعالیت CAT در تیمارهای V_{ESe} و V_C1000 پس از طی مدت زمان ۱۴ و ۲۸ روز تفاوت آماری معنی‌دار با تیمار شاهد داشت. در مجموع سنجش‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که تیمارهای V_{ESe} و V_C1000 و V_C300 در طی ۱۴ روز ابتدا با کاهش سطح SOD و بعد از ۲۸ روز به‌طور معنی‌دار با افزایش سطح این آنزیم همراه بود.

ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدان تام (TAC): نتایج بدست آمده در مرحله اول نمونه‌برداری افزایش معنی‌دار ($P<0/05$) سطح TAC را در ماهی‌های تغذیه شده با V_C1000 به میزان ۱/۶۶ میلی‌مول

مکمل V_{ESe} به میزان ۱/۷۱ میلی‌مول نسبت به ماهی‌های فاقد مکمل غذایی در جیره (شاهد) نشان داد (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین ($MEAN \pm SD$) سطح آنتی اکسیدان تام (TAC) بر حسب mmol/L سرم خون در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از گذشت مدت زمان ۱۴ و ۲۸ روز

گروه‌های تیمار	شاهد	V_{C300}	V_{C1000}	V_{ESe}
۱۴ روز	1.51 ± 0.48^a	77.0 ± 0.36^a	3.17 ± 0.75^b	3.22 ± 0.52^b
۲۸ روز	1.64 ± 0.59^a	81.17 ± 0.79^a	3.27 ± 0.62^b	4.52 ± 0.39^c

*حروف متفاوت (a,b,c,d) نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین گروه‌ها می‌باشند.

همچنین در مرحله دوم نمونه‌برداری سطح TAC در تیمارهای V_{C1000} و V_{ESe} به‌ترتیب با افزایش معنی‌دار به میزان 2.88 ± 1.63 میلی‌مول در سرم خون نسبت به تیمار شاهد همراه بود ($P < 0.05$). همچنین تیمار V_{ESe} به مقدار ۱/۲۵ میلی‌مول نسبت به تیمار V_{C1000} ، در بالاترین سطح از TAC در میان گروه‌های تیمار قرار گرفت. از طرفی سطح ۳۰۰ میلی‌گرم ویتامین C در هر دو مرحله نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان نداد. به‌طور کلی ماهی‌های تیمار شده با V_{ESe} و V_{C1000} در هر دو مرحله نمونه‌برداری در طی ۱۴ و ۲۸ روز با افزایش سطح TAC همراه بود.

ارزیابی سطح شاخص مالون دی آلد‌هاید (MDA): نتایج آنالیز پراکسیداسیون لیپید توسط شاخص مالون دی آلد‌هاید که در روز ۱۴ نمونه‌برداری کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) این شاخص را در گروه‌های تغذیه شده با مکمل V_{ESe} به میزان ۰/۲۳ میکرومول نسبت به گروه شاهد نشان داد (جدول ۴). در روز ۱۴ آزمایش با وجود کاهش سطح MDA در گروه‌های V_{C300} و V_{C1000} ، در نهایت تفاوت آماری معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد حاصل نشد ($P > 0.05$). در نتایج روز ۲۸ افزایش سطح MDA را در تیمار V_{C1000} را نسبت به گروه شاهد نشان داد هرچند این میزان نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). همچنین سطح MDA بین ماهی‌های تیمار شده با V_{C300} و شاهد در طی همین مدت تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$). از سوی دیگر سطح MDA در تیمار V_{ESe} ۰/۲۱ میکرومول نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) داشت (جدول ۴).

به‌طور کلی شاخص MDA در هر دو زمان نمونه‌برداری در ماهی‌های تیمار شده با V_{ESe} کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت، در حالی که ماهی‌های تغذیه شده با ویتامین C تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان ندادند.

بررسی تأثیر افزودن ویتامین E سلینیوم و C به جیره بر پارامترهای شاخص در سیستم دفاع....

