



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره ششم، شماره اول، بهار ۹۷

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

ارزیابی نشانگرهای زیستی استرس‌های اکسیداتیو در ماهی کلمه *Rutilus caspicus*

(Yakovlev, 1870) در معرض قرار گرفته با غلظت‌های تحت حاد دیازینون

خیراله خسروی کتولی^{۱*}، حامدپاک‌نژاد^۲، باقر مجازی امیری^۲، حامد آزادی^۱

^۱دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۲استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۳استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۹۵/۳/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۹

چکیده

در این مطالعه ابتدا غلظت کشنده ۹۶ ساعته سم دیازینون برای بچه ماهیان کلمه (*R. caspicus*) تعیین شد. برای بررسی اثرات تحت حاد دیازینون بر نشانگرهای زیستی، ماهیان به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت‌های تحت حاد قرار گرفتند و سپس به منظور بررسی سطوح این نشانگرها پس از یک دوره بازیابی، ماهیان به مدت ۱۰ روز در آب فاقد دیازینون قرار گرفتند. پس از ۱۴ روز در معرض قرارگیری، میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی به استثناء لاکتات دهیدروژناز، در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی داری افزایش پیدا کرد. افزایش فعالیت در گلوکوتائون S ترانسفراز و کاتالاز وابسته به غلظت دیازینون بود به طوری که در بالاترین غلظت، بیشترین فعالین این آنزیم مشاهده شد. همچنین پس از دوره ۱۰ روزه بازیابی، فعالیت آنزیم‌های کبدی در تیمارهای در معرض قرار گرفته به سطوح اولیه خود بازگشت، به طوری که در تمامی آنزیم‌ها به استثناء سوپر اکسید دیسموتاز، اختلاف معنی داری بین گروه‌های در معرض قرار گرفته و شاهد وجود نداشت. با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان گفت، دیازینون باعث فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیداتیو در ماهی کلمه شد و پس از یک دوره بازیابی، شرایط سیستم اکسیداسیونی تا حد زیادی به حالت اولیه خود بازگشت. لذا پیشنهاد می‌شود که نشانگرهای زیستی اکسیداتیو، شاخص مناسبی برای نشان دادن وضعیت سلامت آبزیان در معرض قرار گرفته با آفت‌کش‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *R. caspicus*، استرس اکسیداتیو، دیازینون

*نویسنده مسئول: khosravi.kh@ut.ac.ir

مقدمه

فعالیت عمده مردم در نواحی شمالی ایران کشاورزی می‌باشد و از جمله مهم‌ترین محصولات این مناطق می‌توان به برنج و مرکبات اشاره کرد (Taghvaii and Bay, 2012). باتوجه به صنعتی شدن و بهینه‌سازی کشاورزی و در نتیجه افزایش تولید محصول در مزارع، استفاده از آفت‌کش‌ها در این مناطق افزایش یافته است (Nouri et al., 2000). دیازینون سمی از گروه سموم ارگانوفسفره است و به‌منظور کنترل آفات در مزارع برنج و باغات مرکبات به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود (Honarpajouh, 2003; Shayeghi et al., 2006). این سم (غالباً) از طریق زهکش و حتی به‌صورت مستقیم می‌تواند وارد آب‌های جاری شود (Rosseland et al., 2001) و سرانجام روی موجودات غیر هدف از جمله ماهیان و آبزیان دیگری که از نظر اقتصادی برای انسان دارای اهمیت می‌باشند، نیز تأثیر منفی بگذارد. باتوجه به استفاده زیاد این سم در مزارع کشاورزی استان گلستان، این سم توانسته است خود را به رودهای بزرگ این استان برساند به‌طوری‌که سطوح بالای سم دیازینون در رودخانه قره‌سو نیز گزارش شده است (۲۲/۴ ppm در فصل تابستان) (Shayeghi et al., 2006).

آفت‌کش‌های ارگانوفسفره از طریق محدودسازی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و به‌واسطه عمل فسفریلاسیون ناشی از تجمع استیل کولین، سمیت خود را اعمال می‌کنند (Fulton and Key, 2001). دیازینون ممکن است از طریق تولید رادیکال آزاد اکسیژن (ROS) باعث القاء واکنش اکسیداتیو شود (Kehrer, 1993) اطلاعات مربوط به القاء استرس اکسیداتیو تحت تأثیر ترکیبات ارگانوفسفره، به‌خصوص روی آبزیان بسیار محدود است. آنزیم‌های کلیدی برای کاهش سمیت ناشی از تولید رادیکال آزاد اکسیژن شامل کاتالاز (CAT)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، گلوکوتاتیون S ترانسفراز (GST) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) می‌باشد (Oruç and Usta, 2007). در شرایط طبیعی این آنزیم‌ها از سلول‌ها و بافت‌ها در برابر تخریب‌های اکسیداسیونی محافظت می‌کنند و در واقع بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. در صورت ایجاد شرایطی که این تعادل را به هم بزنند -مانند قرار گرفتن در معرض آلاینده‌ها- استرس اکسیداتیو به‌وجود می‌آید و متعاقب آن نیز آسیب‌های جدی سلولی ایجاد می‌شود. در بعضی از مطالعات از این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان شاخصی برای آلاینده‌ها در آبزیان استفاده کرده‌اند (Van der Oost et al., 2003; Pandey et al., 2000). در مطالعه‌ای که ژینگ و همکاران (Xing et al., 2012) انجام دادند، مشخص شد که پس از در معرض قرارگیری با آترزین و کلرپریفوس، آنزیم‌های کبیدی در تیمارهای در معرض قرار گرفته به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافتند. نتایج بافت‌شناسی این مطالعه نشان داد که بافت کبد و مغز پس از ۴۰ روز در معرض قرارگیری با آترزین و کلرپریفوس تخریب‌های گسترده‌ای نشان دادند. همچنین در مطالعه دیگری که بررسی اثرات آفت‌کش‌های ارگانوکلره بر عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی ماهیان پرداخته بود

