اثر درمانی تجویز عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مسمومیت تجربی با سم دیازینون

مینا ربیعی

تهران، دانشگاه پیام نور، گروه منابع طبیعی و محیط‌زیست

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۱

چکیده

امروزه، ورود سموم کشاورزی به آب سطحی یکی از بزرگترین معضلات زیست‌محیطی است که می‌توان حیات آبزیان را به خطر اندازد. تأثیر این آلاینده‌ها بر سیستم ایمنی ماهی‌ها موجب تضعیف آن و افزایش حساسیت ماهی‌ها نسبت به پاتوژن‌ها گردیده است. دیازینون، یکی از مهمترین سموم ارگانوفسفره است که در بسیاری از مناطق کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد و در آب‌های سطحی ایران نیز یافت می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر سم دیازینون بر سیستم ایمنی ماهی‌ها و استفاده از عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو، در کاهش اثر سوء این سم بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است. غذادهی با افزودن پودر مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو به نسب ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا صورت گرفت. پس از خونگیری از ماهیان در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ بعد از شروع آزمایش و جداسازی پلاسما میزان پراکسیداز، ایمنوگلوبولین و کمپلمان اندازه‌گیری شد. کاهش سطح پراکسیداز پلاسما، IgM، کمپلمان تام، لیزوزیم در ماهی‌هایی که در معرض دیازینون قرارداشته‌اند به‌خوبی نشان‌دهنده تأثیر سم دیازینون بر سیستم ایمنی ماهی‌ها در طولانی مدت است. حال آنکه در ماهی‌هایی که با مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو تغذیه‌شده و در مواجه با سم قرارگرفته‌اند، تغییر معنی‌داری ($P <$ ۰/۰۵) در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل مشاهده نگردید، که این امر نشان‌دهنده تأثیر تقویتی و حفاظتی عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو بر سیستم ایمنی ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان است.

واژه‌های کلیدی: دیازینون، عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو، قزل‌آلای رنگین‌کمان، سیستم ایمنی

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۲۲۴۵۸۳۰۸ ، پست الکترونیکی: minarabie@pnu.ac.ir

مقدمه

با توجه به توسعه بخش کشاورزی و استفاده بیش‌ازحد از سموم و آفت‌کش‌ها، نفوذ این ترکیبات از طریق زهکش مزارع و رواناب‌های سطحی و عدم توجه به مسائل زیست‌محیطی توسط مسئولین و کشاورزان، بروز اختلال در حیات آبزیان و افزایش صدمات جبران‌ناپذیر در این زمینه اجتناب‌ناپذیر است. دیازینون یکی از مهمترین سموم ارگانوفسفره کشاورزی است در طی دهه‌های اخیر در ایران توسط کشاورزان به‌دفعات در طی فصل کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد و معمولاً پس از بارش باران از طریق رواناب‌های سطحی وارد آب‌های سطحی کشور می‌شود (۳).

سیستم ایمنی جانوران آبزی، نظیر ماهی‌ها به‌طور پیوسته تحت تأثیر تغییرات دوره‌ای و ناخواسته محیطی قراردارد و هرگونه تغییر ناخواسته محیطی می‌تواند به‌صورت تنش حاد یا مزمن سلامت جانور را به مخاطره اندازد. ازاین‌رو سموم آفت‌کش، علف‌کش و سایر ترکیبات سمی موجود در پساب مزارع کشاورزی، فاضلاب‌های صنعتی و شهری می‌تواند بر روی سیستم ایمنی ماهیان اثرگذار باشد. کاهش

معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید، به‌ویژه لنفوسیت‌ها و افزایش نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها در ماهی ازون‌برون *Acipenser stellatus* (۸)، ماهی شیپ *A. nudiventris* (۷)، قزل‌آلای رنگین‌کمان *O. mykiss* (۱۰) و کپور *Cyprinus carpio* (۴)، تغییر سطح فعالیت لیزوزیم در ماهی کپور علف‌خوار (۵) و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۱۰) تحت تیمار سم دیازینون نشان‌دهنده تأثیر این سم در تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌های در معرض آلودگی دارد. درواقع رادیکال‌های آزاد تولیدشده ناشی از متابولیسم این سموم در سیستم بیولوژیک آبزیان می‌تواند بسیار خطرناک باشد. تولید رادیکال آزاد ناشی از متابولیسم دیازینون در بافت‌های مختلف به‌ویژه کبد ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون به اثبات رسیده است (۳۰).

سیستم ایمنی جانوران از حساسیت نسبتاً بالایی نسبت به تنش اکسایشی برخوردار می‌باشد. گلوتاتیون مهمترین عامل احیاکننده درون سلولی است و نسبت به تنش اکسایشی فوق‌العاده حساس می‌باشد و دارای وظایف و عملکردهای متعددی نظیر حفاظت در مقابل تنش اکسایشی، تنظیم بیان ژنی، تنظیم مرگ سلولی، فعال نمودن و تکثیر لنفوسیت‌های نوع T می‌باشد. حال آنکه، مشاهده شده پایین بودن سطح گلوتاتیون در ارتباط با بروز انواع اختلالات در عملکرد لنفوسیت‌ها می‌باشد (۱۴، ۱۸ و ۲۹).

