اثرات غلظت‌های تحت کشنده سم دیازینون بر بیان ژن‌های ایمنی (اینترلوکین ۱ و TNF آلفا) در کبد ماهی گورخری (*Danio rerio*)

معصومه درویشی*، رقیه صفری

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*نویسنده مسئول: m_darvishi_m71@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۱۸

چکیده

دیازینون یکی از پر مصرف‌ترین آفت‌کش‌های ارگانوفسفریک مورد استفاده در کشاورزی می‌باشد و می‌تواند بر سیستم ایمنی تاثیر بگذارد. بنابراین در این مطالعه اثر غلظت‌های تحت‌کشنده سم دیازینون (شاهد، ۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر) بر بیان ژن‌های ایمنی (IL1-TNFalfa) در کبد ماهی گورخری در پایان دوره ۳۰ روزه مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور نمونه‌برداری از هر تیمار در پایان دوره انجام شد. پس از استخراج RNA از بافت کبد و سنتز cDNA با استفاده از کیت Suprime ScriptRTase، سنجش بیان ژن اینترلوکین ۱ و TNF آلفا با استفاده از روش Real Time PCR انجام شد. نتایج نشان داد که بیان نسبی ژن‌های ایمنی (IL1 و TNFalfa) در تمام تیمارهای مورد بررسی در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری یافت. هم‌چنین بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه روند وابسته به غلظت را نشان داده و با افزایش غلظت از ۰/۸ به ۱/۶ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر، میزان بیان ژن به‌ترتیب به ۳/۷، ۳/۹ و ۶/۶ برابر کنترل در TNFalfa و ۳/۹۶، ۴/۶ و ۵/۱ برابر کنترل در IL1 افزایش یافت. نتایج نشان داد که هر دو ژن فاکتور تومور نکروز شونده و اینترلوکین در سطح مولکولی می‌توانند به‌عنوان پاسخ‌های اولیه سلولی، شاخص موثری در پایش تغییرات اکوتوکسیکولوژی در نظر گرفته شوند.

واژگان کلیدی: ماهی زبرا، آلودگی، سیستم ایمنی، ژنتیک.

مقدمه

مواد تخریب‌کننده غدد درون‌ریز (EDC = Endocrine Disrupting Chemical) در محیط آبزی، از جمله ترکیبات طبیعی و صنعتی، به‌دلیل توانایی قوی آن‌ها در دخالت در سیستم غدد درون‌ریز در طول زندگی آبزیان تبدیل به یکی از نگرانی‌های زیست محیطی شده‌اند (Xu *et al*., 2013). سم دیازینون یکی از مهترین سموم ارگانوفسفره است که به طور گسترده در باغ‌ها و مزارع کشاورزی کشور به ویژه در منطقه استان گلستان استفاده می‌شود و در گستره‌ی وسیعی از آبزیان از جمله ماهی‌ها، پستانداران و بی‌مهرگان آبزی تاثیرات مخربی برجای می‌گذارد (Kuivila and Foe, 1995). مکانیسم اصلی این سم ارگانوفسفره مهار آنزیم استیل‌کولین-استراز می‌باشد که در نهایت سیستم عصبی مرکزی و محیطی را تخریب می‌کند. دیازینون همچنین جزء عوامل آلکیله کننده می‌باشد که با ماکرومولکول‌های اصلی سلول از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و از این طریق عملکرد آن‌ها را تغییر می‌دهد (فتاحی و همکاران، ۱۳۸۹).

ماهی‌ها به‌طور مستقیم در معرض مواد شیمیایی سمی در محیط‌های آبزی هستند. اثرات نامطلوب مواد شیمیایی بر قابلیت‌های سیستم ایمنی بدن می-تواند بر رشد، توسعه و بقا و در نهایت بر ثبات جمعیت ماهی نیز تاثیر گذارد (Zelikoff *et al*., 2002; Segner *et al*., 2012). همچنین ماهی‌ها اولین گروه مهره‌دارنی هستند که دارای سیستم ایمنی ذاتی می‌باشند. سیستم ایمنی ذاتی اولین خط دفاعی را در برابر عوامل مهاجم خطرناک فراهم می-کند و یک پیش‌نیاز برای تقویت پاسخ ایمنی انطباقی است (Xu *et al*., 2013). ایمنی ذاتی ماهی پیچیده است و مکانیسم‌های مختلفی دارد که علیه طیف وسیعی از بیماری‌ها عمل می‌کنند. یکی از این سیستم‌ها، خانواده‌ی سیتوکین است که شامل چندین گروه از پلی‌پپتیدهای ساده یا گلیکوپروتئین-ها مانند فاکتور نکروزکننده تومور آلفا (TNF-alfa)، اینترفرون‌ها (IFNs) و اینترلوکین‌ها می‌باشد. این فاکتورها در سیستم ایمنی ذاتی دخیل هستند و واکنش‌های ایمنی تطبیقی را القا می‌کنند (Yarahmadi *et al*., 2016). فاکتور ناباروری تومور

