

## تأثیر عصاره سیلی مارین بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه با سم دیازینون

کمال احمدی،<sup>۱\*</sup>، عباس متین فر،<sup>۲</sup> علیرضا میرواقفی،<sup>۳</sup> بابک عطائی مهر<sup>۴</sup> و مهدی بنایی<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته شیلات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، عضو باشگاه پژوهشگران جوان

۲- مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران

۳- دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی

۴- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم و فنون دریایی

۵- دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده محیط زیست و منابع طبیعی بهبهان

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۰/۱۵

تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۲۰

### چکیده

امروزه، ورود سموم کشاورزی به آب سطحی یکی از بزرگترین معضلات زیست محیطی است که می‌تواند حیات آبیان 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 گیاه خار مریم، سیلی مارین در کاهش اثر سوء این سم بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان است. کاهش سطح پراکسیداز پلاسما، IgM، کمپلمان تام، لیزوزیم در ماهی‌هایی که در معرض دیازینون قرار داشته‌اند به خوبی نشان دهنده تأثیر سم دیازینون بر سیستم ایمنی ماهی‌ها در طولانی مدت است. حال آنکه در ماهی‌هایی که با مکمل سیلی مارین تغذیه شده و در مواجهه با سم قرار گرفته‌اند، تغییر معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل مشاهده نگردید، که این امر نشان دهنده تأثیر تقویتی و حفاظتی سیلی مارین بر سیستم ایمنی ماهی‌های قزل آلاهی رنگین کمان است.

### واژگان کلیدی

دیازینون، سیلی مارین، قزل آلاهی رنگین کمان، سیستم ایمنی

### Effect of Silymarin extract on immune system of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) challenged by diazinon

Ahmadi, K.,<sup>1</sup> Vosoughi A. R.,<sup>2</sup> Mirvaghefi, A. R.,<sup>3</sup> Ataimehr, B.<sup>4</sup> & Banaee, M.<sup>5</sup>

1-Islamic Azad University, North Tehran Branch, Member of Young Researchers Club

2- Iranian Fisheries Research Organization

3- Tehran University, Faculty of Natural Resources

4- Faculty of Marine Science & Technology, Islamic Azad University, North Tehran Branch

5- University of Shahid Chamran Ahvaz, Environment and Natural Resource College

### Abstract

To date, discharge of agriculture pesticides into surface water is one of the biggest environment problems that can threaten the aquatic life. Impact of pollutants on the fish immune system can result in sensitivity and becoming vulnerable to pathogens. Diazinon, one organophosphate pesticides that used in many agriculture areas of Iran, is found in surface water. The purpose of this study was to evaluate effects of diazinon on fish immune system and use of Milk thistle plant extract, *Silybum marianum*, in to reducing adverse effects of this toxin on the immune system of rainbow trout. Significantly reduced plasma levels of peroxidase, IgM, total complement, lysozyme of fish that had been exposed to diazinon have well illustrated the impact of diazinon on immune system in long periods. While, no significant change was observed in the fish nourished by complementary diet and challenged by toxin compared with control fish group that indicated this protective and amplified effect of silymarin on immune system of rainbow trout.

**Keywords:** diazinon, silymarin, rainbow trout, immune system.

## مقدمه

با توجه به توسعه بخش کشاورزی و استفاده بیش از حد از سموم و آفت کش ها و نفوذ این ترکیبات از طریق زهکشی مزارع و رواناب های سطحی، و عدم توجه به مسائل زیست محیطی توسط مسئولین و کشاورزان، بروز اختلال در حیات آبزیان و افزایش صدمات جبران ناپذیر در این زمینه اجتناب ناپذیر است. دیازینون یکی از مهمترین سموم ارگانوفسفره کشاورزی است در طی ده های اخیر در ایران توسط کشاورزان به کرات در طی فصل کشاورزی مورد استفاده قرار می گیرد و معمولا پس از بارش باران از طریق رواناب ها وارد آب های سطحی کشور می شود (سلسله، ۱۳۸۰؛ طراحی تبریزی، ۱۳۸۰؛ هنرپژوه، ۱۳۸۲؛ قمیسی، ۱۳۸۳؛ حسینی، ۱۳۸۴ و بابایی، ۱۳۸۸).

