



مقاله پژوهشی

Available Online: <http://jmst.kmsu.ac.ir>



## بررسی تغییرات مرفولوژیکی سلول های کشت داده شده ی کبدی در معرض آلایندگی بنزوآلفاپایرن در ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)

نگین درخشش<sup>۱\*</sup>، عبدالعلی موحدی نیا<sup>۲</sup>، نگین سلامات<sup>۱</sup>، محمود هاشمی تبار<sup>۳</sup>، وحید بیاتی<sup>۳</sup>

۱. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

۲. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و محیطی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.

۳. گروه آناتومی و جنین شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی خلیج فارس، دانشگاه جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [negin.biology@gmail.com](mailto:negin.biology@gmail.com)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۲۸

تاریخ بازنگری: ۱۳۹۴/۱۱/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۲۰

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22113/JMST.0621.151304

### چکیده

کبد یکی از مهم ترین اندام های بدن جانوران محسوب می شود که به عنوان اندام سم زدا و پالایشگر سموم بدن شناخته می شود و در اغلب مطالعات توکسیکولوژیک به عنوان اندام هدف مورد استفاده قرار می گیرد. برای انجام این مطالعه، از ۸ عدد ماهی هامور معمولی نابالغ (نر و ماده به تعداد مساوی) استفاده شد. سپس ماهی بیهوش و سر آن ها از بدن جدا شد. بدن ماهی توسط الکل اتانول ۷۰٪ ضد عفونی و پس از جدا کردن بافت کبد، به قطعات ریز تقسیم و توسط آنزیم کلاژناز تیپ ۴ هضم شدند. سلول های کبدی به مدت ۲ هفته در دمای ۳۰ °C و میزان ۲۰٪ (FBS: Fetal bovine serum) به همراه ITS (Insulin- transferin- selenium) کشت داده شدند، سپس دوزهای آلودگی (۱۰۰، ۱۰۰ μM، ۳\*۱۰۰ μM) به نمونه ها اضافه و در زمان های صفر، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت مطالعه شدند. مرفولوژی سلول ها توسط میکروسکوپ معکوس و درصد بقا توسط سنجش MTT (Methyl thiazolyl tetrazolium: متیل تiazول تترازولیوم) ارزیابی گردید. آنالیز مرفولوژی نشان داد که دوز 100 μM موجب القا ۵۰ درصد مرگ سلولی می شود و به کارگیری غلظت های پایین آلایندگی بنزوآلفاپایرن طی تیمار ۲۴ ساعت اثر مهار تکثیر وابسته به دوز و زمان داشته و در دوزهای بالاتر باعث لیز شدن سلول ها و نکروزیس می شود.

**واژگان کلیدی:** ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)، تست سمیت، کشت سلولی، سلول های کبدی، بنزوآلفاپایرن

### Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



وارد شده به سلول های بدن جاندار از بافت کبد ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) استفاده شد. بافت کبد از مهم ترین و بزرگ ترین غدد گوارشی جانوران محسوب شده که در فرآیند متابولیسم نقش مهمی را بر عهده دارد. سلول های اصلی پارانشیم کبد، هیپاتوسیت ها (Hepatocyt) هستند. از مهم ترین ویژگی های بافت کبد توانایی سلول های پارانشیمی در سمیت زدایی و خنثی کردن اثر سموم و آلاینده های موجود در محیط می باشد (Benson and Schlenk, 2001; Genten et al., 2009). همچنین، این گروه از ماهیان از خانواده سرانیده (Serranidae) بوده و جز ماهیان غالب و اصلی خلیج فارس محسوب می شوند. با توجه به اینکه، تاکنون مطالعه ای در زمینه ی کشت سلول های ماهیان دریایی در داخل کشور صورت نگرفته و کلیه ی مطالعات صورت گرفته در این زمینه متعلق به ماهیان آب شیرین می باشد (سلامات، ۱۳۸۷). لذا لزوم انجام تحقیق در این زمینه بخصوص در ماهیان بومی دریایی خلیج فارس و دریای عمان بیش از پیش آشکار می گردد. از محدود مطالعات انجام گرفته بر روی ماهی هامور معمولی در خارج از کشور می توان به Chi et al. (1999)، Paraeswaran et al. (2007) و Wen et al. (2008) اشاره نمود.