لذا، تقویت سیستم ایمنی ماهی‌ها از طریق افزودن مکمل-های غذایی می‌تواند راه‌حل مناسبی برای پیشگیری از بروز ضعف در سیستم ایمنی آنها گردد. ترکیب بسیاری از عصاره‌های گیاهی قادر به از بین بردن انواع ترکیبات فعال اکسیژن‌دار می‌باشند و به موجب آن می‌توانند به‌طور مستقیم از اثرات تنش اکسایشی بکاهند. این ترکیبات همچنین می‌توانند به‌طور غیرمستقیم و از طریق فعال نمودن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش حفاظتی خود را اعمال نمایند.

استفاده از گیاهان دارویی به‌عنوان ترکیبات ضد قارچ و ضد باکتری و همچنین به‌عنوان ترکیبات محرک سیستم ایمنی (۱ و ۲۵) در افزایش توان سیستم ایمنی ماهیان از دیرباز مرسوم بوده است. درخت انگور را "تاک" یا "مو" نیز می‌گویند. برگ مو دارای ساکاروز، لوولز، اینوزیت، کوئرستین، کاروتن، اجسام تانیک، بتائین،آنتی‌اکسیدان، تارتاریک اسید، مالیک اسید، اسکوربیک اسید، پتاسیم، آهن و سیلیکون است. ازلحاظ دارویی، برگ و سرشاخه‌های گیاه مو جز ترکیبات محافظ سلولی به‌ویژه سلول‌های کبدی محسوب می‌شوند. مطالعات متعددی بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی، از بین برندگی اکسی رادیکال‌ها و توانایی شلات نمودن آهن و تأثیرات افزاینده محتوی گلوتاتیون درون سلولی صورت گرفته است که گویای این مطلب است که این ترکیبات موجب تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول می‌گردند (۱۱، ۱۹ و ۳۱). نتیجه دیگر تحقیقات نیز نشان‌دهنده خاصیت و عملکرد عصاره‌های گیاهی در تقویت سیستم ایمنی است (۱۳ و ۲۱). بااین‌حال، مکانیزم برگ و سرشاخه‌های گیاه مو به‌عنوان یک محرک سیستم ایمنی به‌خوبی تشریح نشده است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncrohynchus mykiss*) در مواجه با سم دیازینون است.

مواد و روشها

۱۲۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان کاملاً سالم ازنظر ظاهری (۱۵±۸۵/۵ گرمی) از یک مزرعه خصوصی خریداری و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش ماهی انتقال داده شدند. ماهی‌های به‌طور تصادفی در ۱۲ مخزن ۱۰۰۰ لیتری مجهز به هواده با طراحی سیستم نیمه‌مدار بسته با ۱۰٪ تعویض آب در روز توزیع و به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند تا کاملاً به شرایط آزمایشگاهی سازگار شوند. ماهی-ها در طی این مدت با جیره غذایی تجاری تغذیه گردیدند.

در یک تحقیق اولیه سه دوز ۱۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم به

ازای هرکیلوگرم غذا در نظر گرفته شد و پس از تغذیه ماهیان با این دوزهای انتخابی و سنجش فاکتورهای سیستم ایمنی نتایج نشان داد که دوز ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا بهترین تأثیر را بر فاکتورهای ایمنی ماهیان داشت. تهیه غذا بصورت تازه و بطور هفتگی و با افزودن پودر مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو به نسب ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم غذا با پودر غذای تجاری و تهیه مجدد پلت غذایی انجام گردید.

آزمایش سم‌شناسی مطابق به دستورالعمل OECD صورت گرفت. در طی مدت آزمایش شرایط فیزیکوشیمیایی آب بطور مرتب و روزانه کنترل گردید. آزمایش سمیت مزمن روی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای ۲۸ روز و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و به‌صورت چهار تیمار ماهی‌های گروه کنترل، ماهی‌های تحت تیمار دیازینون (۰/۱mg/l)، ماهی‌هایی که صرفاً با مکمل غذایی عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو تغذیه شدند و ماهی‌هایی که علاوه برقرارگرفتن در معرض سم دیازینون در طول دوره آزمایشی نیز با غذای حاوی مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو تغذیه شدند و با ۳ تکرار طراحی شد. در طی دوره آزمایش، و پس از هر تعویض آب میزان سم متناسب با آب تعویض تجدید گردید.

پس از آغاز آزمایش، بطور تصادفی از هر مخزن ۳ ماهی و درمجموع از هر تیمار ۹ ماهی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ انتخاب و پس از بیهوش کردن با عصاره پودر گل میخک (۱:۵۰۰۰) از ساقه دمی آنها با استفاده از سرنگ آغشته به EDTA خون‌گیری گردید. پلاسما پس از سانتریفیوژ نمونه‌های خون در دستگاه سانتریفیوژ باقدرت ۶۰۰۰g دور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جداسازی و تا زمان انجام آزمایش‌های نهایی در فریز ۷۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

در سنجش سطح فعالیت پراکسیداز پلاسما، ۱۵ میکرولیتر پلاسما با ۳۵ میکرولیتر بافر HBSS عاری از منیزیوم و کلسیم رقیق شد. سپس به آن ۵۰ میکرولیتر محلول (TMB) و ۵ میلی مول آب‌اکسیژنه افزوده شد تا محلول به رنگ آبی درآید، سپس پس از گذشته ۲ دقیقه، با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۲ مولار واکنش رنگی متوقف گردید و رنگ محلول به زرد روشن تبدیل شد. در مرحله بعد میزان جذب نوری در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر سنجیده می‌شود و پس از محاسبه با جذب نوری محلول استاندارد نتیجه برحسب واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر بیان می‌شود.