ارزیابی نشانگرهای زیستی استرس‌های اکسیداتیو در ماهی کلمه...

مشخص شد که پس از در معرض قرارگیری کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با غلظت‌های تحت حاد DDT trichloroethane diphenyl dichloro (DDT) مشخص شد که سطوح آنزیم‌های SOD و همچنین CAT در ماهیان در معرض قرار گرفته به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. همچنین بیان ژن‌های GPX و CYP1A نیز کاهش پیدا کرد (Karaca et al., 2014).

ماهی کلمه (*R. caspicus*) یکی از گونه‌های بومی دریای خزر می‌باشد که بیشترین جمعیت آن در جنوب شرقی دریای خزر (استان گلستان) و به‌خصوص در رودخانه قره‌سو زیست می‌کند (Coad, 1980). به دلیل اینکه ماهی کلمه در اوایل زنجیره غذایی قرار داشته و طعمه خوبی برای ماهیان با ارزشی مانند خاویاری، سوف و اردک‌ماهی است، ارزش اکولوژیکی بسیاری دارد و همچنین این ماهی برای مردم ساحل‌نشین و صیادان نیز ارزش اقتصادی دارد. در سال‌های اخیر به‌دلایل مختلف (صید زیاد، آلودگی مناطق تخم‌ریزی، کاهش مهاجرت تولید مثلی) میزان ذخایر ماهی کلمه به‌شدت کاهش یافته است (Soleimani et al., 2012). به همین خاطر سازمان شیلات ایران جهت تأمین و حفظ ذخایر آن‌ها در دریای خزر، با تولید چندین میلیون قطعه بچه‌ماهی انگشت‌قد در سال و رهاسازی آن به رودخانه‌های منتهی به دریا اقدام به بازسازی ذخایر این‌گونه کرده است.

همان‌طور که در بالا اشاره شد، با توجه به گزارش حضور دیازینون در رودخانه قره‌سو، و همچنین رهاسازی بچه ماهیان کلمه در مصب این رودخانه، احتمال قرارگرفتن آن‌ها در معرض سم دیازینون وجود دارد. بنابراین هدف از انجام این مطالعه بررسی وضعیت نشانگرهای زیستی در دو مرحله قرارگیری با غلظت تحت حاد دیازینون به‌مدت ۱۴ روز و دوره بازیابی ۱۰ روزه، در ماهی کلمه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گونه ماهی مورد مطالعه و طرح کلی تحقیق: ۲۴۰ قطعه ماهی کلمه با میانگین وزنی 10 ± 0.12 گرم و طول کل 13 ± 0.83 سانتی‌متر از کارگاه تکثیر ماهیان استخوانی سیجوال (استان گلستان، ایران) تهیه شد. برای سازگاری ماهیان با شرایط آزمایشگاهی، قبل از شروع آزمایش ماهیان به‌مدت دو هفته در مخازن ۱۰۰۰ لیتری با رژیم نورانی ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب مخازن به‌طور دائم هوادهی و شرایط کیفی آب در طول دوره آزمایش در شرایط زیر نگهداری شد: دما: ۲۳ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن: ۷ میلی‌گرم در لیتر، اسیدیته: ۷/۸.

تعیین غلظت کشنده: سم دیازینون با خلوص ۹۹٪ درصد از شرکت پرتونور (تهران، ایران) خریداری شد. کشندگی حاد سم دیازینون بر اساس استاندارد^۱ OECD انجام شد. غلظت‌های اسمی که در این

1. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)

مطالعه از آن‌ها استفاده شد شامل صفر (شاهد)، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر بود. از ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش و همچنین هنگام در معرض قرارگیری ماهیان در این مطالعه غذادهی ماهیان قطع گردید. سه تکرار برای هر غلظت در نظر گرفته شد و ۱۰ ماهی به هر مخزن فایبرگلاس محتوی ۱۰۰ لیتر آب به صورت تصادفی اضافه گردید. تلفات ماهیان در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ثبت گردید و سپس خارج گردیدند. غلظت کشنده ۵۰ درصد^۱ با استفاده از آنالیز Probit محاسبه شد.