یک سیتوکین ضدالتهابی است که از طریق ماکروفاژ نفوذپذیر و سلول‌های کلیوی مجاور در طول محرک-های پاتولوژیک منتشر می‌شود (Summers *et al*., 2012). سیتوکین‌ها و کیموکین‌ها، مولکول‌های اثر گذار پاسخ ایمنی ذاتی، برای ایجاد حالت التهابی حیاتی در ریشه‌کن کردن پاتوژن از سلول‌های میزبان ضروری هستند. این مولکول‌ها همچنین به‌عنوان کمپلکس‌های شیمیایی برای اجزای سلولی سیستم ایمنی ذاتی، یعنی ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها عمل می-کنند (Thelen, 2001; Zhang and Huang, 2006). این سلول‌های ایمنی موجب تخریب پاتوژن توسط فاگوسیتوز و تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) می‌شوند که یک مکانیزم ضروری شناخته-شده به‌عنوان انفجار تنفسی است. انتشار ROS یکی از دلایل ضروری برای تخریب سلول‌های ایمنی می-باشد. علاوه بر این، مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ROS میتوکندری به‌عنوان مولکول‌های سیگنال برای تولید سیتوکین‌های ضد التهابی در سلول‌ها عمل می‌کند (Xu *et al*., 2013).

مطالعات مختلفی از جمله مطالعه‌ی بنایی و همکاران (۱۳۸۷)، خوش باور رستمی و همکاران (۱۳۸۴) و Ahmadi و همکاران (۲۰۰۸) بر کپور ماهی (*Cyprinus carpio*)، اوزون برون (*Acipenser stellatus*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تضعیف سیستم ایمنی ماهی‌های در معرض آلودگی با سم دیازینون را نشان داده‌اند. در واقع رادیکال‌های آزاد تولید شده ناشی از متابولیسم این سم می‌تواند در سیستم بیولوژیک آبزیان بسیار خطرناک و جدی باشد (ربیعی، ۱۳۹۶). بنابراین تلاش شده است که بیومارکرهای سمیت زیستی در ماهیان برای بررسی و پیش‌بینی آسیب-های سم شناختی آلاینده‌های آبی مختلف بررسی شود (Xu *et al*., 2013). در حال حاضر ماهی گورخری به دلیل اندازه کوچک، هزینه کم غذا، چرخه آزمون کوتاه و تکثیر آسان، برای آزمایش سمیت حاد و مزمن (Ali *et al*., 2011) و ارزیابی کیفیت آب (Hallare *et al*., 2005; Liao *et al*., 2012) به‌عنوان گونه مدل استفاده می‌شود. همچنین جنین‌های شفاف و در دسترس بودن توالی کامل ژنوم، مطالعات بیشتری را در مورد مکانیزم‌های سم-شناسی در سطح مولکولی برای گونه‌های ماهیان تسهیل می‌کند (Zheng *et al*., 2016). با توجه به این‌که مطالعه‌ای در زمینه اثر سم دیازینون بر بیان ژن‌های ایمنی (IL1 و TNFalfa) در ماهی گورخری صورت نگرفته است، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر این آلاینده بر سیستم ایمنی صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