سنجش کمپلمان تام CH_{50} با استفاده از کیت تهیه‌شده از شرکت بهار افشان تهران و براساس روش ایمنودیفیوژن شعاعی اندازه‌گیری گردید.

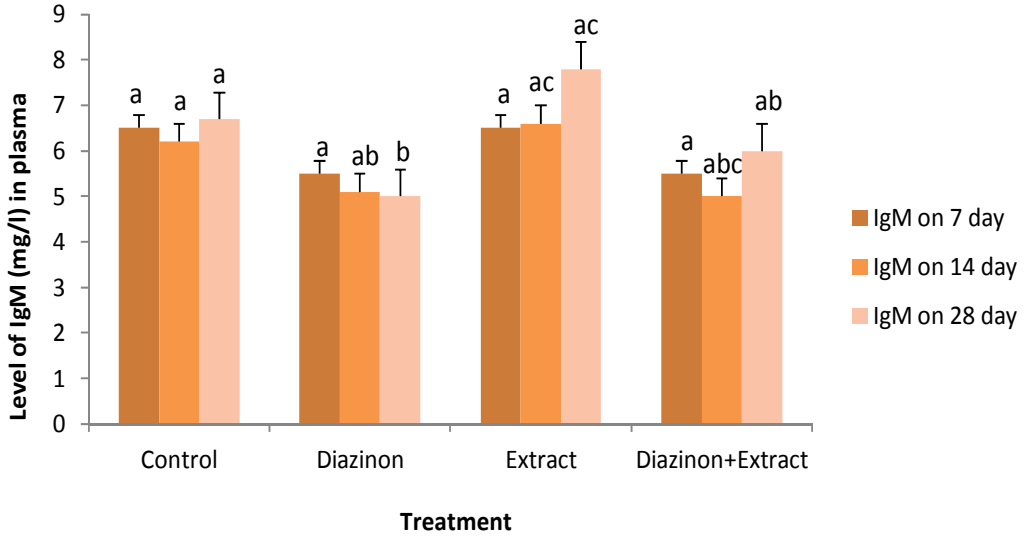
سطح فعالیت لیزوزیم نیز با استفاده از روش کدورت سنجی و با استفاده از سوسپانسون *Micrococcus lysodeikticus* و آنزیم مورآمیداز صورت گرفت. میزان کدورت نیز در طول‌موج ۶۷۰ سنجش می‌شود.

سطح ایمنوگلبولین IgM پلاسما نیز با استفاده از کیت شرکت بهار افشان تهران و اتوآنالیزر هیتاچی سنجش گردید. تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار MINITAB 13 و ترسیم نمودارها نیز با نرم‌افزار EXCEL 2003 صورت گرفت (۳۷). تجزیه‌وتحلیل آماری از طریق آنالیز واریانس یک صرفه صورت گرفت و معنی‌دار بودن میانگین‌ها نیز با آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

نتایج

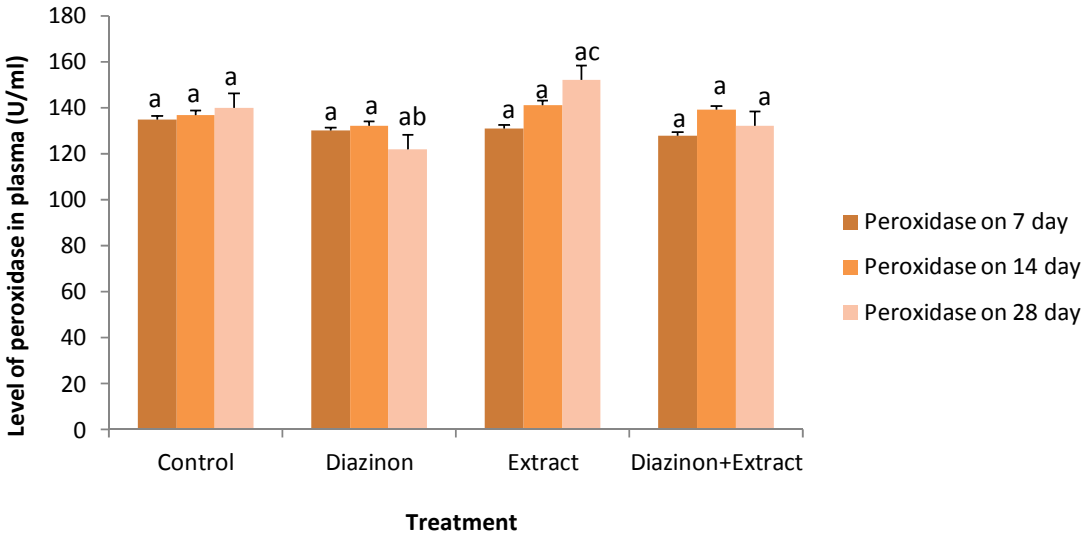
در طی دوره آزمایش هیچ‌گونه مرگ‌ومیری در بین ماهی-های تحت تیمار مشاهده نشد. بااین‌حال، ماهی‌های تحت تیمار سم بخصوص در پایان دوره آزمایشی بسیار عصبی به نظر می‌رسیدند. برخی از آنها بطور نامتعادل و در سطح آب شنا می‌کردند، که این امر ناشی از تأثیر بازدارنده سم دیازینون بر استیل‌کولین استراز و بروز رفتارهای عصبی در