۱۰ و ۲۰ درصد غلظت کشنده، به عنوان غلظت تحت کشنده دیازینون برای ماهی کلمه در نظر گرفته شد (Banaee *et al.*, 2011)، و ماهیان به مدت ۱۴ روز در معرض قرار گرفتند پس از این دوره، ماهیان باقی مانده برای بررسی اثرات دوره بازیابی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، به مدت ۱۰ روز در آب فاقد دیازینون نگهداری شدند. در این آزمایش نیز برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و در هر تکرار نیز ۱۰ قطعه ماهی معرفی گردید. به استثناء اضافه شدن دیازینون، سایر شرایط مشابه با آزمایش در معرض قرارگیری ماهیان با غلظت‌های تحت حاد بود. در زمان در معرض قرارگیری ماهیان در مواجهه با غلظت‌های تحت حاد و همچنین در زمان نگهداری در دوره بازیابی، ۲۰ درصد از آب مخازن روزانه تعویض شدند و غلظت سم تعویضی محاسبه و دوباره به مخازن اضافه شد.

نمونه برداری: نمونه برداری در انتهای دوره تحت حاد (۱۴ روز پس از در معرض قرارگیری) و دوره بازیابی (۱۰ روز پس از شروع دوره بازیابی) انجام گرفت. برای این منظور، ماهیان با استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره گل میخک بی‌هوش و سپس کشته شدند (Anderson *et al.*, 1997). سپس بافت کبد ماهیان برای بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان خارج شده و تا زمان انجام آزمایشات مربوطه در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش فعالیت آنزیم‌های شاخص استرس اکسیداتیو: نمونه‌های بافت کبد توزین و سپس به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین (PBS) همگن شدند و نمونه‌ها در دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی جمع‌آوری و جهت سنجش شاخص‌های اکسیداتیو استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز: فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با استفاده از روش وینتربورن و همکاران (Winterbourn *et al.*, 1975) سنجیده شد. حجم مناسبی از بافت همگن شده EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی مولار و NBT^۲ ۱/۵ میلی مولار در یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار با pH ۷/۸ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه

1. Lethal Concentration (LC50)

2. Nitroblue Tetrazolium

درجه حرارت اتاق قرار گرفتند. جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون S ترانسفراز: فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون S ترانسفراز با روش هابیگ و همکاران (Habig *et al.*, 1981) سنجیده شد. ۱ میلی لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۴ شامل EDTA یک میلی مولار، گلوکوتاتیون ۲۰ میلی مولار و ^۱CDNB ۲۰ میلی مولار است. واکنش با اضافه کردن حجم معینی از عصاره بافتی شروع و تغییرات جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر بر میلی گرم پروتئین بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز: فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز توسط کیت پارس آزمون صورت گرفت. اساس این اندازه گیری بر پایه احیای پیوات به لاکتات می باشد که در حضور NADH₂ انجام گرفت. جذب نمونه ها در طی ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت و فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین بیان شد (Buffet *et al.*, 2011).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش آبی با دنبال نمودن تجزیه پراکسید هیدروژن (H₂O₂) در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد (Aebi, 1984). به حجم معینی از عصاره بافتی اتانول مطلق (۰/۰۱ میلی لیتر در میلی لیتر) اضافه و به مدت نیم ساعت در یخ انکوبه شد. سپس به آن تریتون ۱۰۰-X ۱۰ درصد با غلظت نهایی یک درصد اضافه گردید. این محلول جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. واکنش با اضافه کردن آب اکسیژنه ۳۰ میلی مولار به حجم مناسبی از عصاره نمونه بافتی در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH ۷ شروع و سپس جذب در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت خواهد شد. فعالیت ویژه بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: قبل از انجام تجزیه و تحلیل، برای ایجاد حالت همگنی در نمونه از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف^۲ استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز آماری ANOVA یک طرفه انجام گرفت و جهت بررسی اختلافات معنی دار از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

همان طور که از نتایج تعیین غلظت کشنده مشخص است (جدول ۱)، غلظت حاد دیازینون باگذشت زمان کاهش پیدا کرد به طوری که از ۲۵/۶ در ساعت ۲۴، به ۱۰/۷۸ میلی گرم در لیتر در

1. Chloro-2,4-dinitrobenzene
2. Kolmogorov-Smirnov

ساعت ۹۶ رسید. غلظت حاد ۵۰ درصد، در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب برابر با ۲۵/۶، ۱۶/۱۲، ۱۲/۰۲ و ۱۰/۷۸ میلی‌گرم در لیتر بود.

جدول ۱- غلظت کشنده ۵۰ درصد دیازینون در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در بررسی ارزیابی نشانگرهای زیستی استرس‌های اکسیداتیو در ماهی کلمه (*R. caspius*)