ماهی: در این آزمایش جهت بررسی بیان ژن‌های ایمنی (IL1 و TNFalfa)، بچه ماهیان گورخری ماده با سن حدود ۲ ماه و میانگین وزنی ۰/۱۵±۰/۰۱ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی شصت‌کلا خریداری و به سالن آبزی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ماهیان برای سازگاری با شرایط آزمایشگاهی به‌مدت ۲ هفته در آکواریوم پرورش و نگهداری شدند. بعد از ۲ هفته ماهی‌ها با تراکم ۴۵ قطعه در هر آکواریوم شیشه ای ۲۵۰ لیتری که ۲۵ لیتر از آن آب‌گیری شده بود، به‌طور تصادفی در ۴ تیمار و ۳ تکرار رهاسازی شدند. به‌منظور هوادهی آکواریوم ها از سنگ هوا و تنظیم دمای آب در ۲۶ درجه سانتی‌گراد از هیتر برقی استفاده شد. میانگین pH آب ۸/۳ بود. برای تغذیه ماهی‌ها از غذای بیومار (فرانسه) استفاده شد که مقدار آن براساس ۴ درصد میانگین وزنی ماهی محاسبه و در ۵ نوبت به‌طور روزانه غذادهی شدند.

مشخصات تیمارها و مدت انجام تحقیق: در روز اول شروع تحقیق تزریق سم درون آب انجام شد و هر ۴۸ ساعت یکبار ۹۰ درصد از آب آکواریوم تعویض (Di Giulio and Hinton, 2008) و سم تجدید شد. میزان LC_{50} برای سم دیازینون پس از انجام تست LC_{50} روی گونه ماهی گورخری، ۱۶میلی‌گرم بر لیتر (درویشی و همکاران، منتشر نشده) در نظر گرفته شد که میزان ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد از LC_{50} مورد نظر برای تیمارها استفاده شد. به‌عبارت دیگر تیمار اول صفر میلی‌گرم بر لیتر، تیمار دوم ۵ درصد LC_{50}= ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر، تیمار سوم ۱۰ درصد LC_{50} = ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار چهارم ۲۰ درصد LC_{50} = ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر بود.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه (Safari *et al.*, 2016).

نام پرایمر	توالی	دمای اتصال (°C)	کاربرد	شماره دسترسی
TNF-a q-PCRF	CTGCTTCACGCTCCATAAGA	58	Immune	AY427649.1
TNF-a q-PCRR	CTGGTCCTGGTCATCTCTCC			
IL-1b q-PCRF	CGTCTCCACATCTCGTACTCA	58	Immune	AY340959.1
IL-1b q-PCRR	GTGTCTTTCCTGTCCATCTCC			
b-Actin q-PCRF	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	58	Housekeeping gene NM_	131031.1
b-Actin q-PCRR	TACCTCCCTTTGCCAGTTTC			

نمونه‌برداری: در پایان دوره ۳۰ روزه پس از بیهوشی، از بافت کبد ماهی‌های ماده به منظور بررسی ژن‌های ایمنی (IL1 و TNFalfa) نمونه-برداری و هر کدام به تیوپ‌های جداگانه منتقل شدند و بلافاصله در تانک ازت قرار گرفتند. در پایان نمونه-برداری تیوپ‌های حاوی نمونه تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰ـ نگهداری شدند.

استخراج RNA: به‌منظور استخراج RNA از پروتکل کیت بایوزول طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Biozol- Bioflux- Bioer) استفاده شد و نمونه ها در فریزر ۸۰- قرار گرفتند. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگاروز انجام شد.

سنتز cDNA: برای سنتز cDNA از کیت Superscript RTase استفاده شد. بدین صورت که ۵µl از RNA که قبلاً آماده شده بود به‌همراه ۱ µl آغازگر الیگو به تیوپ‌های جدید اضافه و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ µl رسید. سپس بر روی بلوک حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه انکوبه گردید و بعد از آن بر روی یخ انتقال داده شد. ۱۰µl مستر حاوی آنزیم ریورس ترانسکریپتاز به آن اضافه و در نهایت با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس محلول حاوی c DNA به حجم ۲۰ µl به دمای ۸۰- منتقل شد.