سیستم ایمنی جانوران آبزی، نظیر ماهی ها بطور پیوسته تحت تاثیر تغییرات دوره ای و ناخواسته محیطی قرار دارد و هرگونه تغییر ناخواسته محیطی می تواند بصورت استرس حاد یا مزمن سلامت جانور را به مخاطره اندازد. از اینرو سموم آفت کش، علف کش و سایر ترکیبات سمی موجود در پساب مزارع کشاورزی، فاضلاب های صنعتی و شهری می تواند بر روی سیستم ایمنی ماهیان اثرگذار باشد. کاهش معنی دار تعداد گلبول های سفید، بویژه لنفوسیت ها و افزایش نوتروفیل ها و ائوزینوفیل ها در ماهی ازون برون، *A. stellatus* (خوشبازور رستمی و همکاران، ۱۳۸۴)، ماهی شیپ، *A. nudiventris* (خوشبازور رستمی و سلطانی، ۱۳۸۴) قزل آلی رنگین کمان، *O. mykiss* (بنایی و همکاران، ۱۳۸۸) و کپور، *C. carpio* (بنایی و همکاران، ۱۳۸۷)، تغییر سطح فعالیت لیزوزیم در ماهی کپور علف خوار (پورغلام و سلطانی، ۱۳۸۶) و ماهی قزل آلی رنگین کمان (بنایی و همکاران، ۱۳۸۸) تحت تیمار سم دیازینون نشان دهنده تاثیر این سم در تضعیف سیستم ایمنی ماهی های در معرض آلودگی دارد. در واقع رادیکال های آزاد تولید شده ناشی از متابولیسم این سموم در سیستم بیولوژیک آبزیان می تواند بسیار خطرناک باشد. تولید رادیکال آزاد ناشی از متابولیسم دیازینون در بافت های مختلف بویژه کبد ماهی های تحت تیمار سم دیازینون به اثبات رسیده است (Üner et al., 2006).

سیستم ایمنی جانوران از حساسیت نسبتا بالایی نسبت به استرس اکسایشی برخوردار می باشد. گلووتاتیون (GSH)، مهمترین عامل احیا کننده درون سلولی است و نسبت به استرس اکسایشی فوق العاده حساس می باشد و دارای وظایف و عملکردهای متعددی نظیر حفاظت در مقابل استرس اکسایشی، تنظیم بیان ژنی، تنظیم مرگ سلولی، فعال نمودن و تکثیر لنفوسیت های نوع T می باشد. حال آنکه، مشاهده شده پایین بودن سطح GSH در ارتباط با بروز انواع اختلالات در عملکرد لنفوسیت ها می باشد (Townsend et al., 2003 و Droge et al., 2000).

لذا، تقویت سیستم ایمنی ماهی ها از طریق افزودن مکمل های غذایی می تواند راه حل مناسبی برای پیشگیری از بروز ضعف در سیستم ایمنی آنها گردد. ترکیب بسیاری از عصاره های گیاهی قادر به از بین بردن انواع ترکیبات فعال اکسیژن دار (ROS) می باشند و به موجب آن می توانند بطور مستقیم از اثرات استرس اکسایشی بکاهند. این ترکیبات همچنین می توانند بطور غیر مستقیم و از طریق فعال نمودن سیستم دفاع آنتی اکسیدانی نقش حفاظتی خود را اعمال نمایند.

استفاده از گیاهان دارویی به عنوان ترکیبات ضد قارچ (ابراهیم زاده موسوی و همکاران، ۱۳۸۵) و ضد باکتری (Naghdi Badi and Makizadeh Tafti, 2007) و همچنین به عنوان ترکیبات محرک سیستم ایمنی (Ahmadi et al., 2008)، در افزایش توان سیستم ایمنی ماهیان از دیرباز مرسوم بوده است.

گیاه خار مریم از تیره کاسنی با نام علمی *Silybum marianum*، نام انگلیسی Milk thistle واجد کمپلکس به نام سیلی مارین می باشد که از خاصیت دارویی فوق العاده ای برخوردار است. سیلی مارین، حاوی مخلوطی از سیلی بین، سیلی کریستین و سیلی دیانین می باشد. از لحاظ دارویی، سیلی مارین و سیلی بین جز ترکیبات محافظ سلولی

بوپژه سلول های کبدی محسوب می شوند. مطالعات متعددی بر روی خواص آنتی اکسیدانی، از بین بردگی اکسی رادیکال ها و توانایی شلات نمودن آهن و تاثیرات افزایشده محتوی گلوکوتاتیون درون سلولی صورت گرفته است که گویای این مطلب است که سیلی مارین ممکن است موجب تقویت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی سلول گردد (Borsari et al., 2001; Valenzuela and Garrido, 1994). نتیجه دیگر تحقیقات نیز نشان دهنده خاصیت و عملکرد سیلی مارین در تقویت سیستم ایمنی است (Lang et al., 1988; Dietzmann et al., 2002). با این حال، مکانیزم سیلی مارین به عنوان یک محرک سیستم ایمنی به خوبی تشریح نشده است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر عصاره سیلی مارین بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلی رنگین کمان (*Oncrohynchus mykiss*) در مواجهه با سم دیازینون است.

## مواد و روشها

۱۲۰ عدد ماهی قزل آلی رنگین کمان کاملاً سالم از نظر ظاهری ( $85/5 \pm 15$  گرمی) از یک مزرعه خصوصی خریداری و به آزمایشگاه تکثیر و پرورش ماهی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران انتقال داده شدند. ماهی های به طور تصادفی در ۱۲ مخزن ۱۰۰۰ لیتری مجهز به هواده با طراحی سیستم نیمه مدار بسته با ۱۰ درصد 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.