این ماهی‌ها است. حال آنکه در دیگر تیمارها چنین تغییر رفتاری مشاهده نگردید. تغییرات سطح ایمنوگلبولین IgM و پراکسیداز، کمپلمان تام و همچنین لیزوزیم در پلاسمای ماهی‌های تحت تیمار و گروه کنترل در نمودارهای ۱تا۴ به ترتیب دیده می‌شود.



نمودار ۱- تغییر سطح ایمنوگلبولین پلاسما در ماهی‌ها تحت تیمار سم، مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو، مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو و سم

در نمونه‌برداری‌های صورت گرفته در روزهای ۱۴ و ۲۸ پس از شروع آزمایش سطح ایمنوگلبولین در ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون بطور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کاهش یافت. حال آنکه در اولین نمونه‌برداری هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در غلظت IgM ماهی‌های تحت تیمار مشاهده نگردید. اگرچه سطح IgM در پلاسمای ماهی‌هایی که با مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو در طی دوره آزمایش بصورت یک‌روند صعودی است، اما در افزایش سطح IgM در این ماهی‌ها در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) دیده نمی‌شود.

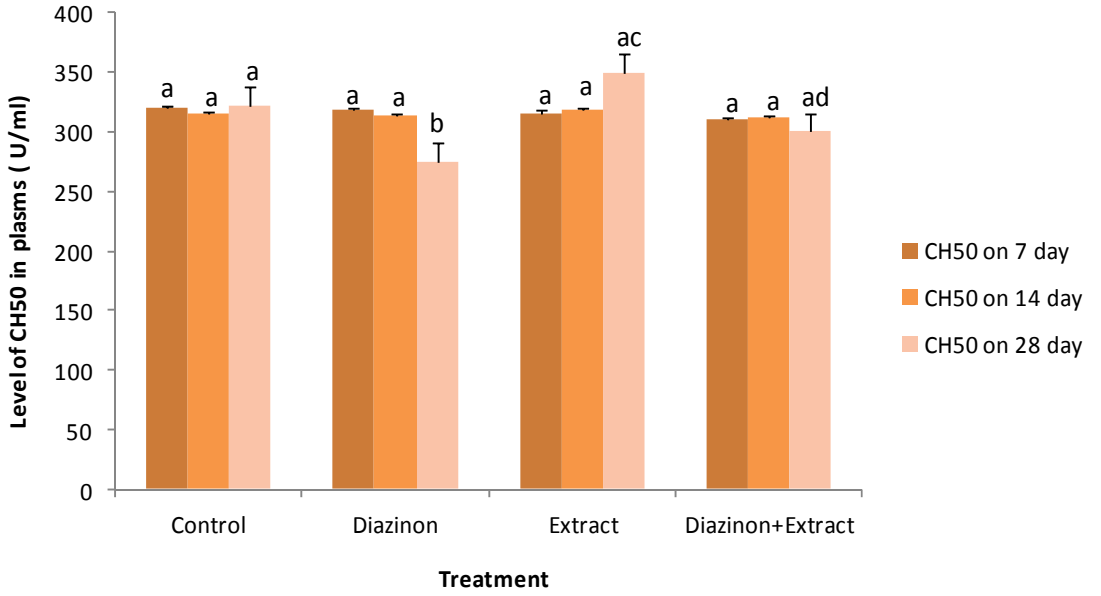


نمودار ۲- تغییر سطح پراکسیداز پلاسما در ماهی‌ها تحت تیمار سم، مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو، مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های

گیاه مو و سم

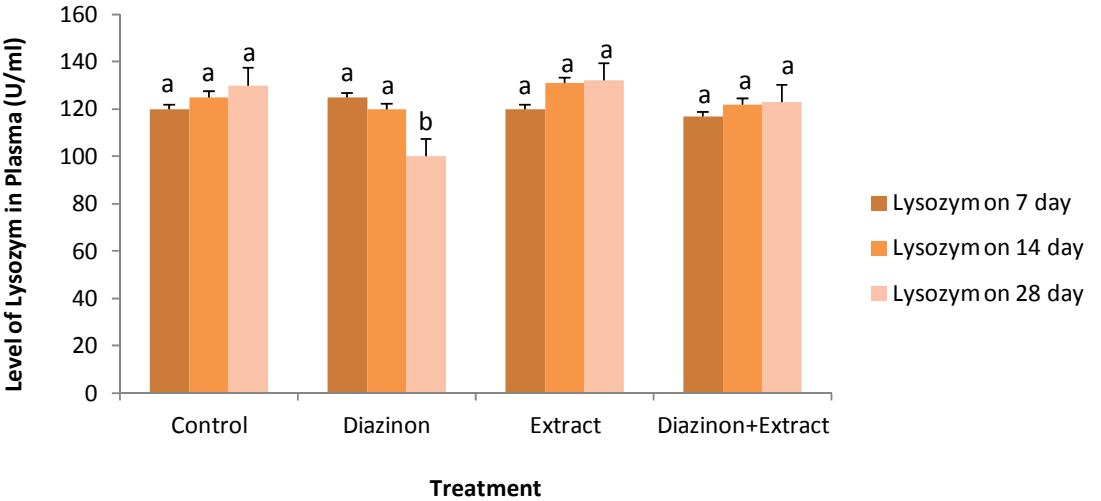
اختلاف سطح IgM در پلاسمای ماهی‌هایی که تحت تیمار سم بوده و با مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو تغذیه شده‌اند نیز از نظر آماری در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل بی‌معنی است.

هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) در سطح پراکسیداز در ماهی‌های تحت تیمار در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل در طی دوره آزمایشی و در تمامی مراحل نمونه‌برداری مشاهده نگردید. حال آنکه، بین سطح پراکسیداز ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون و ماهی‌هایی که با مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو تغذیه شده‌اند در سومین مرحله نمونه‌برداری تفاوت فاحشی از نظر آماری ($P<0/05$) وجود دارد.



نمودار ۳- تغییر سطح کمپلمان تام پلاسما در ماهی‌ها تحت تیمار سم، مکمل، مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو و سم

سطح کمپلمان تام پلاسما در ماهی‌های تحت تیمار سم پس از گذشت ۲۸ روز از قرارگرفتن ماهی‌ها در معرض سم دیازینون بطور معنی‌داری ($P<0/05$) در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل کاهش یافت.



نمودار ۴- تغییر سطح لیزوزیم پلاسما در ماهی‌ها تحت تیمار سم، مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو، مکمل عصاره‌ی برگ و سرشاخه‌های

سطح لیزوزیم در سومین مرحله از نمونه‌برداری از ماهی-های تحت تیمار سم در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) نشان می‌دهد. درحالی‌که، در سایر تیمارها در طی مراحل مختلف نمونه‌برداری در کل دوره آزمایشی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) در سطح لیزوزیم پلاسما مشاهده نگردید.

بحث

در طی سال‌های اخیر، مطالعات زیادی در مورد اثرات درمانی عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو در بیماری‌های مختلف صورت گرفته است و نتایج علمی قابل‌توجهی در این زمینه بدست آمده است. مطالعات صورت گرفته روی جانوران آزمایشگاهی نشان‌دهنده تأثیر درمانی عصاره‌های گیاهی با ترکیبات مشابه عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو در بیماری‌های ناشی از بالا بودن چربی خون، انسداد عروق و تشکیل پلاک آترواسکلروز (۲۰)، مسمومیت و اختلالات کلیوی (۳۵)، مسمومیت دارویی (۲۴)، اختلالات کبدی (۱۶)، مسمومیت غذایی (۱۲) و شیمیایی (۱۷)، بیماری‌های ویروسی (۲۲)، اختلالات عصبی (۳۳)، تنظیم قند خون (۳۲)، خاصیت ضد سرطانی (۳۴)، پیشگیری از همولیز گلبول‌های قرمز (۳۶) و سفید (۲۳) دارد.

پراکسیدازها آنزیم‌های واجد آهن می‌باشند که در اکسیداسیون انواع بسیاری از گزنوبیوتیک‌ها توسط پراکسید هیدروژن نقش ایفا می‌نمایند (۲۷). افزایش سطح فعالیت پراکسیدازها در پلاسمای ماهی‌هایی که از مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو تغذیه نموده‌اند نشان‌دهنده افزایش توان سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی جهت حذف رادیکال‌های آزاد تولیدشده در طی فرایند متابولیسم دیازینون در بدن ماهی است. حال آنکه کاهش سطح این آنزیم در ماهی‌هایی که در مواجه با دیازینون بوده‌اند نشان از برهم خوردن تعادل بین سیستم دفاعی بدن و افزایش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژنی است که این امر سبب بروز آسیب‌های جدی به بخش‌های مختلف بدن از جمله سیستم ایمنی ماهی‌ها می‌گردد.

رادیکال‌های آزاد تولید شده در حین متابولیسم و تجزیه دیازینون در فرایند سم‌زدایی در کبد ماهی‌ها می‌توانند با اکسیداسیون پروتئین‌های درون سلولی در عملکرد آنها اختلال ایجاد نمایند. در اثر پراکسیداسیون لیپیدی غشاهای سلولی، انسجام و ثبات غشا از بین رفته و در تبادلات سلولی اختلال ایجاد می‌شود که همین امر زمینه‌ساز مرگ سلولی خواهد شد (۳۰و ۶). از سوی دیگر تولید رادیکال-های آزاد اکسیژنی توسط سلول‌های فعال فاگوسیتوزی در سیستم ایمنی نیز می‌تواند حیات سلول‌های این سیستم را تهدید نماید زیرا غشای این سلول‌ها غنی از اسیدهای چرب بلند زنجیره غیراشباع است و نسبت به پراکسیداسیون لیپیدی حساس می‌باشند (۲۶).