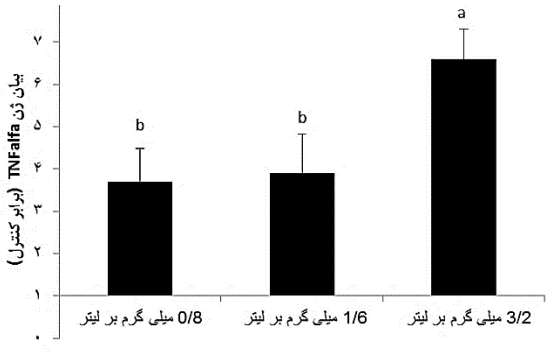
واکنش Real_time PCR: واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز کمی با استفاده از کیت سایبر شرکت بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی) در دستگاه iQ5 شرکت (BIO-RAD, USA) در ۴ تکرار تکنیکی در حجم ۲۰ میکرو لیتر با استفاده از ۱۰ µl بافر سایبر گرین، ۱ µl آغازگر پیشرو ژن هدف و رفرنس (۱۰ پیکومول)، ۱ µl آغازگر پسرو ژن هدف و رفرنس (۱۰ پیکومول)، ۲/۸ µl آب مقطر، ۰/۲ µl آنزیم تگ پلیمراز (۵U) و ۵ µl cDNA رقیق‌شده (۲ نانوگرم در میکرولیتر) در دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد (جدول ۱).

تجزیه و تحلیل داده‌های آنالیز کمی qPCR: تغییرات نسبی بیان ژن‌های TNF-alfa و IL-1 با استفاده از روش ΔΔCt محاسبه گردید (Livak and Schmittgen, 2001). سپس نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولوموگروف-اسمیرنوف تست شد و آزمون لون نیز جهت بررسی برابری واریانس‌ها مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز داده‌های توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه صورت گرفت. مقدار خطای نوع اول ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به-صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شد آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 16) انجام شد.

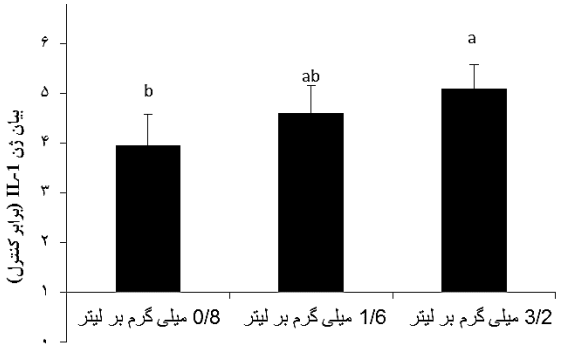
نتایج

بیان ژن TNF-alfa: ارزیابی بیان ژن TNF-alfa افزایش بیان این ژن را در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون نسبت به گروه کنترل نشان داد. به¬این صورت که در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون ۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر میزان بیان ژن به-ترتیب ۳/۷، ۳/۹ و ۶/۶ برابر گروه کنترل بود که الگوی افزایش وابسته به دوزی را نشان می‌دهد. اختلاف معنی‌داری در میزان بیان در تیمار ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر با دو گروه ۰/۸ و ۱/۶ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل ۱).

بیان ژن IL-1: ارزیابی بیان ژن IL-1 افزایش بیان این ژن را در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون نسبت به گروه کنترل نشان داد. در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون ۰/۸، ۱/۶ و ۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر



شکل ۱ - میانگین (± انحراف معیار) بیان ژن TNF-alfa در برابر کنترل در بافت کبد ماهی گورخری در مواجهه ۳۰ روزه با غلظت‌های مختلف سم دیازینون.



شکل ۲ - میانگین (± انحراف معیار) بیان ژن IL-1 در برابر کنترل در بافت کبد ماهی گورخری در مواجهه ۳۰ روزه با دوزهای مختلف سم دیازینون.

میزان بیان ژن به ترتیب ۳/۹۶، ۴/۶ و ۵/۱ برابر گروه کنترل بود که الگوی افزایش وابسته به دوزی را نشان می‌دهد. اختلاف معنی‌داری در میزان بیان در تیمار ۳/۲ میلی گرم بر لیتر با دو گروه ۰/۸ و ۱/۶ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل ۲).

بحث

ایمنی سازوکار مهم فیزیولوژیکی حیوانات برای محافظت در برابر عفونت‌ها و تأمین تعادل و هموستاز داخلی می‌باشد که ممکن است به‌صورت غیراختصاصی و یا اکتسابی باشد. مهم‌ترین بخش در سیستم دفاع ماهی، سیستم ایمنی ذاتی است. این سیستم از دو بخش مهم ایمنی هومورال و سلولی تشکیل شده (Biller- Takahashi and Urbinati, 2014) و پاسخ التهابی صورت گرفته به وسیله سیتوکین‌ها، بخش مهمی از پاسخ ایمنی سلولی در ماهی می‌باشد (Whyte, 2007).