جدول ۴- میانگین (MEAN±SD) سطح مالون دی آلدیهاید (MDA) بر حسب $\mu\text{mol/L}$ سرم در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از گذشت مدت زمان ۱۴ و ۲۸ روز.

گروه‌های تیمار	شاهد	V _C 300	V _C 1000	V _{ESe}
۱۴ روز	۰/۵۶±۰/۱۳ ^a	۰/۵۲±۰/۱۲ ^a	۰/۴۷±۰/۰۴ ^{ab}	۰/۳۳±۰/۰۵ ^b
۲۸ روز	۰/۵۸±۰/۰۹ ^a	۰/۵۸±۰/۰۳ ^a	۰/۵۹±۰/۰۶ ^b	۰/۳۷±۰/۰۶ ^b

*حروف متفاوت (a,b,c,d) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) بین گروه‌ها می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های بدست آمده در پژوهش حاضر استفاده از مکمل‌های V_C1000 و V_{ESe} پس از گذشت ۱۴ روز، سطح SOD را به صورت معنی‌دار نسبت به گروه شاهد کاهش داد ($P<0/05$) (جدول ۱). کاهش SOD را می‌توان به علت عملکرد مشابه ویتامین‌های C و E سلینیوم در حذف رادیکال‌های سوپراکساید آنیون O_2^- دانست، به طوری که مقادیر کمتری از آنزیم SOD صرف فرآیند خنثی‌سازی و دفع رادیکال‌های آزاد می‌شود. از جمله عملکردهای مهم ویتامین C خنثی کردن انواع اکسیژن فعال از جمله سوپراکساید آنیون O_2^- از طریق خاصیت احیاءکنندگی آن است (Rumley and Paterson, 1998). طی مطالعات انجام شده ویتامین E نقش مهار و حذف گونه‌های اکسیژن فعال ROS از جمله سوپراکساید آنیون، اکسیژن منفرد و یون هیدروکسیل و آلکوکسیل را برعهده دارد (Di Giulio and Meyer, 2008). از طرفی عنصر سلینیوم موجود در ساختار آنزیم آنتی‌اکسیدانی گلووتاتیون پراکسیداز (GPX)، می‌تواند نقش اساسی در دفع رادیکال‌های آزاد ایفا کند به عبارتی حضور سلینیوم جهت عملکرد طبیعی و کارآمد این آنزیم ضروری است (Rotruck *et al.*, 1973). به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که مکمل‌های غذایی مذکور به طور مستقیم در فرآیند پاکسازی رادیکال‌های آزاد شرکت می‌کنند، که این امر سبب کاهش عملکرد آنزیم‌های SOD در حذف عوامل اکسیداتیو می‌شود.

یافته‌های دیگر این مطالعه کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم CAT بعد از ۱۴ روز در تیمارهای V_C1000 و V_{ESe} بود (جدول ۲). از آنجائیکه وظیفه اصلی آنزیم CAT تجزیه متابولیت سوپراکساید آنیون تولید شده به مولکول آب و اکسیژن است (Aebi, 1984). از جمله دلایل کاهش سطح CAT، تولید کمتر متابولیت هیدروژن پراکساید به دنبال افت فعالیت SOD طی همین مدت زمان است که به دنبال حذف رادیکال‌های سوپراکساید آنیون توسط ویتامین‌های C و E صورت گرفته است. تأثیر ویتامین E در جیره به عنوان آنتی‌اکسیدان در گربه‌ماهی آفریقایی ماده (*Clarias gariepinus*) روی بافت کبد مورد بررسی قرار گرفته و طی آن مقادیر آنزیم‌های CAT و SOD کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه فاقد ویتامین نشان داد (Kadry *et al.*, 2012). از طرفی ساختار آنزیمی گلووتاتیون پراکسیداز (GPX) که در ساختار خود نیازمند سلینیوم است نیز نقشی مشابه آنزیم CAT را بر عهده دارد. به نوعی همکاری GPX

و CAT در برخورد با H_2O_2 در برخی مطالعات تأیید شده است (Bouzyk *et al.*, 1997; Barja de Quiroga *et al.*, 1988).