ایمنوگلبولین‌ها یا آنتی‌بادی‌ها دسته‌ای از گلیکوپروتئین‌ها می‌باشند که در سرم و مایعات بافتی تمام مهره‌داران یافت می‌شود. آنتی‌بادی‌ها توسط پلاسموسیت‌ها تولید می‌شود و پلاسموسیت‌ها نیز از لنفوسیت‌های B مشتق می‌شوند (۲۸ و ۹). ایمنوگلبولین‌ها نقش مهمی در مقابله با بیماری‌های عفونی باکتریایی ایفا می‌کند. لذا کاهش سطح فعالیت آنها می‌توان منجر به تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها گردد. کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) سطح ایمنوگلبولین در ماهی-های تحت تیمار سم دیازینون در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد و ماهیانی که با مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو تغذیه شده‌اند نشان‌دهنده تأثیر دیازینون در کاهش سطح ایمنوگلبولین پلاسما در این ماهیان است. عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین ماهیانی که با مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو تغذیه شده‌اند و در مواجه با سم نیز قرارداشتند نیز حاکی از تأثیر عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو در کاهش عوارض ناشی از سم دیازینون بر سیستم ایمنی این ماهی‌ها است.

مطالعات صورت گرفته در این زمینه نشان می‌دهد که لنفوسیت‌ها در مواجه با رادیکال‌های آزاد اکسیژنی توانایی پاسخ تکثیری آنها به میتوژن‌ها و نیز تولید IL-2 به‌شدت دچار نقصان می‌گردد (۱۵).

کمپلمان‌ها درواقع پروتئین‌های فاز حاد سیستم ایمنی محسوب می‌شوند و غلظت آنها معمولاً پس از نکروز سلولی و مرگ بافتی تغییر می‌کند. به عبارتی، تغییر سطح کمپلمان‌ها به‌عنوان یک پاسخ فاز حاد سیستم ایمنی نوعی واکنش سیستمیک تعمیم یافته محسوب می‌شود که می‌توان آن را به التهاب و پاسخ ایمنی ذاتی مربوط دانست (۲۵). کاهش سطح کمپلمان تام پلاسما می‌تواند ماهیان را نسبت به ابتلا به عفونت‌های باکتریایی مستعد نماید. با توجه به نتایج بدست آمده کاهش سطح کمپلمان تام پلاسما در ماهی‌های در معرض سم دیازینون می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر این سم در تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها باشد. حال آنکه عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو با پیشگیری از مرگ سلولی و افزایش توان ترمیمی بافت‌ها می‌تواند از تأثیر سوء رادیکال‌های آزاد ناشی از متابولیسم دیازینون، بر سیستم ایمنی ماهی‌ها بکاهد.

لیزوزیم توسط گلبول‌های سفید منتشر و در بافت‌های مختلف و گردش خون ترشح می‌شود در ترشحات موکوسی، آبشش‌ها، بافت‌های کلیه، طحال و دستگاه گوارش و سرم خون ماهیان یافت می‌شود و قادر به شکستن پیوندهای گلیکوزیدی لایه پپتیدو گلیکان موجود در دیواره‌ی سلولی باکتری‌های گرم مثبت است (۸). کاهش سطح لیزوزیم در ماهی‌هایی که در مواجه با سم قرارداشتند نیز به‌وضوح تأثیر دیازینون را در تضعیف سیستم ایمنی نشان می‌دهد. از اینرو این ماهی‌ها نسبت به بروز عفونت‌های باکتریایی از حساسیت بیشتری برخوردار خواهند بود. همچنین عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین سطح لیزوزیم در ماهی‌های گروه کنترل و ماهی‌هایی که با مکمل عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو تغذیه شده‌اند نیز حاکی از تأثیر عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو در تقویت سیستم ایمنی است. کاهش سطح فعالیت لیزوزیم در ماهی کپور علف‌خوار که در معرض دیازینون قرار داشته نیز مؤید همین امر است (۵).

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان چنین استدلال کرد که ترکیبات موجود در کمپلکس عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو به‌ویژه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند با از بین بردن رادیکال‌های آزاد و همچنین تقویت سیستم ایمنی از اثرات سوء دیازینون بر سیستم ایمنی ماهی‌هایی که به هر دلیلی در معرض این سم قرار می‌گیرد پیشگیری نماید. درواقع، آنتی‌اکسیدان‌ها از غشای سلول‌های فاگوسیتوز کننده در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌نمایند (۱۳). علاوه براین سایر ترکیبات موجود در عصاره گیاهان دارویی می‌تواند موجب تقویت سیستم ایمنی گردد (۲ و ۱۱)، از سویی دیگر، از بروز بسیاری از بیماری‌های ناشی از خود سرکوبی سیستم ایمنی نیز جلوگیری نماید (۲۹).

براساس نتایج بدست آمده و مستندات موجود، تأثیر دیازینون بر سیستم ایمنی ماهی‌ها محرز شد. همچنین تأثیر برگ و سرشاخه‌های گیاه مو به‌عنوان یک عصاره دارویی در افزایش توان سیستم ایمنی نیز به اثبات رسید. بنابراین استفاده از مکمل گیاهی عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو در جیره غذایی ماهی‌ها می‌تواند با افزایش توان سیستم ایمنی و تقویت آن و نیز کاهش اثر سم دیازینون بر روی بخش‌های مختلف سیستم ایمنی ماهی‌ها، راه‌کار مناسبی برای پیشگیری اثرات سوء احتمالی ناشی از تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها درنتیجه ورود آلاینده‌های سمی به مزارع پرورشی و تأثیر آن بر سیستم ایمنی ماهی‌ها باشد.