از آن‌جایی‌که که عملکرد اصلی سم دیازینون مهار استیل‌کولین‌استراز است، از طریق این مهار بر سیستم ایمنی از جمله تولید آنتی‌بادی و اینترلوکین-ها تاثیر گذاشته و با تحریک در تکثیر سلول‌های T و افزایش سلول‌های +CD5 و +CD26 احتمالاً در ایجاد بیماری‌های خود ایمنی نقش دارند (Galloway *et al*., 2003). در مطالعه حاضر ارزیابی بیان ژن‌های ایمنی (TNF-alfa و IL-1) افزایش بیان این ژن‌ها را در گروه‌های تیمار شده با سم دیازینون نسبت به گروه کنترل نشان داد. همچنین الگوی افزایش وابسته به دوز مشاهده شد. Xu و همکاران (۲۰۱۳) پاسخ ایمنی ذاتی را در جنین ماهی گورخری پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف بیوسفنل-A و نونیل فنل مورد بررسی قرار دادند که در این بررسی رونویسی ژن‌های مربوط به پاسخ ایمنی از جمله IFNg، IL1b، IL10، Mx، TNFa، CC-chemokine و CXCL-clc به‌طور قابل ملاحظه‌ای تحت‌تأثیر قرار گرفتند. همچنین بیسفنل S (BPS) و بیسفنل F (BPF) در جنین‌های ماهی گورخری منجر به تحت‌تأثیر قرار دادن بیان ژن‌های مربوط به ایمنی حتی در غلظت‌های پایین (۱ میلی‌گرم بر لیتر) شدند (Qiu *et al*., 2018). همچنین بررسی اثرات سمی Thifluzamide در ماهی گورخری اثرات منفی در ساختار و عملکرد آنزیمی میتوکندری را نشان داد که این ممکن است منجر به اختلال در عملکرد ژن‌های مرتبط با آپتوپوز و ایمنی شود (Yang *et al*., 2016). افزایش بیان ژن‌های فاکتور نکروز کننده تومور آلفا (TNF- alfa)، اینترلوکین ۸ (IL-8) و Lyz در ماهی گورخری در مواجهه با فلزات سنگین مس و کادمیوم و افزایش بیان ژن Lyz در مواجهه با سموم بیسفنل-A و تتراکلرو دی‌بنزودیوکسین (TCDD) در مطالعه Su و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده شد. همچنین کاهش قابل توجه بیان ژن‌های اینترلوکین ۸، فاکتور نکروز کننده تومور آلفا و اینترلوکین-b1 در کبد ماهی‌های نر گورخری و اینترلوکین ۸ در کبد ماده‌ها پس از مواجهه با جیوه در مطالعه‌ی Chen و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده شده که نشان‌دهنده مهار فرآیندهای التهابی می‌باشد. در مطالعه‌ی Nakayama و همکاران (۲۰۰۸) اینترلوکین ۸ در کلیه های ماهی *Paralichthys olivaceus* پس از مواجهه با نفت سنگین افزایش

یافت. افزایش میزان اینترلوکین ۸ می‌تواند یک پاسخ دفاعی علیه عفونت باکتریایی باشد، زیرا تعداد باکتری‌ها در موکوس پوست همان ماهی افزایش یافته بود (Song *et al*., 2008). Chen و همکاران (۲۰۰۵) نیز گزارش کردند که عفونت باکتریایی موجب تحریک mRNA اینترلوکین ۸ در طحال گربه ماهی *Ictalurus punctatus* و *I. furcatus* می‌شود. قرار گرفتن ماهی گورخری در معرض آرسنیک، نشان دهنده کاهش ۲/۵ تا ۴ برابر بیان ژن‌های فاکتور نکروزکننده تومور و اینترلوکین ۱ در مطالعه‌ی Nayak و همکاران (۲۰۰۷) بود.