تهیه غذا بصورت تازه و بطور هفتگی و با افزودن پودر مکمل سیلی مارین به نسب ۴۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم غذا با پودر غذای تجاری و تهیه مجدد پلت غذایی انجام گردید.

آزمایش سم شناسی مطابق به دستورالعمل OECD (Organization for Economic C-operation an Development) صورت گرفت. در طی مدت آزمایش شرایط فیزیکی و شیمیایی آب بطور مرتب و روزانه کنترل گردید. آزمایش سمیت مزمن روی قزل آلی رنگین کمان برای ۲۸ روز و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و به صورت چهار تیمار ماهی های گروه کنترل، ماهی های تحت تیمار دیازینون ( $1\text{mg/l}$ ، ۰/۱)، ماهی هایی که صرفاً با مکمل غذایی سیلی مارین تغذیه شدند و ماهی هایی که علاوه بر قرار گرفتن در معرض سم دیازینون در طول دوره آزمایشی نیز با غذای حاوی مکمل سیلی مارین 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 در مجموع از هر تیمار ۹ ماهی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ صید و پس از بیهوش کردن با عصاره پودر گل میخک ( $1:5000$ ) از ساقه دم آنها با استفاده از سرنگ آغشته به <sup>1</sup>EDTA (Ethyene Diamine Tetra Acetic Acid) خون گیری گردید. پلاسما پس از سانتریفیوژ نمونه های خون در دستگاه سانتریفیوژ با قدرت ۶۰۰۰g دور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد جداسازی و تا زمان انجام آزمایش های نهایی در فریز ۷۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

در سنجش سطح فعالیت پراکسیداز پلاسما، ۱۵ میکرولیتر پلاسما با ۳۵ میکرولیتر بافر HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)<sup>2</sup> عاری از منیزیم و کلسیم رقیق شد. سپس به آن ۵۰ میکرولیتر محلول تترا متل بنزیدین (Tetra Methyl Benzyl) TMB و ۵ میلی مول آب اکسیژنه افزوده شد تا محلول به رنگ آبی درآید، سپس پس از گذشته ۲ دقیقه، با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۲ مولار واکنش رنگی متوقف گردید و رنگ

محلول به زرد روشن تبدیل شد. در مرحله بعد میزان جذب نوری در طول موج 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<sub>50</sub> با استفاده از کیت تهیه شده از شرکت بهار افشان تهران و براساس روش ایمنودیفیوژن شعاعی اندازه‌گیری گردید.

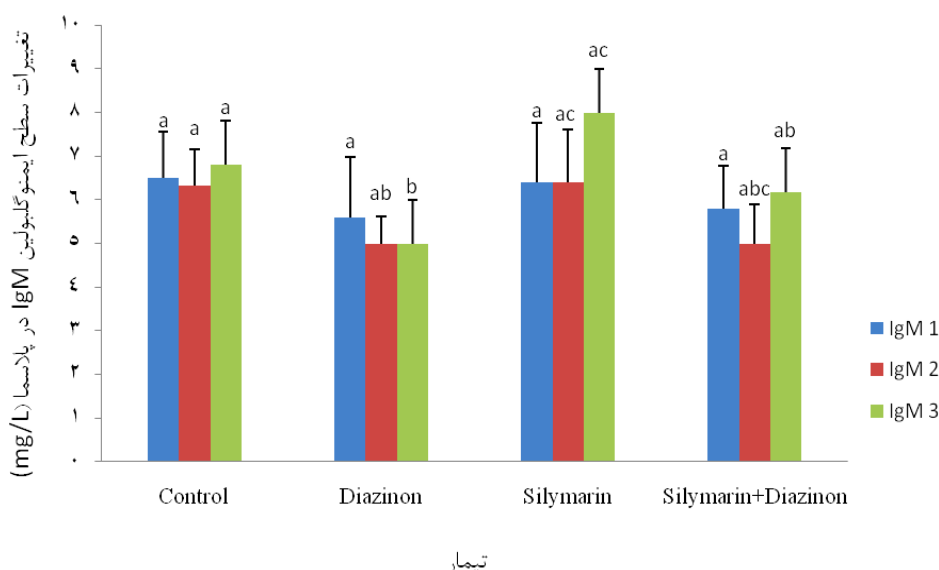
سطح فعالیت لیزوزیم نیز با استفاده از روش کدورت سنجی و با استفاده از سوسپانسیون *Micrococcus lysodeikticus* و آنزیم مورآمیداز صورت گرفت. میزان کدورت نیز در طول موج ۶۷۰ سنجش می‌شود. سطح ایمنوگلوبولین Igm پلاسما نیز با استفاده از کیت شرکت بهار افشان تهران و اتوآنالیزر هیتاچی سنجش گردید.

## تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار MINITAB 13 و ترسیم نمودارها نیز با نرم‌افزار EXCEL 2003 صورت گرفت. تجزیه و تحلیل آماری از طریق آنالیز واریانس یک صرفه صورت گرفت و معنی‌دار بودن میانگین‌ها نیز با آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

## نتایج

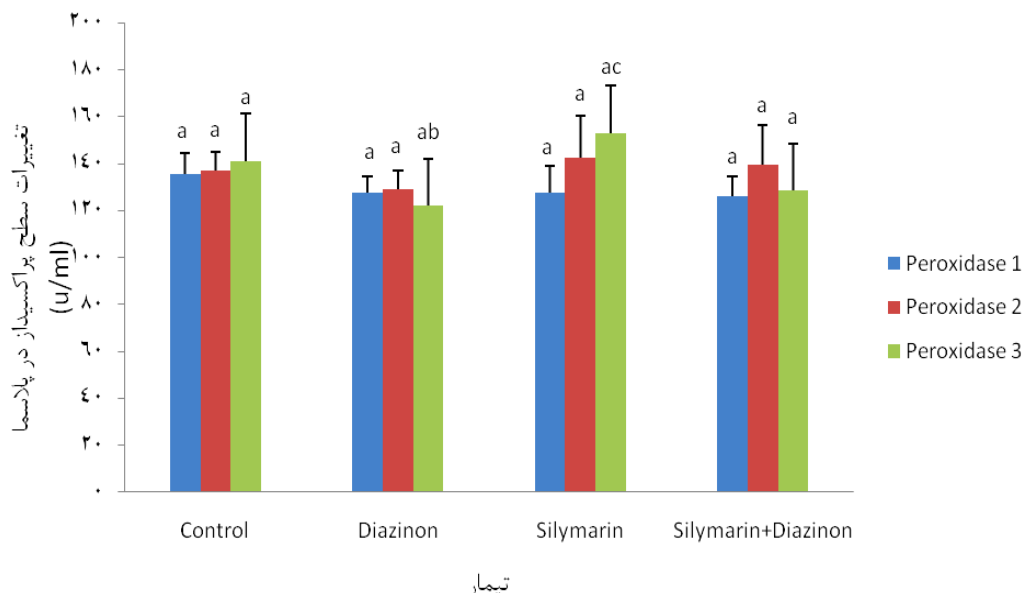
در طی دوره آزمایش هیچ گونه مرگ و میری در بین ماهی‌های تحت تیمار مشاهده نشد. با این حال، ماهی‌های تحت تیمار سم بخصوص در پایان دوره آزمایشی بسیار عصبی به نظر می‌رسیدند. برخی از آنها بطور نامتعادل و در سطح آب شنا می‌کردند، که این امر ناشی از تاثیر بازدارنده سم دیازینون بر استیل‌کولین استراز و بروز رفتارهای عصبی در این ماهی‌ها است. حال آنکه در دیگر تیمارها چنین تغییر رفتاری مشاهده نگردید. تغییرات سطح ایمنوگلوبولین Igm و پراکسیداز، کمپلمان تام و همچنین لیزوزیم در پلاسما ماهی‌های تحت تیمار و گروه کنترل بصورت نمودار در اشکال ۱ تا ۴ به ترتیب دیده می‌شود.



شکل ۱- تغییر سطح ایمنوگلوبولین پلاسما در ماهی قزل‌آلا تحت تیمار سم، مکمل سیلی‌مارین، مکمل سیلی‌مارین و سم

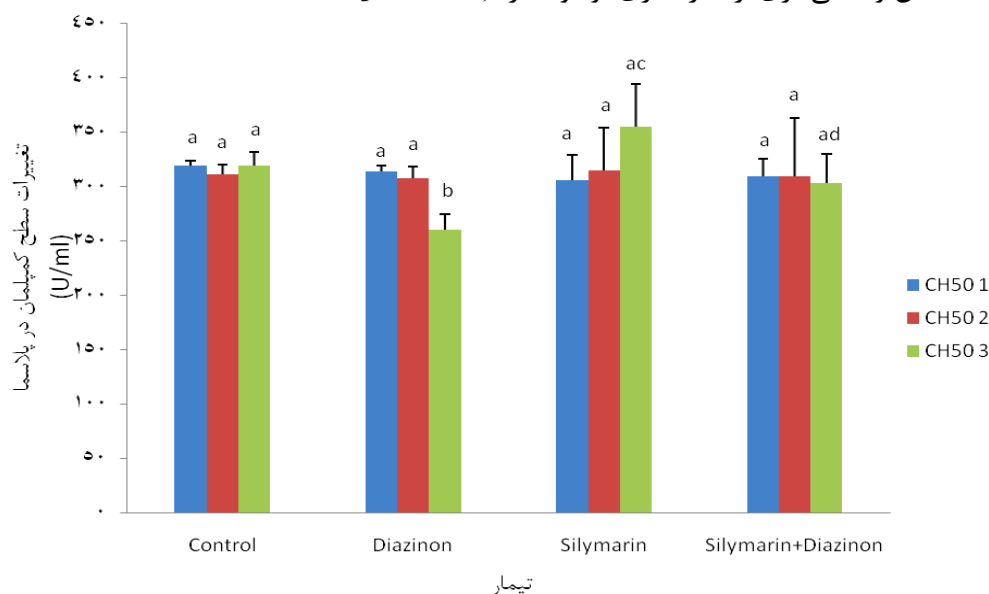
در نمونه‌برداری‌های صورت گرفته در روزهای ۱۴ و ۲۸ پس از شروع آزمایش سطح ایمنوگلوبولین در ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون بطور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) کاهش یافت. حال آنکه در اولین نمونه برداری هیچ گونه تغییر