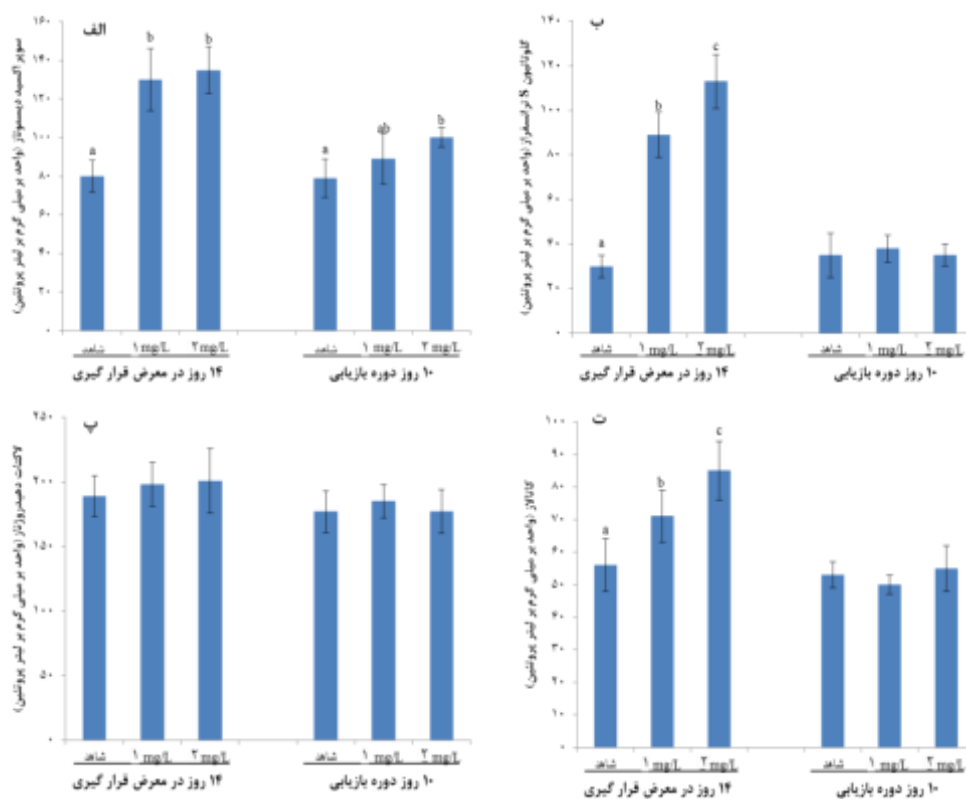
زمان در معرض گذاری (ساعت)	غلظت کشنده (میلی‌گرم در لیتر)
۲۴	۲۵/۶
۴۸	۱۶/۱۲
۷۲	۱۲/۰۲
۹۶	۱۰/۷۸

غلظت‌های تحت حاد سم دیازینون بر اساس تقریباً ۱۰ و ۲۰ درصد غلظت حاد دیازینون در نظر گرفته شد و در طول ۱۴ روز آزمایش هیچ تلفاتی مشاهده نشد. فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز پس از در معرض قرارگیری با غلظت‌های تحت حاد دیازینون افزایش پیدا کردند ($p < 0.05$) اما بین دو غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر دیازینون اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). همچنین نتایج نشان داد که پس از ۱۰ روز بازیابی ماهیان، سطوح این آنزیم کاهش یافت اما در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر همچنان در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان می‌داد ($p < 0.05$) (شکل ۱، الف). فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون S ترانسفراز نیز پس از ۱۴ روز در معرض قرارگیری، در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$) و نتایج نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر بیشتر بود. همچنین این مطالعه نشان داد که پس از دوره بازیابی میزان فعالیت این آنزیم به حالت اولیه خود بازگشته به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت ($p > 0.05$) (شکل ۱، ب).

فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز پس از در معرض قرارگیری با غلظت‌های مختلف دیازینون اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد پیدا نکرد ($p > 0.05$) و این روند در دوره بازیابی نیز همچنان ادامه پیدا کرد (شکل ۱، پ).

سطوح آنزیم کاتالاز در گروه‌های در معرض قرارگرفته افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت ($p > 0.05$) و بیشترین سطح این آنزیم نیز در تیمار ۲ میلی‌گرم در مشاهده شد که نشان‌دهنده تغییرات وابسته به غلظت دیازینون در این آنزیم بود. میزان فعالیت این آنزیم در گروه‌هایی که در قسمت اول آزمایش در معرض قرارگرفته بودند، در دوره بازیابی کاهش پیدا کرد به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشت (شکل ۱، ت).

ارزیابی نشانگرهای زیستی استرس‌های اکسیداتیو در ماهی کلمه...



شکل ۱ (الف-ت) - تأثیر غلظت‌های تحت حاد سم دیازینون و یک دوره بازیابی بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کبیدی ماهی کلمه (*R. caspicus*) پس از دوره‌ای به مدت به ترتیب ۱۴ و ۱۰ روز. حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($p < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

حضور غلظت‌های بالای آفت‌کش‌ها در منابع آبی مختلف گزارش شده و تعداد زیادی از مطالعات نشان دادند که این مواد حتی در غلظت‌های بسیار پایین نیز برای آبزیان به‌خصوص ماهیان سمی‌باشند (Nouri *et al.*, 2000; Shayeghi *et al.*, 2006; Min and Kang, 2008). آلاینده‌هایی مانند ترکیبات ارگانوفسفره باعث از بین رفتن بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک ماهیان می‌شوند (John, 2007). در مطالعات مختلف مشخص شده است که دیازینون می‌تواند سلامت آبزیان را به‌خطر بیاندازد (Shayeghi *et al.*, 2006; Isik and Celik, 2008). در مطالعات مختلف مشخص شده است که وضعیت

سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌تواند شاخص مناسبی برای تشخیص میزان سمیت ترکیبات شیمیایی مختلف باشد (Van der Oost *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2000).