فاکتور نکروزکننده تومور و اینترلوکین ۱ از سیتوکین‌های مهم مکانیسم دفاعی میزبان در پاسخ به استقرار و یا حمله پاتوژن‌ها هستند (Scapigliati *et al*., 2011). فاکتور نکروز کننده تومور جزئی از یک خانواده بزرگ، شامل حداقل ۱۵ پروتئین است که اعمال مختلفی داشته و در ارتباط با حداقل ۲۴ پذیرنده متفاوت می‌باشند. این فاکتور به‌صورت یک پیش پپتید ساخته می‌شود و سپس در درون سلول، به‌وسیله یک آنزیم مبدل فاکتور نکروز کننده تومور آلفا (TACE) پردازش شده، به فرم بالغ خود بدل می‌شود که ترشحی است و ۱۵۷ اسید آمینه طول دارد. فاکتور نکروز کننده تومور آلفا همانند سایر اعضای خانواده خود به‌صورت یک تریمر به پذیرنده‌ی خود متصل می‌شود. این حالت موجب اتصال متقاطع پذیرنده‌ها به‌وسیله لیگاند می‌شود که سپس موجب انتقال پیام به‌درون سلول می‌گردد (کیهانی و همکاران، ۱۳۸۲). هر یک از اعضای این ابر خانواده نقش مهمی در ایمنی دارد که به‌دنبال تحریک سیستم ایمنی از گلبول های سفید ترشح می‌شود و برای عملکرد طبیعی سلول‌های T، سلول‌های کشنده طبیعی، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک حیاتی است (So *et al*., 2006). این فاکتور علاوه بر خون در کلیه نیز به‌میزان زیادی تجمع و ترشح دارد (صفری و همکاران، ۱۳۹۵) و سلول های فاگوسیتیک را برای فرآیندهای وابسته به پروتئین کیناز-C از جمله پاسخ ROSها اولویت بندی می کند (Dewas *et al*., 2003).

تنش بیش از حد و طولانی مدت نیز می‌تواند بر سیستم ایمنی ذاتی در سطح مولکولی و هومورال تاثیر گذار باشد. نتایج مطالعه ی Yarahmadi و همکاران (۲۰۱۶) نشان دهنده سرکوب رونویسی ژن های مرتبط با ایمنی LyzII، TNF-1α، IL-1β، IL-8 و IFN-γ1 و همچنین کاهش برخی از پارامترهای ایمنی هومورال در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) بر اثر تنش بیش از حد می‌باشد که در طولانی مدت از طریق ایجاد هورمون استرس، به‌ویژه کورتیزول، بیان ژن‌های ایمنی و فعالیت آن‌ها را کاهش داده و در نتیجه می‌تواند سیستم ایمنی بدن را مختل کند. به‌طورکلی سیستم ایمنی ماهی از سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های بسیار تخصصی تشکیل شده است که از ارگانیسم‌ها در برابر بیماری‌ها محافظت و یکپارچگی بدن را کنترل می‌کند. هنگامی که ارگانیسم‌ها در برابر مواد سمی قرار می گیرند، اجزای سیستم ایمنی ممکن است تغییر کند. بنابراین عملکرد سیستم ایمنی تعادل را مختل کرده و در نتیجه موجب افزایش ایمنی و یا عدم ایمنی می‌شود (Zhang *et al*., 2016).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سم دیازینون به‌عنوان یک آفت‌کش ارگانوفسفره در غلظت‌های تحت کشنده در مواجه یک ماهه بر سیستم ایمنی در سطح مولکولی تاثیر گذاشت و باعث افزایش بیان ژن-های فاکتور تومور نکروز شونده و اینترلوکین (IL1 و TNFalfa) به‌عنوان مکانیسم‌های دفاعی در غلظت-های مورد مطالعه گردید.

منابع

بنایی م.، میرواقفی ع.ر.، احمدی ک.، بنایی س. ۱۳۸۷. تعیین LC50 و بررسی تاثیر سمیت حاد دیازینون بر روی شاخص های خون شناسی در کپور (*Cyprinus carpio*). مجله پژوهش های علوم و فنون دریایی، شماره ۳، دوره ۲، صفحات: ۱۰-۱.

خوش‌باور رستمی ح.ع.، سلطانی م.، یلقی س. ۱۳۸۴. اثر سم دیازینون روی شاخص‌های خونی ماهی خاویاری ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) و تعیین LC50. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، شماره ۱۲، دوره ۵، صفحات: ۱۰۸-۱۰۰.