منابع

۱. ابراهیم‌زاده موسوی، ح. ع.، شریف روحانی، م.، خسروی، ع.ر.، مهرابی، ی.، و آخوندزاده بستی، ا.، ۱۳۸۵. ارزیابی کاربرد اسانس

اوکالیپتوس (*Eucaliptus camaldolensis* Dehnh.) در کنترل آلودگی‌های قارچی تخم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله گیاهان دارویی، (۲۰)۵، صفحات ۴۷-۴۲.

۲. اکبری، پ.، ۱۳۹۴. اثر عصاره گیاه صبرزرد در ترمیم زخم ماهی کفال خاکستری، مجله پژوهش‌های جانوری(مجله زیست‌شناسی ایران)، (۳)۲۸، صفحات ۳۸۸-۳۸۳.

۳. بابایی، ه.، و خداپرست، س.ح.، ۱۳۸۸. بررسی و تعیین باقیمانده سموم کشاورزی در آب رودخانه سبزه کوه، چکیده مقالات نخستین همایش ملی ماهیان سردابی، تنکابن، صفحه ۱۱۸.

۴. بنایی، م.، میرواقفی، ع.ر.، احمدی، ک.، و بنایی، س.، ۱۳۸۷. تعیین LC_{50} و بررسی تأثیر سمیت حاد دیازینون بر روی شاخص‌های خون‌شناسی در کپور (*Cyprinus carpio*)، مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی، (۲)۳، صفحات ۱۰-۱.

۵. پورغلام، ر.، و سلطانی، م.، ۱۳۸۶. فعالیت لیزوزیم ماهی کپور علف خوار پس از در معرض قرارگیری به غلظت‌های تحت کشنده ارگانوفسفر، دیازینون، مجله تحقیقات دامپزشکی، (۲) ۶۲، صفحات ۵۲-۵۰.

۶. جادی، ی.، موحدی نیا، ع.، صفاهیه، ع.، دژندیان، س.، و حلاجیان، ع.، ۱۳۹۴. مطالعه اثرات تحت‌کشندگی آفت‌کش دیازینون بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون بچه ماهی سیم دریای خزر، مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، (۳) ۲۸، صفحات۲۸۱-۲۷۴.

۷. خوش‌باور رستمی، ح.ع.، و سلطانی، م.، ۱۳۸۴. بررسی تأثیر سمیت حاد دیازینون بر روی شاخص‌های خونی ماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) و تعیین میزان LC_{50}، مجله علمی شیلات ایران، (۳)۱۴، صفحات ۶۰-۴۹.

۸. خوش‌باور رستمی، ح.ع.، سلطانی، م.، و یلقی، س.، ۱۳۸۴. اثر سم دیازینون روی شاخص‌های خونی ماهی خاویاری ازون برون (*Acipenser stellatus*)و تعیینLC_{50}، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی،(۵) ۱۲، صفحات ۱۰۸-۱۰۰.

۹. عطائی مهر، ب.، باقری، پ.، امتیازجو، م.، و یوسفی سیاهکلرودی، س.، بررسی اثر گیاه آلوئه‌ورا بر تغییر میزان ایمونوگلوبولین‌های IgM,IgA, IgG، پروتئین کل و شمارش تفریقی گلبول‌های سفید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، (۱)۲۷، صفحات ۹۹-۸۹.

10. Ahmadi, K., Banaee, M., Rad, E., and Mirvaghefi, A.R., 2008. Effects of dietary intake of levamisole on the immune system and growth of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) challenged by *Aeromonas hydrophila*. 15th National & Third International Conference of Biology, University of Tehran, 294 p.

11. Borsari, M., Gabbi, C., Ghelfi, F., Grandi, R., Saladini, M., Severi, S., and Borella, F., 2001. Silybin, a new iron-chelating agent, J., Inorg. Biochem., 85(2-3), PP:123-129.

12. Desplaces, A., Choppin, J., and Vogel, G., 1975. The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning. Arzneimittelforschung, 25, PP: 89-96.

13. Dietzmann, J., Thiel, U., Ansorge, S., Neumann, K.H., and Tager, M., 2002. Thiolinducing and immunoregulatory effects of flavonoids in peripheral blood mononuclear cells from patients with end-stage diabetic nephropathy, Free Radic. Biol. Med. 33, PP: 1347-1354.

14. Droge, W., and Breitkreutz, R., 2000. Glutathione and immune function, Proc Nutr, Soc., 59, PP: 595-600.

15. Flescher, E., Ledbetter, J., and Schieven, G., 1994. Longitudinal exposure of human T lymphocytes to weak oxidative stress suppresses transmembrane and nuclear signal transduction. J. Immunol., 153, PP: 4880-4889.

16. Fiebrich, F., and Koch, H., 1979. Silymarin, an inhibitor of lipoxygenase, Experienta, 35, PP: 1548-1560.

17. Janiak, B., 1974 Depression of microsomal activity in the liver of mice following single administration of halothane and its influencibility by silybin. Anaesthesist, 23, PP: 389-3993.