سمیت دیازینون بر ماهی کلمه با افزایش زمان و غلظت افزایش پیدا کرد. وقتی ماهیان در معرض ۵ میلی‌گرم در لیتر دیازینون قرار گرفتند، تقریباً ۳۹ درصد تلفات ثبت شد در حالی‌که پس از ۲۴ ساعت از در معرض قرارگیری ماهیان با ۳۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون، ۱۰۰ درصد تلفات ثبت شد. میزان غلظت کشنده دیازینون در گونه‌های مختلف ماهیان محاسبه شده است، به‌طور مثال ۰/۴۶ میلی‌گرم در لیتر برای (bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*), ۷/۸۰ میلی‌گرم در لیتر برای (fathead minnow (*Pimephales promelas*), ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر برای قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ۱/۴ میلی‌گرم در لیتر برای کپور معمولی (*Cyprinodon variegates*) (Sharma, 1990). علت اصلی اختلاف غلظت حاد به‌دست‌آمده در این مطالعه با سایر مطالعات، احتمالاً به خاطر تغییرات گونه‌ای، نحوه در معرض قرارگیری، سن و فاکتورهای فیزیولوژیکی محیط آبی مورد آزمایش می‌باشد (Gonga *et al.*, 2004).

به‌طور کلی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول‌ها تعادل وجود دارد. پس از آنکه آلاینده‌ها وارد بدن شدند، از طریق تبدیل ترکیبات، رادیکال آزاد اکسیژن به وجود می‌آید و اگر این روند برای مدت طولانی ادامه داشته باشد می‌تواند منجر به به‌هم خوردن این تعادل و به دنبال آن تخریب فعالیت فیزیولوژیک موجودات شوند (Nel *et al.*, 2006). با توجه به ظرفیت بالای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در واکنش به آلاینده‌ها، به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان شاخص‌های زیست‌شیمیایی، مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Ballesteros *et al.*, 2009). سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مختلفی می‌باشد که وزن مولکولی پایینی دارند. این آنزیم‌ها نقش بسیاری در حذف یا کاهش تأثیرات سمی ترکیبات شیمیایی در سطح سلولی دارند (Van der Oost *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2000).

در این مطالعه برای بررسی میزان سمیت دیازینون برای ماهیان کلمه، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اصلی شامل سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکاتایون S ترانسفراز، لاکتات دهیدروژناز و کاتالاز پس از ۱۴ روز در معرض قرارگیری با غلظت‌های تحت حاد دیازینون مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. همچنین برای نشان دادن تأثیر بازبانی بر سیستم آنتی‌اکسیدانی، پس از دوره در معرض قرارگیری، ماهیان به‌مدت ۱۰ روز در آب فاقد دیازینون قرار گرفتند.

مطالعات زیادی اثبات کردند که سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به‌طور چشمگیری تحت تأثیر استرس‌های مختلف القاء شوند (Altuntas *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2011). در این مطالعه در بسیاری از موارد پس از در معرض قرارگیری با دیازینون، سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش پیدا

کرد. سوپر اکسید دیسموتاز اولین آنزیمی است که با اکسی رادیکال‌ها مقابله می‌کند و باعث کالایز دیسموتیشن رادیکال‌های سوپر اکسیداز O_2^- به O_2 و H_2O_2 می‌شود. در این مطالعه تغییرات سوپر اکسید دیسموتاز نشان داد که پس از ۱۴ روز در معرض قرارگیری با دیازینون افزایش چشمگیری در مقایسه با گروه شاهد داشت. علت این افزایش احتمالاً به خاطر استفاده و تبدیل رادیکال‌های آزاد و در نتیجه حذف آن‌ها است. افزایش میزان این آنزیم در کبد، آبشش و مغز ماهی کپور که در معرض نانو ذرات تیتانیوم قرار گرفته بودند نیز گزارش شد (Hao and Chen, 2012). مشابه با نتایج این مطالعه، ژیانگ و همکاران (Xiong *et al.*, 2011) نشان دادند که قرار گرفتن ماهی گورخری (*Danio rerio*) تحت ۵ میلی‌گرم در لیتر از فلز روی، باعث افزایش فعالیت این آنزیم در کبد این ماهی شد. همچنین افزایش وابسته به غلظت فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در کبد ماهی مداکا (*Oryzias latipes*) قرار گرفته شده در معرض آهن گزارش شد (Li *et al.*, 2009). در مطالعه دیگری که به تازگی توسط توپال و همکاران (Topal *et al.*, 2015) برای بررسی اثرات یک آفت‌کش ارگانوفسفره بر عملکرد رفتاری و همچنین سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام گرفت، ماهیان در معرض غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر گلی‌فسفات به مدت ۴ روز و همچنین غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر گلی‌فسفات به مدت ۲۱ روز قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در همه غلظت‌ها فعالیت آنزیم گلوکاتایون پروکسیداز (GPx) و همچنین کاتالاز افزایش یافت. این در حالی بود که فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز هیچ اختلافی با گروه شاهد نداشت. همچنین نتایج آن‌ها نشان داد که پس از ۴ و ۲۱ روز در معرض قرارگیری با غلظت‌های گلی‌فسفات، تخریب‌های زیادی در بافت‌شناسی کبد مشاهده شد و تغییرات رفتاری نیز در ارتباط با تغییرات ناشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی گزارش شد.