نتایج بدست آمده، افزایش معنی‌دار سطح SOD بعد از ۲۸ روز در ماهی‌های تغذیه شده با V_{ESe} و V_{C1000} را نسب به تیمار شاهد نشان داد. از طرفی طی همین مدت زمان فعالیت آنزیم CAT نیز در تیمارهای V_{C300} و V_{C1000} و V_{ESe} به ترتیب مذکور افزایش معنی‌داری نسبت به ماهی‌های فاقد مکمل ویتامین در جیره داشت. ضمن اینکه با بالارفتن توان آنتی اکسیدانی جیره ناشی از افزایش مواد مکمل مؤثر ($V_{ESe} > V_{C1000} > V_{C300}$) میزان سطح آنزیم‌های مذکور نیز افزایش یافت (جدول ۱ و ۲). این افزایش فعالیت در آنزیم‌های مذکور به عقیده برخی از محققین می‌تواند به دلیل نقش پرواکسیدانی (Pro-oxidant) و حمایت از واکنش‌های اکسیداتیو توسط این عناصر مغذی در سلول باشد (Borg and Schaich, 1989). به عبارت دیگر آنتی اکسیدان‌های مذکور ممکن است به دلایل متعدد از جمله تجویز مگادوز آنها (دوز ۱۰۰۰ میلی گرم ویتامین C) نقش پرواکسیدانی پیدا کرده و با تولید رادیکال‌های آزاد سبب تحریک سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی و افزایش سطح آنها در سلول شوند (Otero *et al.*, 1997; Ames *et al.*, 1993).

شیرین و همکاران (Shireen *et al.*, 2008)، افزودن ویتامین E و C به صورت مکمل به جیره غذایی موش‌های تحت تیمار را پس از گذشت ۲۸ روز مورد بررسی قرار دادند که نتایج بدست آمده افزایش معنی‌دار سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانی SOD و CAT در بافت کبد نشان داد. همچنین در مطالعه دیگری خوکی‌های هندی تغذیه شده با دوزهای بالای اسید آسکوربیک فعالیت بالای آنزیم سوپراکساید دیسموتاز و CAT را نشان دادند (Suresh *et al.*, 1999). در تمامی مطالعات مذکور به نوعی خاصیت القاء کنندگی مکمل‌های E و C در افزایش سطح آنزیم‌های SOD و CAT دیده می‌شود که در این تحقیق در روزهای پایان آزمایش بروز این پدیده مشاهده شده است.

یکی دیگر از پارامترهای مورد ارزیابی تحقیق حاضر، سطح TAC بود که طی آن در هر دو مرحله از نمونه برداری (روزهای ۱۴ و ۲۸) در ماهی‌های تغذیه شده با مکمل‌های V_{ESe} ، V_{C1000} با افزایش آماری معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد همراه بودند (جدول ۳). به عقیده گائو و همکاران (Gao *et al.*, 1998)، ارزیابی آنتی اکسیدان کل TAC به دو دلیل صورت می‌گیرد: اول اینکه اندازه‌گیری هر آنزیم آنتی اکسیدان به تنهایی نسبتاً مشکل می‌باشد و دیگر اینکه آنتی اکسیدان‌های مختلف می‌توانند در عملکرد یکدیگر تداخل ایجاد کرده که اثر آنها به تنهایی کاملاً متفاوت از حضور آنها با هم در نمونه‌های بیولوژیک است. ماهی‌های تحت تیمار V_{ESe} شامل بخش غیر آنزیمی دفاع آنتی اکسیدانی از جمله ویتامین E و عنصر سلنیوم که هر دو از اجزاء مهم در دفاع آنتی اکسیدانی هستند و بخش مهمی از میزان TAC را به خود اختصاص می‌دهند. افزایش سطح TAC علاوه بر بالا رفتن مقادیر آنزیم‌های

درون سلولی، وابسته به ترکیبات آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی از جمله ویتامین C و E است (Miller *et al.*, 1993). طبق پژوهشی که توسط وینستون و همکاران (Winston *et al.*, 1998) صورت گرفت اعتقاد بر این است که ویتامین E و C و یوریک اسید و گلوکاتیون، حدود ۷۰٪ از سهم آنتی اکسیدانی کل را به خود اختصاص می دهند. اثر به کار بردن عصاره گیاه (*Allium sativum*) که حاوی ویتامین C و عنصر سلنیوم می باشد، در جیره غذایی نیز افزایش توان آنتی اکسیدانی در موش های هامستر و افزایش سطح TAC را مورد تأیید قرار داده است (Yaoling *et al.*, 1998).