18. Kazi, N., Radvany, R., Oldman, T., Keshavarzian, A., Frommel, T.O., Libertin, C., and Mobarhan, S., 1997. Immunomodulatory effect of β-carotene on T lymphocyte subsets in patients with resected colonic polyps and cancer. Nut Cancer, 28, PP: 140-145.

19. Kee-Ching, G.J., Chang-Shi, Y., and Wai-Yi, S., 1996. Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults. Nutr., 64, PP: 960-955.

20. Krecman, V., Skottova, N., Walterova, D., Ulrichova, J., and Simanek, V., 1998. Silymarin inhibits the development of diet, induced hypercholesterolemia in rats. Planta Med., 64,

PP: 138-142.

21. Lang, I., Deak, G., Nekam, K., Muzes, G., Gonzalez-Cabello, R., Gergely, P., and Feher, J., 1988. Hepatoprotective and immunomodulatory effects of antioxidant therapy, Acta Med. Hung. 45, PP: 287-295.

22. Lirussi, F., and Okolicsanyi, L., 1992. Cytoprotection in the nineties: experience with ursodeoxycholic acid and silymarin in chronic liver disease. Acta Physiol. Hung., 80, PP: 363-367.

23. Locher, R., Suter, P.M., Weyhenmeyer, R., and Vetter, W., 1998. Inhibitory action of silibinin on low density lipoprotein oxidation, Arzneimittelforschung, 48, PP: 236-239.

24. Muriel, P., Mourelle, M., 1990. Pervention by silymarin of membrane alterations in acute CCL4 liver damage, J. Appl. Toxicol., 10, PP: 275-279.

25. Naghdi Badi, H., and Makizadeh Tafti, M., 2007. A review on *Thymus* species, Journal of Medicinal Plants, 7, PP: 1-13.

26. Poortmans, J.R., 1987. Serum protein determination during short exhaustive physical activity. Journal of Applied physiology, 30, PP: 190-192.

27. Saunders, B.C., 1973. Peroxidases and catalases, in: G.L., Eichhorn (Ed.), Inorganic Biochemistry, Elsevier, Amsterdam, PP: 988-1021.

28. Stites, D.P., 1991. Basic and Clinical Immunology., USA: Lange Medical Book.

29. Townsend, D.M., Tew, K.D., and Tapiero, H., 2003. The importance of glutathione in human disease, Biomed Pharmacother, 57, PP: 145-155.

30. Üner, N., Oruç, E.Ö., Sevgiler, Y., Şahin, N., Durmaz, H., and Usta, D., 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 21, PP: 241-245.

31. Valenzuela, A., and Garrido, A., 1994. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. Biol. Res., 27, PP: 105-112.

32. Velussi, M., Cernigoi, A.M., Viezzoli, L., Dapas, F., Caffau, C., and Zilli, M., 1993. Silymarin reduces hyperinsulinemia, malondialdehyde levels and daily insulin needs in cirrhotic diabetic patients. Current Therapeutic Research, 53, PP: 533-545.

33. Zhang, J.Q., Mao, X.M., and Zhou, Y.P., 1993. Effects of silybin on red blood cell sorbitol and nerve conduction velocity in diabetic patients, Zhongguo Zhong Xi, Yi, Jie, He, Za, Zhi., 13(12) PP:725-6.

34. Zi, X., Feyes, D.K., and Agarwal, R., 1998. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. Clin, Cancer Res., 4, PP: 1055-1064.

35. Zima, T., Kamenikova, L., Janebova, M., Buchar, E., Crkovska, T., and Tesar, V., 1998. The effect of silibinin on experimental cyclosporine nephrotoxicity, Renal Failure, 20, PP: 471-479.

36. Zou, C.G., Agar, N.S., and Jones, G.L., 2001. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical inititor AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. Life Sci., 69, PP: 75-86.

37. F. Ryan, Brian L. Joiner, and Jonathan Cryer. 2001. MINITAB Handbook. Publisher: Duxbury Press.

Therapeutic effects of extract *Vitis vinifera* on immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) challenge by diazinon

Rabie M.

Natural Resources and Environmental Engineering Dept., Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Today, the arrival of agricultural pesticides in surface water is one of the biggest environmental problems that can threaten aquatic life. The impact of these pollutants on the immune system of fish has caused weakening it and increasing fish sensitivity to pathogens. Diazinon is one of the most important organophosphates used in many agricultural areas and found in Iran's surface water. This study aimed to evaluate the effect of diazinon on the immune system of fish and the use of *Vitis vinifera* extract to reduce the adverse effects of the pesticide in the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Feeding was done by adding plant extract supplement of 400 mg/kg of food. After sampling of fish on days 7, 14 and 28 after the start of the experiment and separate the plasma levels of peroxidase, immunoglobulins and complement were measured. The reduction in the level of plasma peroxides, IgM, total complement and lysozyme in fishes exposed to diazinon shows the effect of diazinon on the immune system of fish in the long term well. While in fishes fed by Milk thistle plant *V. vinifera* extract and exposed to toxin, no significant difference ($p < 0.05$) was observed compared to the fishes in the control group which reflects the strengthening and protective impact of Milk thistle plant *V. vinifera* extract on the immune system of rainbow trout.

Key words: Diazinon, Milk Thistle Plant Vitis Vinifera Extract, Rainbow Trout, Immune System