معنی‌داری در غلظت IgM ماهی‌های تحت تیمار مشاهده نگردید. اگرچه سطح IgM در پلاسماهای ماهی‌هایی که با مکمل سیلی‌مارین در طی دوره آزمایش بصورت یک روند صعودی است، اما در افزایش سطح IgM در این ماهی‌ها در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل اختلاف معنی‌داری دیده نشد ( $p > 0/05$ ). اختلاف سطح IgM در پلاسماهای ماهی‌هایی که تحت تیمار سم بوده و با مکمل سیلی‌مارین تغذیه شده‌اند نیز از نظر آماری در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ).



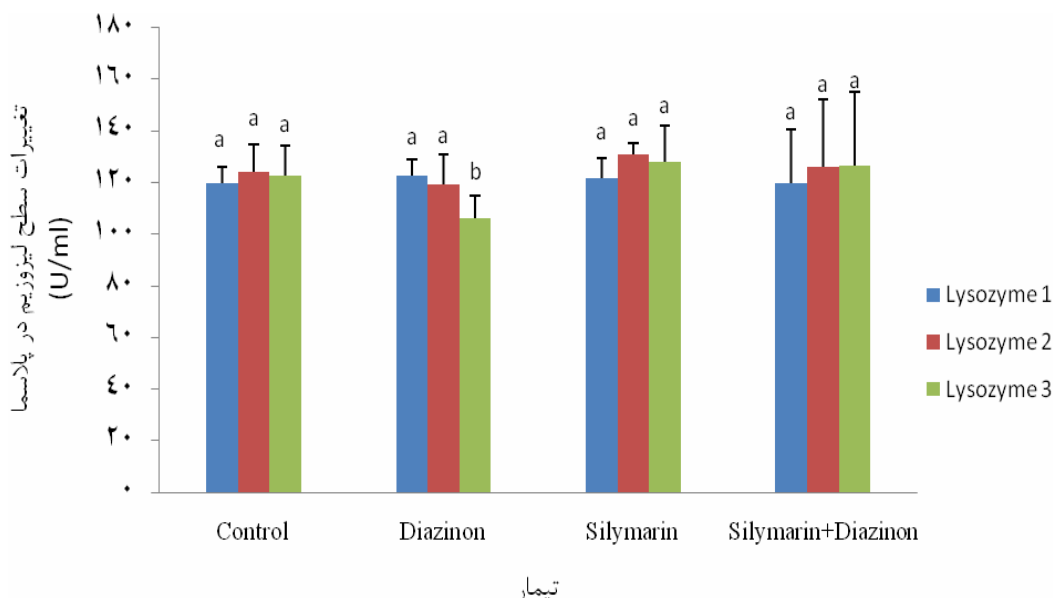
شکل ۲- تغییر سطح پراکسیداز پلاسما در ماهی قزل‌آلا تحت تیمار سم، مکمل سیلی‌مارین، مکمل سیلی‌مارین و سم

هیچ گونه اختلاف معنی‌داری در سطح پراکسیداز در ماهی‌های تحت تیمار در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل در طی دوره آزمایشی و در تمامی مراحل نمونه‌برداری مشاهده نگردید ( $p > 0/05$ ). حال آنکه، بین سطح پراکسیداز ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون و ماهی‌هایی که با مکمل سیلی‌مارین تغذیه شده‌اند در سومین مرحله نمونه برداری تفاوت فاحش و معنی‌داری از نظر آماری وجود دارد ( $p < 0/05$ ).



شکل ۳- تغییر سطح کیتیناز تام پلاسما در ماهی قزل‌آلا تحت تیمار سم، مکمل، مکمل سیلی‌مارین و سم

سطح کمپلمان تام پلاسما در ماهی‌های تحت تیمار سم پس از گذشت ۲۸ روز از قرار گرفتن ماهی‌ها در معرض سم دیازینون بطور معنی‌داری در مقایسه با ماهی‌های گروه کنترل کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). در حالی که در دیگر زمان‌های نمونه‌برداری هیچ گونه اختلاف معنی‌داری در سطح کمپلمان این ماهی‌ها مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ). افزایش معنی‌دار سطح کمپلمان پلاسما در ماهی‌هایی که با مکمل سیلی‌مارین تغذیه شده‌اند در مقایسه با ماهی‌هایی که علاوه بر تغذیه از سیلی‌مارین در معرض سم نیز قرار داشته‌اند و نیز ماهی‌هایی که بدون دریافت هیچ گونه مکملی تحت تیمار سم بوده‌اند نیز قابل ملاحظه و معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ).



