



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره دوم، شماره چهارم، زمستان ۹۳

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

بررسی تأثیر افزودن ویتامین E سلنیوم 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

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

^۳استاد، 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 سلنیوم 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؛ $Vc300$ (۳۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از جیره)؛ $Vc1000$ (۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از جیره)؛ و $Vc1000$ (سلنیوم ۵/۰ و E 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 $Vc1000$ و $Vc300$ نسبت به شاهد کاهش و پس از ۲۸ روز افزایش معنی‌دار نشان داد ($P < 0/05$). سطح TAC تیمارهای $Vc1000$ و $Vc300$ در هر دو زمان نمونه‌برداری افزایش معنی‌دار داشت. همچنین شاخص MDA در تیمار $Vc300$ به‌طور معنی‌دار کاهش داشت، ولی تیمار $Vc1000$ تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. از طرفی بین تیمارهای $Vc300$ و شاهد در پارامترهای TAC و MDA تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. سنجش‌های صورت گرفته نشان داد افزودن $Vc300$ 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 منشاء داخلی و خارجی هستند. منشاء داخلی همان متابولیسم‌های طبیعی بدن از جمله زنجیره تنفسی میتوکندری، فعالیت آنزیمی سائتوکروم P_{450} در سلول و منشاء 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 هوازی 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 آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی مهمی از جمله ویتامین‌ها 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 آنتی‌اکسیدانی در پی فرآیندهای اکسیداتیو، با جلوگیری از تشکیل، غیر فعال کردن و به دام انداختن رادیکال‌های آزاد نقش اساسی در حفاظت از اجزای مختلف سلول ایفا می‌کنند (Mruka *et al.*, 2002).

ویتامین E یک ویتامین محلول در چربی و یک آنتی‌اکسیدان اصلی محسوب می‌شود. فرم آلفاتوکوفرول اصلی‌ترین 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 نقش‌های این ویتامین جلوگیری از فرآیند پراکسیداسیون لیپید است که با استقرار در غشاء سلولی، این ساختار مهم را در برابر رادیکال‌های آزاد حفاظت می‌کند (Di Giulio and Meyer, 2008). علاوه بر ویتامین‌ها، سلنیوم از جمله عناصری است که جزو آنتی‌اکسیدان‌های غیرمستقیم محسوب می‌شود چرا که نقش یک کوفاکتور را برای آنتی‌اکسیدان گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) ایفا می‌کند (Bell *et al.*, 1986). از طرفی ویتامین E و سلنیوم به‌عنوان یک ترکیب مغذی اثر هم‌افزایی در مسمومیت‌زدایی 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 می‌شود (Moreau *et al.*, 1999). در ماهی‌ها (به جز چند مورد استثنا در میان آنها) به دلیل عدم وجود آنزیم آل-گلونولاکتون اکسیداز، سنتز این ویتامین صورت نمی‌گیرد که نیازمند تأمین این ویتامین از طریق منابع خارجی می‌باشند (Verlhac and Gabaudan, 1997). همچنین ویتامین C یک آنتی‌اکسیدان بسیار مهم در مایعات خارج و داخل سلولی بوده و توانایی خنثی‌سازی رادیکال هیدروکسیل، یون سوپر اکساید آنیون، رادیکال پروکسیل اسیدهای چرب را داراست (Doba *et al.*, 1985). به‌طور کلی تمامی عوامل آنتی‌اکسیدانی چه فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و چه ترکیبات مغذی آنتی‌اکسیدانی همگی تحت عنوان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) نامیده می‌شوند (Mahfouz *et al.*, 2009).

یکی از فرآیندهای مخرب در استرس‌های اکسیداتیو، واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون لیپیدها است که موجب آسیب به دیواره فسفو لیپیدی غشاء سلول می‌شوند (Pereira *et al.*, 1995). به‌طور کلی اکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در سیستم‌های بیولوژیک به‌عنوان پراکسیداسیون لیپیدها خوانده می‌شود و از جمله محصولات آن تولید مالون دی‌آلدهاید (MDA) است که می‌تواند به‌عنوان شاخصی در تعیین آسیب‌های 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 $12/5 \pm 1$ درجه سانتی‌گراد، میانگین pH آب معادل $7/8 \pm 0/1$ ، میزان اکسیژن محلول معادل $8 \pm 0/5$ 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 $0/15 - 0/38$ میکروگرم در گرم (که معادل $0/4 - 0/15$ 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 قزل‌آلای بود (Watanabe *et al.*, 1981).