به طور کلی سطح TAC در سرم به عنوان یک شاخص مهم جهت ارزیابی موازنه بین عوامل اکسیداتیو و عوامل آنتی اکسیداتیو می باشد به طوری که بالا رفتن این شاخص در یک ارگانیزم، به نوعی نشانگر افزایش مقاومت ارگانیزم در مقابل تنش های اکسیداتیو می باشد.

ارزیابی سطح پراکسیداسیون لیپید توسط شاخص MDA نشان دهنده پایین ماندن این شاخص در تیمار V_{ESe} نسبت به ماهی های شاهد در روزهای ۱۴ و ۲۸ بود (جدول ۴). از مهمترین نقش های ویتامین E جلوگیری از فرآیند پراکسیداسیون لیپید است. این ویتامین با استقرار در غشاء سلولی وظیفه حفاظت این ساختار مهم در برابر رادیکال های آزاد پراکسیل تولید شده از اکسیداسیون چربی ها را بر عهده دارد (Di Giulio and Meyer, 2008). در یک مطالعه دیگر به نقش ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان بر کاهش سطح پراکسیداسیون لیپید (MDA) با پایان دادن به واکنش های زنجیره ای پراکسیداسیون لیپید که بواسطه فعالیت رادیکال های آزاد ایجاد می شود، اشاره شده است (Lee and Dabrowski, 2003).

بررسی نتایج به دست آمده از ۲۸ روز آزمایش نشان داد سطح مالون دی آلدید در گروه دریافت کننده مکمل V_{C1000} نسبت به ماهی های شاهد و نسبت به مرحله اول آزمایش (پس از ۱۴ روز) تا حدودی بالا رفت، هر چند این افزایش معنی دار نبود. این افزایش نسبی MDA ممکن است به دلیل ویژگی پرواکسیدانی ویتامین C به دلیل مصرف بیش از حد آن و به نوعی تجویز مگادوز (۱۰۰۰ میلی گرم) و طولانی آن طی مدت زمان ۲۸ روز باشد. به نوعی می توان گفت که این مسئله روند پراکسیداسیون لیپیدهای سلول را در مقایسه با اولین مرحله نمونه برداری تا حدودی افزایش داده است. بر اساس برخی مطالعات صورت گرفته ویتامین C در شرایط خاصی از جمله تجویز دوزهای بالا نقش پراکسیدانی پیدا کند. به طوری که این مسئله روند پراکسیداسیون لیپید سلولی را تشدید کرده و در نتیجه سطح MDA در سلول افزایش یابد (Borg and Schaich, 1989; Halliwell and Whiteman, 1997).

در تحقیق انجام شده به طور کلی استفاده از مکمل های آنتی اکسیدانی V_{ESe} و V_{C1000} در جیره موجب بروز نقش پاکسازی و حذف کننده (Scavenger) اکسی رادیکال های آزاد و موجب تعدیل سطح فعالیت آنزیم های SOD و CAT در ماهیان مورد تیمار شده است. از طرفی تأثیر مکمل های مذکور در

طی دوره طولانی‌تر (روز ۲۸ آزمایش) با القاء و تحریک سیستم دفاع سلولی در ماهی همراه شد. بکارگیری مکمل V_{ESe} در جیره طی دوره آزمایش به شکل کاملاً مؤثری موجب کاهش فرآیند مخرب اکسیداسیون لیپید سلول (MDA) و از طرفی افزایش قابل توجه در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TCA) ماهی‌های تحت تیمار شد. همچنین استفاده از مکمل V_{C1000} طی دوره آزمایش توانست سطح TCA را افزایش دهد ولی تأثیر معنی‌داری بر سطح MDA نداشت. به‌طور کلی ماهی‌های تیمار شده با V_{ESe} از توان آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به ماهی‌های تیمار شده با ویتامین C برخوردار بودند. همچنین به‌نظر می‌رسد استفاده از مکمل‌های مذکور در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان با در نظر گرفتن مدت زمان و دوز بکار رفته در جیره می‌تواند جهت افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی در زمان بروز استرس‌های اکسیداتیو مفید و مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با استفاده از امکانات گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران و لابراتوار آذر تهران به انجام رسید. با تشکر از تمامی کسانی که ما را در انجام این طرح یاری کردند.