شکل ۴- تغییر سطح لیزوزیم پلاسما در ماهی قزل‌آلا تحت تیمار سم، مکمل سیلی‌مارین، مکمل سیلی‌مارین و سم

سطح لیزوزیم در سومین مرحله از نمونه‌برداری از ماهی‌های تحت تیمار سم در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد ( $P < 0/05$ ). در حالی که، در سایر تیمارها در طی مراحل مختلف نمونه‌برداری در کل دوره آزمایشی هیچ گونه اختلاف معنی‌داری در سطح لیزوزیم پلاسما مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ).

## بحث و نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق حاکی از آن بود که کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) سطح ایمنوگلوبولین در ماهی‌های تحت تیمار سم دیازینون در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد و ماهیانی که با مکمل سیلی‌مارین تغذیه شده‌اند نشان دهنده تاثیر دیازینون در کاهش سطح ایمنوگلوبولین پلاسما در این ماهیان است. عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین ماهیانی که با مکمل سیلی‌مارین تغذیه شده‌اند و در مواجهه با سم نیز قرار داشتند نیز حاکی از تاثیر سیلی‌مارین در کاهش عوارض ناشی از سم دیازینون بر سیستم ایمنی این ماهی‌ها است.

مطالعات صورت گرفته در این زمینه نشان می‌دهد که لنفوسیت‌ها در مواجهه با رادیکال‌های آزاد اکسیژنی (ROS)، توانایی پاسخ تکثیری آنها به میتوزها و نیز تولید IL-2 بشدت دچار نقصان می‌گردد (Flescher et al., 1994). کمپلمان‌ها در واقع پروتئین‌های فاز حاد سیستم ایمنی محسوب می‌شوند و غلظت آنها معمولاً پس از نکرور سلولی و مرگ بافتی تغییر می‌کند. به عبارتی، تغییر سطح کمپلمان‌ها به عنوان 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 (Poortmans, 1987). 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 نشان دهنده تاثیر این سم در تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌ها باشد. حال آنکه سیلی‌مارین با پیشگیری از مرگ سلولی و افزایش توان ترمیمی بافت‌ها می‌تواند از تاثیر سوء رادیکال‌های آزاد ناشی از متابولیسم دیازینون، بر سیستم ایمنی ماهی‌ها بکاهد.

لیزوزیم توسط گلبولهای سفید منتشر 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 (سلطانی، ۱۳۸۷). کاهش سطح لیزوزیم در ماهی‌هایی که در مواجهه با سم قرار داشتند نیز به وضوح تاثیر 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 سیلی‌مارین تغذیه شده‌اند نیز حاکی از تاثیر سیلی‌مارین در تقویت سیستم ایمنی است. کاهش سطح فعالیت لیزوزیم در ماهی کپور علف‌خوار که در معرض دیازینون قرار داشته نیز موید همین امر است (پورغلام و سلطانی، ۱۳۸۶). در طی سال‌های اخیر، مطالعات زیادی در مورد اثرات درمانی سیلی‌مارین در بیماری‌های مختلف صورت گرفته است و نتایج علمی قابل توجهی در این زمینه بدست آمده است. مطالعات صورت گرفته روی جانوران آزمایشگاهی نشان دهنده تاثیر درمانی سیلی‌مارین در بیماری‌های ناشی از بالا بودن چربی خون، انسداد عروق و تشکیل پلاک آترواسکلروز (Kreman et al., 1998)، مسمومیت و اختلالات کلیوی (Zima et al., 1998)، مسمومیت دارویی (Muriel and Mourelle, 1990)، اختلالات کبدی (Fiebrich and Koch, 1979)، مسمومیت غذایی (Desplaces et al., 1975) و شیمیایی (Janiak, 1974)، بیماری‌های ویروسی (Lirussi and Okolicsanyi, 1992)، اختلالات عصبی (Zhang et al., 1993)، تنظیم قند خون (Velussi et al., 1993)، خاصیت ضد سرطانی (Zi et al., 1998)، پیشگیری از همولیز گلبول‌های قرمز (Zou et al., 2001) و سفید (Locher et al., 1998) دارد.

پراکسیدازها آنزیم‌های واجد هم می‌باشند که در اکسیداسیون انواع بسیاری از گزنوبیوتیک‌ها توسط پراکسید هیدروژن نقش ایفا می‌نمایند (Saunders, 1973). افزایش سطح فعالیت پراکسیدازها در پلاسما ماهی‌هایی که از مکمل سیلی‌مارین تغذیه نمده‌اند نشان دهنده افزایش توان سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی جهت حذف رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی فرایند متابولیسم دیازینون در بدن ماهی است. حال آنکه کاهش سطح این آنزیم در ماهی‌هایی که در مواجهه با دیازینون بوده‌اند نشان از برهم خوردن تعادل بین سیستم دفاعی بدن و افزایش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژنی (ROS) 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، می‌تواند 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 زمینه ساز مرگ سلولی خواهد شد (Üner et al., 2006).