ربیعی م. ۱۳۹۶. اثر درمانی تجویز عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مسمومیت تجربی با سم دیازینون. مجله پژوهش های

جانوری، دوره ۳۰، شماره ۳، صفحات: ۳۸۲-۳۷۲.

صفری ر.، مقدم فر س.، ایمانپور م.ر.، شعبانی ع.، جافرنوده ع. ۱۳۹۵. ارزیابی اثرات ناپلی غنی‌شده با ید بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی در ماهی زبرا گورخری. مجله بوم‌شناسی آبزیان، دوره ۶، شماره ۳، صفحات: ۱۰۱-۹۳.

فتاحی ا.، جورسرایی غ.ع.، پریور ک.، مقدم نیا ع.ا. ۱۳۸۹. تاثیر تک دوز دیازینون و هینوزان بر ساختار بافت بیضه و هورمون‌های جنسی در موش‌های آزمایشگاهی. فصلنامه پزشکی یاخته، دوره ۱۲، شماره ۳، صفحات: ۴۱۰-۴۰۵.

کیهانی ع.ح. ۱۳۸۲. مبانی ایمنولوژی. انتشارات راستان، تهران. ۳۸۰ صفحه.

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.* 15th National & Third International Conference of Biology. University of Tehran 294 p.

Ali S., Van Mil H.G., Richardson M.K. 2011. Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. *Plos One* 6, e21076.

Alluwaimi A.M., Hussein Y. 2007. Diazinon immunotoxicity in mice: modulation of cytokines level and their gene expression. *Toxicology* 236, 123-131.

Biller-Takahashi J.D., Urbinati E.C. 2014. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 86, 1484-1506.

Chen L., He C., Baoprasertkul P., Xu P., Li P., Serapion J., Waldbieser G., Wolters W., Liu Z. 2005. Analysis of a catfish gene resembling interleukin-8: cDNA cloning, gene structure, and expression after infection with Edwardsiella ictaluri. *Developmental and Comparative Immunology* 29, 135-142.

Chen Q.L., Sun Y.L., Liu Z.H., Li Y.W. 2017. Sex-dependent effects of subacute mercuric chloride exposure on histology, antioxidant status and immune-related gene expression in the liver of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 188, 1-9.

Dewas C., Dang P.M., Gougerot-Pocidalo M.A., El-Benna J. 2003. TNF-alpha induces phosphorylation of p47 (phox) in human neutrophils: Partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Immunology* 171, 4392-4398.

DeWitt J.C., Peden-Adams M.M., Keller J.M., Germolec D.R. 2012. Immunotoxicity of perfluorinated compounds: recent developments. *Toxicology Pathology* 40, 300-311.

Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. 2008. The Toxicology of Fishes. Taylor and Francis. 1101 p.

Galloway T., Handy R. 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology* 12, 345-63.

Hallare A.V., Pagulayan R., Lacdan N., Köhler H.R., Triebskorn R. 2005. Assessing water quality in a tropical lake using biomarkers in zebrafish embryos: developmental toxicity and stress protein responses. *Environmental Monitoring and Assessment* 104, 171-187.

Kuivila K.M., Foe C.G. 1995. Concentrations, transport and biological effects of dormant spray pesticides in the San Francisco Estuary California. Environmental *Toxicology and Chemistry* 14, 1141-1150.

Liao Y., Xu J.Y., Wang Z.W. 2012. Application of biomonitoring and support vector machine in water quality assessment. *Journal of Zhejiang University Science B* 13, 327-334.

Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method. *Methods* 25, 402-408.

Nakayama K., Kitamura S.I., Murakami Y., Song J.Y., Jung S.J., Oh M.J., Tanabe S. 2008. Toxicogenomic analysis of immune system-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to heavy oil. *Marine pollution bulletin* 57, 445-452.

Nayak A.S., Lage C.R., Kim C.H. 2007. Effects of low concentrations of arsenic on the innate immune system of the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicological sciences* 98, 118-124.

Qiu W., Shao H., Lei P., Zheng C., Qiu C., Yang M., Zheng Y. 2018. Immunotoxicity of bisphenol S and F are similar to that of bisphenol A during zebrafish early development. *Chemosphere* 194, 1-8.