منابع

- Aebi H. 1984. Catalase invitro. *Methods Enzymology*, 105: 121-126.
- Adams H.R. 2001. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8th ed. Iowa State Univ. Press. Ames, Iowa, 692-696.
- Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17): 7915-22.
- Barja de Quiroga G., Gil P., Lopez-Torres M. 1988. Physiological significance of catalase and glutathione peroxidases, and in vivo peroxidation, in selected tissues of the toad *Discoglossus pictus* (Amphibia) during acclimation to normobaric hyperoxia. *Journal of Comparative Physiology*, 158: 583– 590.
- Bell J.G., Adron J.W., Cowey C.B. 1986. Effect of selenium deficiency on hydroperoxide stimulated release of glutathione from isolated perfused liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, 5(5): 421-428.
- Bell J.G., Cowey C.B., Adron J.W., Shanks A.M. 1985. Some effect of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, 53: 149-157

- Borg D.C., Schaich K.M. 1989. Pro-oxidant action of antioxidants. In: Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine. CRC press, Boca Raton, 1: 63-80.
- Bouzyk E., Iwanenko T., Jarocewicz N., Kruszewski M., Sochanowicz B., Szumiel I. 1997. Antioxidant defense system in differentially hydrogen peroxide sensitive L5178Y sub-lines. Free Radical Biology and Medicine, 22: 697-704.
- Combs G.F., Combs S.B. 1986. Biochemical functions of selenium. In: The role of selenium in Nutrition. Academic Press, Toronto, pp: 206-265.
- Cortopassi G.A., Shibata D., Soong N.W., Arnheim N. 1992. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89(16): 7370-7374.
- Dandapat J., Chainy G.B., Rao K.J. 2000. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defense system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comparative Biochemistry and Physiology, 127: 101-15.
- Devasagayam T.P.A., Tilak J.C., Boloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi Saroj S., Lele R.D. 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. Journal of Association of Physicians of India, 52: 794-804.
- Di Giulio R.T., Meyer J.N. 2008. Reactive oxygen species and oxidative stress. (In: Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E., eds.). The Toxicology of Fishes. CRC Press, Boca Raton, FL., pp: 273-324.
- Doba T., Burton G.W., Ingold K.U. 1985. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. Biochimica et Biophysica Acta, 9(2): 298-303.
- El-Gendy K.S., Ahmed N.S., Aly N.M., Saber N., El-Sebae A.H. 1990. Effect of some pesticides on the antioxidant enzymes and lipid peroxidation in carp tissues. Journal of Pest Science, 2: 21-27.
- Gao R., Yuan Z., Zhao Z., Gao X. 1998. Mechanism of pyrogallol antioxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 45: 41-45.
- Goth L. 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clinica Chimica Acta, 196: 143-152.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. Archives of Biochemistry and Biophysics, 280(1): 1-8.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, third edition Oxford University Press, Oxford, UK, 704 p.
- Halliwell B., Whiteman M. 1997. Antioxidant and pro-oxidant properties of vitamin C. In: Vitamin C in Health and Disease. (Packer, L. and Fuchs, J., eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp: 59-73.