از سوی دیگر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی (ROS) 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 غیر اشباع است و نسبت به پراکسیداسیون لیپیدی حساس می‌باشند.

ایمنوگلوبولین ها یا آنتی بادی ها دسته ای از گلیکوپروتئین ها می باشند که در سرم و مایعات بافتی تمام مهره داران یافت می شود. آنتی بادی ها توسط پلاسموسیت ها تولید می شود و پلاسموسیت ها نیز از لنفوسیت های B مشتق می شوند (Stites, 1991). ایمنوگلوبولین ها نقش مهمی در مقابله با بیماری های عفونی باکتریایی ایفا می کند. لذا کاهش سطح فعالیت آنها می توان منجر به تضعیف سیستم ایمنی ماهی ها گردد

با توجه به نتایج بدست آمده می توان چنین استدلال کرد که ترکیبات موجود در کمپلکس سیلی مارین بویژه ترکیبات آنتی اکسیدانی، می تواند با از بین بردن رادیکال های آزاد و همچنین تقویت سیستم ایمنی از اثرات سوء دیازینون بر سیستم ایمنی ماهی هایی که به هر دلیلی در معرض این سم قرار می گیرد پیشگیری نماید. در واقع، آنتی اکسیدان ها از غشای سلول های فاگوسیتوز کننده در برابر رادیکال های آزاد محافظت می نمایند (Ditzmann et al., 2002). علاوه بر این سایر ترکیبات موجود در عصاره گیاهان دارویی می تواند موجب تقویت سیستم ایمنی گردد (Levin et al., 1996 & Heyborn and Silver, 1996)، از سویی دیگر، از بروز بسیاری از بیماری های ناشی از خود سرکوبی سیستم ایمنی نیز جلوگیری نماید (Thellin et al., 2000).

بر اساس نتایج بدست آمده و مستندات موجود، تاثیر دیازینون بر سیستم ایمنی ماهی ها محرز شد. همچنین تاثیر سیلی مارین به عنوان یک عصاره دارویی در افزایش توان سیستم ایمنی نیز به اثبات رسید. بنابراین استفاده از مکمل گیاهی سیلی مارین در جیره غذایی ماهی ها می تواند با افزایش توان سیستم ایمنی و تقویت آن و نیز کاهش اثر سم دیازینون بر روی بخش های مختلف سیستم ایمنی ماهی ها، راه کار مناسبی برای پیشگیری اثرات سوء احتمالی ناشی از تضعیف سیستم ایمنی ماهی ها در نتیجه ورود آلاینده های سمی به مزارع پرورشی و تاثیر آن بر سیستم ایمنی ماهی ها باشد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات جناب آقای مهندس عاشوری و سرکار خانم مهندس موسوی کارشناسان آزمایشگاه شیلات دانشگاه تهران قدردانی می گردد.

## منابع

ابراهیم زاده موسوی، ح. ع.، شریف روحانی، م.، خسروی، ع.، مهرابی، ی. و آخوندزاده بستنی، ا. ۱۳۸۵. ارزیابی کاربرد اسانس اوکالیپتوس (*Eucalyptus camaldolensis* Dehnh) در کنترل آلودگی های قارچی تخم ماهی قزل آلا رنگین کمان. مجله گیاهان دارویی، ۵(۲۰): ۴۲-۴۷.

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

بنایی، م.، میرواقفی، ع. ر.، احمدی، ک.، بنایی، س. ۱۳۸۷. تعیین LC<sub>50</sub> (*Cyprinus carpio*).

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

حسینی، م. ۱۳۸۴. بررسی مقدار باقیمانده حشره کش های مصرفی فسفره در آب رودخانه های کر و سیوند و آب های زیرزمینی و محصول غالب (خیار) در زیر حوزه آنها در سال های ۸۴-۸۳. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران.