Safari R., Hoseinifar S.H., Kavandi M. 2016. Modulation of antioxidant defense and immune response in zebra fish (*Danio rerio*) using dietary sodium propionate. *Fish Physiology and Biochemistry* 42, 1733-1739.

Scapigliati G., Buonocore F., Bird S., Zou J., Pelegrian P., Falasca C. 2011. Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 beta. *Fish and Shellfish Immunology* 11, 711-

726.
Segner H., Wenger M., Moller A.M., K€ollner B., Casanova-Nakayama A. 2012. Immunotoxic effects of environmental toxicants in fish - How to assess them? *Environmental Science and Pollution Research* 19, 2465-2476.
So T., Lee S.W., Croft M. 2006. Tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor family members that positively regulate immunity. *International Journal of Hematology* 83, 1–11.
Song J.Y., Nakayama K., Murakami Y., Jung S.J., Oh M.J., Matsuoka S., Kawakami H., Kitamura S.I. 2008. Does heavy oil pollution induce bacterial diseases in Japanese flounder Paralichthys olivaceus? *Marine Pollution Bulletin* 57, 889-894.
Summers S.A., Gan P.Y., Dewage L., Ma F.T., Ooi J.D., O'Sullivan K.M., Nikolic-Paterson D.J., Kitching A.R., Holdsworth S.R. 2012. Mast cell activation and degranulation promotes renal fibrosis in experimental unilateral ureteric obstruction. *Kidney International* 82, 676-685.
Thelen M. 2001. Dancing to the tune of chemokines. *Nature Immunology* 2, 129.
Whyte S.K. 2007. The innate immune response of finfish-a review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 1127-1151.
Xu H., Yang M., Qiu W., Pan C., Wu M. 2013. The impact of endocrine-disrupting chemicals on oxidative stress and innate immune response in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 1793-1799.
Yang Y., Qi S., Wang D., Wang K., Zhu L., Chai T., Wang C. 2016. Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Hazardous Materials* 307, 127-136.
Yarahmadi P., Miandare H.K., Fayaz S., Caipang C.M.A. 2016. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress-and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 48, 43-53.
Zelikoff J.T., Carlson E., Li Y., Raymond A., Duffy J., Beaman J.R., Anderson M. 2002. Immunotoxicity biomarkers in fish: Development, validation, and application for field studies and risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 8, 253-263.
Zhang J.H., Huang Y.G. 2006. The immune system: A new look at pain. *Chinese Medical Journal* 119, 930-938.
Zhang Q.F., Li Y.W., Liu Z.H., Chen Q.L. 2016. Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos larvae. *Aquatic Toxicology* 181, 76-85.
Zheng J.L., Yuan S.S., Wu C.W., Lv Z.M. 2016. Acute exposure to waterborne cadmium induced oxidative stress and immunotoxicity in the brain, ovary and liver of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 180, 36-44.

Effects of sublethal doses of diazinon on the exspression of immune genes (IL1 and TNFalfa) in zebrafish (*Danio rerio*)

Masomeh Darvishi*, Roghieh Safari

Department Aquaculture, Faculty Fisheries and the environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
*Corresponding author: m_darvishi_m71@yahoo.com
Received: 2019/3/10 Accepted: 2019/5/8

Abstract
Diazinon is one of the most important organophosphoric pesticide used in agricultural fields and can effect on immune system. In this study, the effects of sub lethal doses of diazinon (0.8, 1.6 and 3.2 mg/l) on the expression of immune genes (TNFalfa and IL-1) in the liver of zebrafish (*Danio rerio*) were assessed during 30 days. For this purpose, sampling were done from each treatment at the end of trail. RNA extracted from liver, cDNA synthesized using Suprime ScriptRTase kit and genes expression was assayed using Real-time PCR. The result showed that relative expression of both studied genes significantly increased (P<0.05) in all studied treatments compared to control group. The amount of both studied gene expression was increased in the highest dose and amount of expression was 3.7, 3.9 and 6.6 fold of the control in TNFalfa and 3.96, 4.1 and 5.1 fold of control in IL-1. The results showed that TNFalfa and IL-1 in molecular level as the first cellular response, could be considered as an effective factor for monitoring of ecotoxicological alternations.

Keywords: Zebrafish, Pollution, Immune system, Genetic.