ویتامین C مورد استفاده در جیره به فرم پودر پوشش‌دار 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 سلنیوم با نام تجاری Selenomax، ساخت شرکت داروسازی داملران رازک بود. این مکمل به صورت محلول خوراکی یک لیتری، حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم سلنیوم (به فرم شیمیایی سلنیت سدیم) در لیتر و ۱۰۰۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین E در لیتر است. مواد شیمیایی مورد نیاز جهت سنجش‌های 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 شرکت‌های معتبر Merck و SIGMA تهیه شد. از دستگاه اسپکتروفتومتر Unico مدل UV-2100، حمام بخار یا بن‌ماری ساخت شرکت شیماز، سانتی‌فیوژ Genofuge مدل M۱۶ جهت انجام فرآیندهای مورد نیاز در آزمایش استفاده شد.

خونگیری از نمونه‌ها تهیه سرم و سنجش‌های آنزیمی: جهت انجام آنالیزهای مربوط به سنجش‌های آنزیمی نمونه‌برداری از ماهیان در روزهای ۱۴ و ۲۸ پس از شروع آزمایش خونگیری انجام شد. برای بیهوشی ماهی‌ها 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 اپندورف‌های ۲ سی سی منتقل شد و جهت جداسازی سرم از سانتی‌فیوژ Genofuge مدل M۱۶ با تنظیم (۴۵۰۰ دور در ۱۵ دقیقه) استفاده شد. سپس نمونه‌ها بلافاصله به فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. تعداد ۱۵ عدد ماهی به‌طور تصادفی از هر تیمار برای خونگیری انتخاب شد.

سنجش آنزیم سوپراکساید دیسموتاز سرم خون نمونه‌ها 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 می‌کند. 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 نمونه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل در طول موج ۴۱۰ نانومتر کاهش می‌یابد. در این روش هر واحد فعالیت آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که بتواند یک میلی‌مول آب اکسیژنه را طی مدت زمان یک ثانیه متلاشی کند. افزایش هیدروژن پراکساید در سرم موجب افزایش سطح این آنزیم در سرم خون می‌شود و هرچه مقادیر هیدروژن پراکساید در سرم کمتر باشد میزان فعالیت این آنزیم کاهش می‌یابد.

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، به طوری که 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. به طوری که 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). به‌طور کلی 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 سلنیوم 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 سلنیوم 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<۰/۰۵) بین گروه‌ها می‌باشد.

ارزیابی سطح آنزیم کاتالاز (CAT): آنالیز یافته‌های این پژوهش در روز ۱۴ نمونه‌برداری کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) 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 آفت سطح CAT در گروه دریافت کننده مکمل V_{ESe} به‌طور معنی‌دار (P<۰/۰۵) 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<۰/۰۵) بین گروه‌ها می‌باشد.

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<۰/۰۵) (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 آنتی‌اکسیدان تام (TAC): نتایج بدست آمده در مرحله اول نمونه‌برداری افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) سطح TAC را در ماهی‌های تغذیه شده با V_C1000 به میزان ۱/۶۶ میلی‌مول

مکمل V_{ESc} 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 آنتی‌اکسیدان تام (TAC) بر حسب mmol/L سرم خون در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از گذشت مدت زمان ۱۴ و ۲۸ روز

V_{ESc}	V_C1000	V_C300	شاهد	گروه‌های تیمار
$3/22 \pm 0/52^b$	$3/17 \pm 0/75^b$	$77/0 \pm 0/36^a$	$1/51 \pm 0/48^a$	۱۴ روز
$4/52 \pm 0/39^c$	$3/27 \pm 0/62^b$	$81/17 \pm 0/79^a$	$1/64 \pm 0/59^a$	۲۸ روز

*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_{ESc} و V_C1000 به ترتیب 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_{ESc} به مقدار $1/25$ میلی‌مول نسبت به تیمار V_C1000 ، در بالاترین سطح از TAC در میان گروه‌های تیمار قرار گرفت. از طرفی سطح 300 میلی‌گرم ویتامین C در هر دو مرحله نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان نداد. به‌طور کلی ماهی‌های تیمار شده با V_{ESc} و V_C1000 در هر دو مرحله نمونه‌برداری در طی ۱۴ و ۲۸ روز با افزایش سطح TAC همراه بود.

ارزیابی سطح شاخص مالون دی‌آلدهاید (MDA): نتایج آنالیز پراکسیداسیون لیپید توسط شاخص مالون دی‌آلدهاید که در روز ۱۴ نمونه‌برداری کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) این شاخص را در گروه‌های تغذیه شده با مکمل V_{ESc} به میزان $0/23$ 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 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_{ESc} $0/21$ 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_{ESc} 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 سلنیوم و C به جیره بر پارامترهای شاخص در سیستم دفاع....