- خوش باوررستمی، ح.ع. و سلطانی، م. ۱۳۸۴. بررسی تاثیر سمیت حاد دیازینون بر روی شاخصهای خونی ماهی شیپ *Acipenser nudiventris* و تعیین میزان LC50. مجله علمی شیلات ایران، ۱۴(۳): ۶۰-۴۹.
- خوش باوررستمی، ح.ع.، سلطانی، م. و یلقی، س. ۱۳۸۴. اثر سم دیازینون روی شاخص های خونی ماهی خاوباری ازون برون (*Acipenser stellatus*) و تعیین LC50. علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۲(۵): ۱۰۸-۱۰۰.
- سلسله، م. ۱۳۸۰. بررسی و تعیین مقدار حشره کش های مصرفی فسفره در آب رودخانه های استان مازندران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
- طراحی تبریزی، س. ۱۳۸۱. بررسی و تعیین مقدار حشره کش های مصرفی (دیازینون، مالاتیون و متاسیستوکس) در آب رودخانه سهند تبریز. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
- قمیسی، ع. ۱۳۸۳. بررسی و تعیین مقدار حشره کش های مصرفی دیازینون و مالاتیون در آب رودخانه کرج. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
- هنرپژوه، س. ک. ۱۳۸۳. بررسی و تعیین مقدار حشره کش های فسفره (دیازینون، مالاتیون و آزینفوس متیل) در آب رودخانه های سیمینه رود. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
- Ahmadi, K., Banaee, M., Rad, E. & 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*. *Tht 15<sup>th</sup> National & Third international conference of biology*. University of Tehran.
- Borsari, M., Gabbi, C., Ghelfi, F., Grandi, R., Saladini, M. & Severi, S. 2001. Silybin, a new iron-chelating agent. *J. Inorg, Biochem*, 85:123-9.
- Desplaces, A., Choppin, J. & Vogel, G. 1975. The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning. *Arzneimittelforschung*, 25: 89-96.
- Dietzmann, J., Thiel U., Ansorge, S., Neumann, K.H. & Tager, M. 2002. Thioli inducing and immunoregulatory effects of flavonoids in peripheral blood mononuclear cells from patients with end-stage diabetic nephropathy. *Free Radic. Biol. Med.*, 33:1347-54.
- Droge, W. & Breitkreutz, R. 2000. Glutathione and immune function. *Proc. Nutr. Soc.*, 59:595-600.
- Flescher, E., Ledbetter, J. & Schieven, G. 1994. Longitudinal exposure of human T lymphocytes to weak oxidative stress suppresses transmembrane and nuclear signal transduction. *J. Immunol.*, 153: 4880-9.
- Fiebrich, F. & Koch, H. 1979. Silymarin, an inhibitor of lipoxygenase. *Experienta.*, 35: 1548-1560.
- Janiak, B. 1974 Depression of microsomal activity in the liver of mice following single administration of halothane and its influencibility by silybin. *Anaesthesist*, 23: 389-3993.
- Kazi, N., Radvany, R. & Oldman, T. 1997. Immunomodulatory effect of  $\beta$ - carotene on T lymphocyte subsets in patients with resected colonic polyps and cancer. *Nut. cancer*, 28: 140-5.
- Kee-Ching, G. J, Chang-Shi, Y. & Wai-Yi, S. 1996. Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults. *Nutr.*, 64: 960-5.

- Krecman, V. Skottova, N., Walterova, D., Ulrichova, J. & Simanek, V. 1998. Silymarin inhibits the development of diet –induced hypercholesterolemia in rats. *Planta Med.*, 64: 138-142.
- Lang, I., Deak, G., Nekam, K., Muzes, G., Gonzalez-Cabello, R. & Gergely, P. 1988. Hepatoprotective and immunomodulatory effects of antioxidant therapy. *Acta Med. Hung.*, 45:287–95.
- Lirussi, F. & Okolicsanyi, L. 1992. Cytoprotection in the nineties: experience with ursodeoxycholic acid and silymarin in chronic liver disease. *Acta, Physiol. Hung.*, 80: 363-367.
- Locher, R., Suter, P. M., Weyhenmeyer, R. & Vetter, W. 1998. Inhibitory action of silibinin on low density lipoprotein oxidation. *Arzneimittelforschung*, 48: 236-239.
- Muriel, P. & Mourelle, M. 1990. Pervention by silymarin of membrane alterations in acute CCL4 liver damage. *J. Appl. Toxicol.*; 10: 275-279.
- Naghdi Badi, H. & Makizadeh Tafti, M. 2007. A review on Thymus species. *Journal of Medicinal Plants*, 7: 1-13.
- Poortmans, J. R. 1987. Serum protein determination during short exhaustive physical activity. *Journal of Applied physiology*, 30: 190-192.
- Saunders, B.C. 1973. Peroxidases and catalases, in: *Inorganic Biochemistry*, G.L. Eichhorn (Ed.) Elsevier, Amsterdam.
- Stites, D. P. 1991. *Basic and clinical immunology*. Lange Medical Book. USA.
- Townsend, DM., Tew, K.D. Tapiero. H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother*, 57:145–55.
- Üner, N., Oruç, E. Ö., Sevgiler, Y., Şahin, N., Durmaz, H. & Usta, D. 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21: 241–245.
- Valenzuela, A. & Garrido, A. 1994. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biol. Res.*, 27:105–12.
- Velussi, M., Cernigoi, A. M., Viezzoli, L., Dapas, F., Caffau, C. & Zilli, M. 1993. Silymarin reduces hyperinsulinemia, malondialdehyde levels and daily insulin needs in cirrhotic diabetic patients. *Current Therapeutic Research*, 53: 533-545.
- Zhang, J. Q., Mao, X. M. & 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: 708-726.
- Zi, X., Feyes, D. K. & 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: 1055-1064.
- Zima, T., Kamenikova, L., Janebova, M., Buchar, E., Crkovska. T. & Tesar, V. 1998. The effect of silibinin on experimental cyclosporine nephrotoxicity. *Renal Failure*, 20: 471-479.
- Zou, C. G., Agar, N. S. & Jones, G. L. 2001. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. *Life. Sci.*, 69: 75-86.