به طور کلی، هدف از بررسی این مطالعه، کشت سلول های هیپاتوسیت کبدی در ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) و بررسی تغییرات مرفولوژیکی ایجاد شده در سلول ها در زمان مواجهه با آلاینده ی محیطی بنزوالفاپایرن در شرایط آزمایشگاهی می باشد، که تا به حال در هیچ مطالعه ایی بررسی آن انجام نگرفته است

## ۲. مواد و روش

در این مطالعه تعداد ۸ قطعه ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) پرورشی نابالغ و سالم به وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۳۰۰ گرم، به صورت زنده از موسسه تحقیقات علوم شیلاتی واقع در شهرستان ماهشهر (استان خوزستان) گرفته شد و سپس به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی (جندی شاپور) اهواز منتقل گردید. در مرحله ی اول ماهی ها به وسیله ی ماده (۲- فنوکسی اتانول ۰/۲ درصد) (Sigma USA) بیپهوش شده و سر آن ها از بدن جدا شد. سپس به طور کامل توسط الکل اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شدند (Wen et al., 2008). پس از آن، محوطه ی شکمی جاندار توسط قیچی استریل شکافته شد و بافت کبد هر یک از ماهیان به صورت جداگانه و در شرایط کاملاً استریل از بدن جاندار جدا و به لوله ی فالکون ml ۵۰ که حاوی PBS (بافر فسفات سالین: Phosphate-buffered saline) (Sigma USA) (۴۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۴۰۰ واحد در میلی لیتر استرپتومایسین) بود، منتقل شد. پس از شست و شو اولیه ی نمونه ها در بافر، سلول های کبدی با استفاده از قیچی به قطعات کوچک 1cm تقسیم شدند و

امروزه اهمیت بررسی اثرات آلاینده در موجودات آبی به موضوع مهمی در مطالعات زیست محیطی منجر شده است که اثرات بالقوه آن بر سلامت آبزیان نیز مشاهده شده است. هنگامی که موجود در معرض عوامل آلاینده محیطی قرار می گیرد، دچار تغییرات ساختاری و عملکردی می شود. این تغییرات ابتدا در سطح ژن و مولکول رخ می دهد و سپس با پاسخ در سطح سلول، بافت، اندام و کل موجود دنبال می شود (Hinton and Lauren, 1990; Stentiford et al., 2003; Thophon et al., 2003). به طور کلی، اولین مکانی که مواد شیمیایی و زنبیوتیک ها تحت تاثیر خود قرار می دهند، سلول است. این پاسخ های بیولوژیک می تواند به عنوان نشانگرهای زیستی مناسب برای ارزیابی و سنجش وضعیت سلامت ماهی و محیط مورد استفاده قرار گیرند.

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAH: Polycyclic aromatic hydrocarbons) آلاینده هایی هستند که به جهت پایداری و مقاومت بالا در اکوسیستم های دریایی و دارا بودن اثرات شدید و طولانی مدت بر روی بدن موجودات دریایی بیشترین نگرانی را به خود اختصاص داده اند (Dabiri, 2013). در مجموع، بیش از یکصد ترکیب از هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای شناسایی شده است که هم در محیط های دریایی و هم در آب شیرین گزارش شده اند. این ترکیبات بسیار سمی و سرطان زا بوده و یکی از بهترین نمونه های آن برای مطالعه، ترکیباتی نظیر: ۷، ۱۲ دی متیل بنزوالفا آنتراسن (DMBA)، بنزوالفاپایرن و ۳ متیل کلارانتن (MC-3) معرفی شده است. آلاینده ی بنزوالفاپایرن به شکل طبیعی نیز در محیط یافت می شود (Reynaud and Deschax, 2006).

این آلاینده به سرعت توسط اندام های بدن موجودات، جذب شده و قادر است به طور مستقیم از طول غشای پلاسمایی همه انواع سلول ها عبور کرده (Esmaili Sari, 2002) و منجر به ایجاد نکرور و وسیع بافتی در مهره داران شود (Sikkema et al., 1994). اکثر آلاینده ها پایداری شیمیایی بالایی در بدن موجودات زنده دارند (Hellawell, 1986; Rohn et al., 2004). توانایی آبزیان از جمله ماهی ها در جذب مستقیم آلاینده های محیطی و همچنین تجمع نسبتاً سریع این ترکیبات در بافت های بدن آبزیان سبب شده تا این موجودات به عنوان مدل و شاخص مناسبی برای ارزیابی و تخمین آسیب وارد شده به سایر اندام ها مورد استفاده قرار گیرند (Roesijadi and Robinson, 1994; Law, 2003; Di Giulio and Hinton, 2008; Velma and Landis et al., 2011; Tchounwon, 2010). در بیشتر مطالعات صورت گرفته توسط محققین مختلف از مطالعات هیستوپاتولوژیکی به عنوان اندام هدف در بدن جاندار به منظور تخمین میزان آسیب وارد شده، استفاده می گردد (Hinton and Lauren, 1990; Gernhofer et al., 2001; Roy et al., 2006; Van Dyk et al., 2007; Fernandes et al., 2008). بنابراین، در مطالعه ی حاضر نیز به منظور میزان آسیب

سپس در لوله ی فالکونی که حاوی PBS (بافر فسفات سالین) و شامل ۱/۰٪ آنزیم کلاژناز تیپ ۴ بود، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تکان داده شدند. پس از آن به منظور خنثی کردن آنزیم کلاژناز ابتدا از محیط کشت حاوی FBS (سرم جنین گاوی) (Sigma USA) استفاده شد و در نهایت به منظور جدا سازی بهتر سلول ها از یکدیگر از فیلتری با منافذ ۷۰ میکرون استفاده گردید. در مرحله ی بعدی، پلیت های سلولی حاصل ۲ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. در نهایت، سلول ها جهت تکثیر در دمای ۳۰ درجه ی سانتیگراد و در انکوباتور فاقد گاز کربنیک انکوبه شدند. در این مطالعه، به منظور کشت سلول ها از محیط کشت L-15 Leibowitz (Sigma USA) همراه ۲۰٪ FBS (سرم جنین گاوی) به همراه ۱٪ ITS (Sigma USA) و ۱٪ پنی سیلین - استرپتومایسین استفاده شد.