جدول ۴- میانگین (MEAN±SD) سطح مالون دی آلدهاید (MDA) بر حسب $\mu\text{mol/L}$ سرم در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین کمان 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 سلنیوم در حذف رادیکال‌های سوپراکساید آنیون O₂⁻ 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 O₂⁻ 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 سلنیوم موجود در ساختار آنزیم آنتی‌اکسیدانی گلوکاتایون پراکسیداز (GPX)، می‌تواند نقش اساسی در دفع رادیکال‌های آزاد ایفا کند به عبارتی حضور سلنیوم 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 آفت 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 گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) که در ساختار خود نیازمند سلنیوم است نیز نقشی مشابه آنزیم CAT را برعهده 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 نسبت 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 بالا رفتن توان آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدان‌های مذکور ممکن است به دلایل متعدد از جمله تجویز مگادوز آنها (دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین C) نقش پرواکسیدانی پیدا کرده و با تولید رادیکال‌های آزاد سبب تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی 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 القاء‌کنندگی 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 نمونه‌برداری (روزهای ۱۴ و ۲۸) در ماهی‌های تغذیه شده با مکمل‌های V_C1000 ، V_{ESe} با افزایش آماری معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد همراه بودند (جدول ۳). به عقیده گائو و همکاران (Gao *et al.*, 1998)، ارزیابی آنتی‌اکسیدان کل TAC به دو دلیل صورت می‌گیرد: اول اینکه اندازه‌گیری هر آنزیم آنتی‌اکسیدان به تنهایی نسبتاً مشکل می‌باشد و دیگر اینکه آنتی‌اکسیدان‌های 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 آنتی‌اکسیدانی از جمله ویتامین E و عنصر سلنیوم که هر دو از اجزاء مهم در دفاع آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی 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 گلوکاتینون، حدود ۷۰٪ از سهم آنتی‌اکسیدانی کل را به خود اختصاص می‌دهند. اثر به کار بردن عصاره گیاه (*Allium sativum*) که حاوی ویتامین C و عنصر سلنیوم می‌باشد، در جیره غذایی نیز افزایش توان آنتی‌اکسیدانی در موش‌های هامستر و افزایش سطح TAC را مورد تأیید قرار داده است (Yaoling *et al.*, 1998).

به‌طور کلی سطح TAC در سرم به‌عنوان یک شاخص مهم جهت ارزیابی موازنه بین عوامل اکسیداتیو و عوامل آنتی‌اکسیداتیو می‌باشد به‌طوری‌که بالا رفتن این شاخص در یک ارگانسیم، به نوعی نشانگر افزایش مقاومت ارگانسیم در مقابل تنش‌های اکسیداتیو می‌باشد.

ارزیابی سطح پراکسیداسیون لیپید توسط شاخص MDA نشان‌دهنده پایین ماندن این شاخص در تیمار V_{ESe} نسبت به ماهی‌های شاهد در روزهای ۱۴ و ۲۸ بود (جدول ۴). از مهمترین نقش‌های ویتامین E جلوگیری از فرآیند پراکسیداسیون لیپید است. این ویتامین با استقرار در غشاء سلولی وظیفه حفاظت این ساختار مهم در برابر رادیکال‌های آزاد پراکسیل تولید شده از اکسیداسیون چربی‌ها را بر عهده دارد (Di Giulio and Meyer, 2008). در یک مطالعه دیگر به نقش ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان بر کاهش سطح پراکسیداسیون لیپید (MDA) با پایان‌دادن به واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون لیپید که بواسطه فعالیت رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود، اشاره شده است (Lee and Dabrowski, 2003).

بررسی نتایج به‌دست آمده از ۲۸ روز آزمایش نشان داد سطح مالون دی‌آلدهید در گروه دریافت‌کننده مکمل V_{C1000} نسبت به ماهی‌های شاهد و نسبت به مرحله اول آزمایش (پس از ۱۴ روز) تاحدودی بالا رفت، هر چند این افزایش معنی‌دار نبود. این افزایش نسبی MDA ممکن است به‌دلیل ویژگی پرواکسیدانی ویتامین C به‌دلیل مصرف بیش از حد آن و به نوعی تجویز مگادوز (۱۰۰۰ میلی‌گرم) و طولانی آن طی مدت زمان ۲۸ روز باشد. به نوعی می‌توان گفت که این مسئله روند پراکسیداسیون لیپیدهای سلول را در مقایسه با اولین مرحله نمونه‌برداری 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. به‌طوری‌که 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 به‌طور کلی استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی V_{ESe} و V_{C1000} در جیره موجب بروز نقش پاکسازی و حذف‌کننده (Scavenger) اکسی رادیکال‌های آزاد و موجب تعدیل سطح فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در ماهیان مورد تیمار شده است. از طرفی تأثیر مکمل‌های 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., Bloor 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., Stepien A.K., Adziolka A. 1986. The relationship between plasma triglycerides, total lipids and lipid peroxidation products during huma 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 superoxyde anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxyde dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47: 469-474.
- McCord J.M., Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *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 synthesise 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.