- Hillton J.W., Hodson P.V., Slinger S.J. 1980. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Nutrition, 110: 2527-2535.
- Kadry S.M., Marzouk M.S., Amer A.F., Hanna M.I., Azmy A.H., Hamed H.S. 2012. Vitamin E as antioxidant in female african catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to chronic toxicity of atrazine. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 16(2): 83-98.
- Koracevic D., Koracevic G., Djordjevic V., Andrejevic S., Cosic V. 2001. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. Journal of Clinical Pathology, 54: 356-361.
- Ledwozyw A., Michalak J., Stepień A.K., Adziolka A. 1986. The relationship between plasma triglycerides, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. Clinica Chimica Acta, 155: 275-284.
- Lee K.J., Dabrowski K. 2003. Interaction between vitamins C and E affects their tissue concentrations, growth, lipid oxidation, and deficiency symptoms in yellow perch (*Perca flavescens*). British Journal of Nutrition, 89(5): 589-596.
- Livingstone D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Marine Pollution Bulletin, 42: 656-666.
- Lu C., Liu Y. 2002. Interaction of lipoic acid radical cations with vitamins C and E analogue and hydroxycinnamic acid derivatives. Archives of Biochemistry and Biophysics, 406(1): 78-84.
- Mahfouz R., Sharma R., Sharma D., Sabanegh E., Agarwal A. 2009. Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. Fertility and Sterility, 91: 805-811.
- Marklund S., Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry, 47: 469-474.
- McCord J.M., Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein. Journal of Biological Chemistry, 244: 6049-6055.
- Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Science, 84: 407-412.
- Moreau R., Dabrowski K., Czesny S., Chila F. 1999. Vitamin C- Vitamin E interaction in juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*), a fish able synthesize ascorbic acid. Journal of Applied Ichthyology, 15: 205-257.
- Mruka D.D., Silvestrini B., Moa M.Y., Chenga C.Y. 2002. Antioxidant superoxide dismutase a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. Contraception, 65: 305-311.

- Niki E., Noguchi N., Tsuchihashi H., Gotoh N. 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E and beta-carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 1322S – 1326S.
- Otero P., Viana M., Herrera E., Bonet B. 1997. Antioxidant and pro-oxidant effects of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and flavonoids on LDL submitted to different degrees of oxidation. *Free Radical Research*, 27: 619–626.
- Pandey S., Parvez S., Sayeed I., Haque R., Bin-Hafeez B., Raisuddin S. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. and Schn.). *Science of the Total Environment*, 309: 105–115.
- Payne J.F., Fancey L.L., Rahimtula A.D., Porter E.L. 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86: 233- 245.
- Pereira B., Rosa L.F., Safi D.A., Bechara E.J., Curi R. 1995. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 50: 2093–2098.
- Reardon A.M., Bhat H.K. 2007. Methylmercury neurotoxicity: Role of oxidative stress. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 89: 535-54.
- Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Swanson A.B., Hafeman D.G., Hoekstra W.G. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179: 585– 590.
- Rudneva I.I. 1997. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleost. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118: 255–260.
- Rumley A.G., Paterson J.R. 1998. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry*, 35: 181–200.
- Shireen K.F., Pace R.D., Mahboob M., Khan A.T. 2008. Effects of dietary vitamin E, C and soybean oil supplementation on antioxidant enzyme activities in liver and muscles of rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 3290–3294.
- Suresh M.V., Sreeranjit kumar C.V., Lal J.J., Indira M. 1999. Impact of massive ascorbic acid supplementation on alcohol induced oxidative stress in guinea pigs. *Toxicology Letters*, 104 (3): 221–229.
- Verlhac V., Gabaudan J. 1997. The effect of vitamin C on Fish Health. Roche Technical Buletin, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland, 30 p.
- Verlhac V., Obach A., Gabaudan J., Schüep W., Hole R. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 409-424.
- Watanabe T., Takeuchi T., Wada M. 1981. Dietary lipid levels and a-tocopherol requirement of carp. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 47: 1585–1590.
- Winston G.W., Regoli F., Dugas Jr., A.J., Fong, J.H., Blanchard, K.A. 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of

antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 24: 480–493.

Yaoling L.C.S., Jiunrong S., Men Gsyh Y.L., Mingler J.R., Chen M.S., Shien J.M. 1998. The effects of garlic powder on the hypolipidemic function and antioxidative status in hamsters. *Journal of Nutritional Science*, 23: 171-187.