گلوکاتایون S ترانسفراز یکی از ترکیبات مهم سولفریل با وزن مولکولی پایین می‌باشد که به‌عنوان یک آنزیم محافظت‌کننده در برابر بسیاری از آلاینده‌ها از طریق همکاری با سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کند و باعث حلالیت و دفع طیف وسیعی از سموم و آلاینده‌ها می‌شود، بنابراین در محافظت از بافت‌ها نقش مهمی دارد (Masella *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2005). فعالیت گلوکاتایون S ترانسفراز وابسته به غلظت دیازینون می‌باشد به‌طوری‌که در بالاترین غلظت بیشترین فعالیت را نشان داد. این نتایج در راستای نتایج لی و همکاران (Li *et al.*, 2009) و ژیانگ و همکاران (Xiong *et al.*, 2011) بود که گزارش کردند فعالیت این آنزیم در مواجهه به آلاینده‌های محیطی افزایش یافت. از آنجایی که عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی در واکنش به آلاینده‌ها در آبزیان و پستانداران تقریباً مشابه است (Oruç and Usta, 2007)، در مطالعاتی که موش را در معرض آفت‌کش‌های مختلف از لیندان، دیازینون و کلروپیریفوس قرار دادند میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت (Altuntas *et al.*, 2000; Ananya *et al.*, 2005; Ncibi *et al.*, 2008). البته کاهش این آنزیم‌ها تحت

تأثیر آلاینده‌ها هم در مطالعات مختلف گزارش شد که احتمالاً به دلیل اختلاف گونه‌ای، آلاینده، بافت و همچنین نحوه در معرض قرارگیری می باشد (Khan *et al.*, 2005; Yousef *et al.*, 2006). در این مطالعه لاکتات دهیدروژناز پس از ۱۴ روز در معرض قرارگیری با غلظت‌های تحت حد دیازینون، هیچ اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده نشد. تیان و همکاران (Tian *et al.*, 2010) گزارش کردند که در صورتی که میزان سمیت تا حدی توسط بخشی از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی حذف شود، این سیستم از همه ظرفیت خود برای ادامه حذف سمیت این مواد استفاده نمی‌کند. در این مطالعه تنها در قسمت نهایی آزمایش در معرض قرارگیری، نمونه‌برداری انجام شد و نمونه‌برداری میان دوره انجام نگرفت، با توجه به گفته فوق، ممکن است در مراحل اولیه مقداری فعالیت این آنزیم افزایش پیدا کرده باشد اما در ادامه با سازگاری ماهی با شرایط به وجود آمده و همچنین عملکرد سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، میزان فعالیت این آنزیم کاهش پیدا کرده باشد (Remacle *et al.*, 1992). با این حال، هنوز ابهامات زیادی درباره مکانیسم فعالیت و همچنین مکانیسم‌های مربوط به بازخورد آنزیم‌های مختلف سیستم آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. دلیل دیگری که می‌تواند این موضوع را توضیح دهد، اختلاف در میزان ترشح این آنزیم‌ها در بافت‌های مختلف است، به طوری که در مطالعه هائو و چن (Hao and Chen, 2012) نشان داده شد که مقادیر آنزیم‌های شاخص اکسیداتیو در بافت‌های مختلف، متفاوت می‌باشد. از آنجایی که افزایش فعالیت لاکتات دهیدروژناز رابطه مستقیمی با مرگ سلولی دارد (Agrahari *et al.*, 2000)، می‌توان گفت غلظت‌های پایین و تحت حد دیازینون پس یک دوره ۱۴ روزه تأثیرات زیادی روی مرگ سلولی ندارد. برخلاف نتایج این مطالعه، افزایش فعالیت این آنزیم در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) گزارش شد (Gül *et al.*, 2004).

کاتالاز آنزیمی است که نقش مهمی در کاتالیز مولکول‌های اکسیژن H_2O_2 دارد و می‌تواند همراه با سایر آنزیم‌ها باعث تبدیل رادیکال‌های آزاد به سایر مواد غیر سمی در بدن شوند و از افزایش تخریب سلول‌ها در بافت‌های مختلف جلوگیری کند. همان‌طور که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، روند تغییرات کاتالاز همانند گلوکاتایون S ترانسفراز بوده و میزان فعالیت آن وابسته به غلظت دیازینون می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت که حساسیت این آنزیم‌ها در مواجهه با آلاینده‌های ارگانوفسفره مثل دیازینون بالاتر از سایر آنزیم‌ها می‌باشد. مشابه با نتایج این مطالعه، در مطالعه دیگری که تأثیر آلاینده‌های مختلف ارگانوفسفره را روی دفاع آنتی‌اکسیدانی بررسی کردند، گزارش کردند که پس از قرارگرفتن در معرض آلاینده‌ها میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت‌های مختلف ماهیان افزایش پیدا کرده است (Oruç and Usta, 2007; Bairy *et al.*, 1996). مخالف با نتایج این مطالعه، هائو و همکاران (Hao and Chen, 2012) گزارش نمودند. در مطالعه‌ای که در انجام شد، ماهی تیلاپیا (*Oreochromis mossambicus*) در معرض کوئینالفوس (یک آفت‌کش ارگانوفسفره) قرار گرفت (Surya *et al.*, 2015).

نتایج نشان داد که پس از ۴ روز در معرض قرارگیری با غلظت‌های حاد این این آفت‌کش، فعالیت گلوکوتاتیون رداکتاز، کاتالاز و همچنین سوپر اکسید دیسموتاز کاهش و همچنین فعالیت لیپید پروکسیدشن در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. در این مطالعه نیز مشاهده شد که در معرض قرارگیری با یک آفت‌کش ارگانوفسفره، واکنش سیستم آنتی‌اکسیدانی را در یک گونه ماهی در پی داشت. در مطالعه بلاهوا و همکاران (Blahova et al., 2013)، ماهی زبرا فیش (*Danio rerio*) در معرض غلظت‌های تحت حاد آترزین (آفت‌کش ارگانوفسفره) قرار گرفتند و وضعیت سیستم آنتی-اکسیدانی این ماهی در مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پس از ۲۸ روز در معرض قرارگیری با غلظت‌های ۰/۳، ۳۰ و ۹۰ میکروگرم بر لیتر آترزین، مقدار گلوکوتاتیون S ترانسفراز، کاتالاز، و رداکتاز در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری پیدا کردند. همچنین نتایج آن‌ها نشان داد که در معرض قرارگیری با آترزین در بلند مدت می‌تواند منجر به سازگاری بیشتر سیستم آنتی‌اکسیدانی در ماهی زبرا فیش در معرض قرارگرفته با آترزین باشد.

نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان داد که پس از یک دوره بازیابی ۱۰ روزه، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهیان در معرض قرارگرفته کاهش می‌یابد و به استثناء آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز، سایر آنزیم‌ها تقریباً به مقادیر اولیه خود بر می‌گردند که این در واقع نشان از قدرت بازیابی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در ماهیان دارد و با توجه به این نتایج می‌توان گفت که تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و حذف آن‌ها دوباره به وجود می‌آید. البته این ابهام هنوز وجود دارد که آیا در غلظت‌های بالاتر نیز این بازیابی به وجود می‌آید؟

ماهیان با ایجاد تغییرات در سیستم دفاع اکسیداسیونی خود، به در معرض قرارگیری با آلاینده‌های محیطی همچون دیازینون واکنش نشان می‌دهند و از طریق پایش این نشانگرهای زیستی می‌توان به وضعیت سلامت آن‌ها پی برد. در این مطالعه، در بعضی از آنزیم‌ها تغییرات وابسته به غلظت بود که احتمالاً ناشی از حساسیت بیشتر این آنزیم‌ها در واکنش با آلاینده‌های محیطی می‌باشد. همچنین باتوجه به این مطالعه می‌توان گفت که پس یک دوره بازیابی برای ماهیانی که در معرض غلظت‌های پایین آلاینده‌ها قرار می‌گیرند، سیستم دفاع آنتی‌اکسیداسیونی تا حد زیادی به شرایط قبل از در معرض قرارگیری با آلاینده بازخواهد گشت، اما این موضوع نمی‌تواند همیشه اتفاق افتد و بسته به غلظت، گونه و زمان در معرض قرارگیری و حتی نحوه در معرض‌گذاری با آلاینده، می‌تواند متفاوت باشد. بنابراین به مطالعات بیشتری در زمینه واکنش سیستم دفاع آنتی‌اکسیداسیونی در واکنش با آلاینده‌ها نیاز می‌باشد و باتوجه به محدود بودن اطلاعات مربوط به این موضوع در آذربایجان، این نیاز بیشتر احساس می‌شود. باتوجه به نتایج این مطالعه می‌توان گفت در معرض قرارگیری ماهیان کلمه با غلظت‌های تحت حاد دیازینون که نزدیک به غلظت‌های محیطی می‌باشد، می‌تواند باعث القاء سیستم

دفاع آنتی‌اکسیدانی در آن‌ها شود. همچنین پیشنهاد می‌گردد برای بررسی بهتر عملکرد سیستم آنتی-اکسیدانی، نمونه‌برداری بین دوره نیز انجام گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در آزمایشگاه موسسه تحقیقات شیلات ایران واقع در روستای قره‌سو بندر ترکمن در سال ۱۳۹۳ انجام شد و بدین وسیله از ریاست و سایر کارکنان محترم این آزمایشگاه کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods In Enzymology*, 105: 121-126.
- Agrahari S., Pandey K.C., Gopal K. 2000. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3): 268-272.
- Altuntas I., Kilinc, I., Orhan H., Demirel R., Koylu H., Delibas N. 2000. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes in vitro. *Human & Experimental Toxicology*, 23(1): 9-13.
- Ananya R., Subeena S., Kumar D.A., Kumar D.T., Kumar M.S. 2005. Oxidative stress and histopathological changes in the heart following orallindane (*gamma hexachlorohexane*) administration in rats. *Medical Science Monitor*, 11(9): 325-329.
- Anderson W.G., McKinley R.S., Colavecchia M. 1997. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal of Fisheries Management*, 17(2): 301-307.
- Bainy A.C., Saito E., Carvalho P.S., Junqueira V.B. 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology*, 34(2): 151-162.
- Ballesteros M.L., Wunderlin D.A., Bistoni M.A. 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(1): 199-205.
- Banaee M., Sureda A., Mirvaghefi A.R., Ahmadi K. 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(1): 1-6.
- Blahova J., Plhalová L., Hostovský M., Divišová L., Dobšíková R., Mikulíková I., Svobodová Z. 2013. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 61: 82-85.
- Buffet P.E., Tankoua O.F., Pan J.F., Berhanu D., Herrenknecht C., Poirier L., Guibbolini M. 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine

- invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 84(1): 166-174.
- Coad B.W. 1980. Environmental change and its impact on the freshwater fishes of Iran. *Biological Conservation*, 19(1): 51-80.
- Fulton M.H., Key P.B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1): 37-45.
- Gonga H.Y., Wu J.L., Huang W.T., Lin C.J.F., Weng C.F. 2004. Response to acute changes in salinity of two different muscle type creatine kinase isoforms, from euryhaline teleost (*Oreochromis mossambicus*) gills. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1675(1): 184-191.
- Gül Ş., Belge-Kurutaş E., Yıldız E., Şahan A., Doran F. 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environment International*, 30(5): 605-609.
- Habig W.H, Jakoby W.B. 1981. Glutathion Stransferases (rat and human). *Methods Enzymology*, 77: 218-31.
- Hao L., Chen L. 2012. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80: 103-110.
- Honarpojoh K. 2003. Study and Identification of OP pesticides residues (Azinphosmethyl and Diazinon) in the Mahabad and Siminerood Rivers [Thesis]. Type, M. Sc. Thesis, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran. (In Persian).
- Isik I., Celik I. 2008. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92(1): 4-38.
- John P.J. 2007. Alteration of certain blood parameters of freshwater teleost *Mystus vittatus* after chronic exposure to Metasystox and Sevin. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33(1): 15-20.
- Karaca M., Varışlı L., Korkmaz K., Özaydın O., Percin F., Orhan H. 2014. Organochlorine pesticides and antioxidant enzymes are inversely correlated with liver enzyme gene expression in *Cyprinus carpio*. *Toxicology letters*, 230(2): 198-207.
- Kehrer J.P. 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(1): 21-48.
- Khan S.M., Sobti R.C., Kataria L. 2005. Pesticide-induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. *Clinical Chemical*, 358(1): 131-138.
- Li H., Zhou Q., Wu Y., Fu J., Wang T., Jiang G. 2009. Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): antioxidant enzymatic activity, lipid

- peroxidation and histopathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3): 684-692.
- Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10): 577-586.
- Min E.Y., Kang J.C. 2008. Effect of waterborne benomyl on the hematological and antioxidant parameters of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92(3): 138-143.
- Moreno I., Pichardo S., Jos A., Gomez-Amores L., Mate A., Vazquez C.M., Camean A.M. 2005. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicology*, 45(4): 395-402.
- Ncibi S., Othman M.B., Akacha A., Krifi M.N., Zourgui L. 2008. Opuntia ficus indica extract protects against chlorpyrifos-induced damage on mice liver. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 797-802.
- Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761): 622-627.
- Nouri J., Arjomandi R., Bayat H. 2000. Ecological investigation of application of pesticides in rice fields. *Iranian Journal of Public Health*, 29(1/4): 137-146. (In Persian).
- Oruç E.Ö., Usta D. 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(1): 48-55.
- Remacle J., Lambert D., Raes M., Pigeolet E., Michiels C., Toussaint O. 1992. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. Confrontation between theoretical and experimental data. *Biochemical Journal*, 286(1): 41-46.
- Rosseland B.O., Kroglund F., Staurnes M., Hindar K., Kvellestad A. 2001. Tolerance to acid water among strains and life stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Water, Air and Soil Pollution*, 130(1-4): 899-904.
- Sharma R.M. 1990. Effect of endosulfan on acid and alkaline phosphatase activity in liver, kidney, and muscles of *Channa gachua*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(3): 443-448.
- Shayeghi M., Hosseini M., Abtahi M. 2006. The determination of dimethoate insecticide residues upon the cucumber product (Fars Province). *Journal of Environmental Science Technology*, 27: 30-35. (In Persian).
- Soleimani N., Hoseinifar S.H., Merrifield D.L., Barati M., Abadi Z.H. 2012. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish and Shellfish Immunology*, 32(2): 316-321.

- Surya P., Vidya, P.V., Chitra, K.C. 2015. Influence of quinalphos, an organophosphorous pesticide, on the antioxidant defense system in hepatic subcellular fractions of fish, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852). *International Journal of Zoological Research*, 5: 7-16.
- Taghvaii M., Bay N. 2012. The assessment of Impart Quantity of counties of Golestan province by Analytical Hierarchy Process, *Geographical Research Journal*, 3:1-20. (In persian).
- Tian W.J., Bai W., Zhao C.L., Zhang Z.Y., Cui J.A., He X., Zhao Y. 2010. Effects of ZnO nanoparticles on antioxidant enzyme system of zebrafish embryos. *Zhongguo Huanjing Kexue/China Environmental Science*, 30(5): 705-709.
- Topal A., Atamanalp M., Uçar A., Oruç E., Kocaman E.M., Sulukan E., Ceyhun S.B. 2015. Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111: 206-214.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2): 57-149.
- Winterbourn C.C., Hawkins R.E., Brian M., Carrell R.W. 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 85(2): 337-341.
- Xing H., Li S., Wang Z., Gao X., Xu S., Wang X. 2012. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Chemosphere*, 88(4): 377-383.
- Xiong D., Fang T., Yu L., Sima X., Zhu W. 2011. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment*, 409(8): 1444-1452.
- Yousef M.I., Awad T.I., Mohamed E.H. 2006. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology*, 227(3): 240-247.