به منظور ارزیابی سمیت سلولی (Cytotoxicity) و ارزیابی اثر آلاینده ها بر محیط کشت، هنگامی که تراکم سلول ها در کف فلاسک به بیش از ۷۰٪ رسید، سلول ها توسط آنزیم تریپسین جدا شده و به منظور ارزیابی تست سمیت در پلیت های ۹۶ چاهکی به تعداد ۳×۱۰<sup>۵</sup> سلول قرار داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در درون انکوباتور قرار گرفتند تا به سلول ها اجازه داده شود که کف فلاسک را پر کنند. پس از اطمینان از پر شدن کف ظرف توسط سلول ها، محیط کشت L-15 جدا شده و با محیط کشت جدید جایگزین شد. محیط کشت جدید حاوی ۱ میلی لیتر از محیط کشت L-15 تازه به همراه DMSO (دی متیل سولفوکسید: Dimethyl sulphoxide) بود. غلظت ترکیبات زنبوبوتیک در DMSO حل می شوند (در واقع دی متیل سولفوکسید مولکول کوچکی است که در چربی ها قابل حل می باشد). بنابراین پس از افزودن بر روی سلول ها به سرعت از غشا سلولی عبور کرده و وارد سلول ها می شود. به علت عدم وجود اطلاعات سم شناسی جاندار در کشت سلولی و فقدان اطلاعات در رابطه با غلظت کشندگی (Inhibitory concentration: IC50) آلاینده ی بنزوالفاپایرن در گونه ی مذکور نیاز به انجام این تست لازم و ضروری به نظر می رسید. لذا در ابتدا دامنه ی غلظت های متفاوت بر اساس مقالات موجود (Zhou et al., 2006; Schirmer et al., 1998; Castano and Becerril, 2004) (حداقل، حداکثر و دامنه ی متوسط) از هر یک از آلاینده ها به صورت جداگانه به محیط کشت وارد شد و سپس میزان زنده ماندن ۵۰٪ از سلول ها در محیط کشت توسط تست MTT محاسبه گردید (Mosmann, 1983). در واقع دوزی از دارو توانایی سیتوتوکسیسیته دارد که قادر به از بین بردن ۵۰٪ از سلول ها باشد که به عنوان دوز IC50 محسوب می شود. به عنوان گروه شاهد نیز از سلول هایی که فاقد محلول DMSO بودند، استفاده گردید. پس از اضافه کردن آلاینده و انکوباسیون پلیت ها، سلول های داخل هر ویال را دو بار با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر

PBS (بافر فسفات سالین) شست و شو داده و ۲۰ میکرولیتر از معرف MTT رقیق شده با PBS با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی گرم به هر خانه از پلیت ها اضافه شد. سپس پلیت ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۰°C درون انکوباتور و در تاریکی قرار گرفتند. سلول های زنده MTT را توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی به کریستال های فورومازان تبدیل می کنند. این روش بر اساس توانایی سلول های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم محلول به فورومازان نامحلول (Formazan) بنا شده است (Kemnitzer et al., 2007). وقتی این ترکیب در محیط محلول نمکی فاقد فنل رد آماده سازی می شود، محلول زرد رنگی می دهد. در واقع این ترکیب در میتوکندری سلول های زنده توسط آنزیم دهیدروژناز احیا شده و به فرم کریستال های فورومازان غیر محلول در سلول های زنده رسوب می کند (Mosmann, 1983). از طرفی سلول هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند، روند احیا MTT را انجام داده که به عنوان سلول زنده در نظر گرفته می شوند (Momeni, 2010). پس از طی مدت زمان لازم (۴ ساعت)، محیط رویی به آرامی تخلیه و به کریستال های فورومازان حاصل محلول DMSO اضافه گردید و با استفاده از سمپلر محیط و سلول ها را به خوبی با یکدیگر مخلوط شدند، تا از وجود دانه های رسوبی در نمونه ها جلوگیری شود و در نهایت جذب نوری سلول های زنده (Optical density) در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شود (Caminade et al., 2006).

لازم به ذکر است که: سلول ها به تعداد لازم درون پلیت های ۲۴ خانه ای کشت داده شدند و پس از مدت زمان تیمار بندی ۶ و ۱۲ و ۲۴ ساعت با دوزهای (۱۰nM، ۱۰۰nM، ۱µM، ۱۰۰M، ۱۰۰۰M، ۱۰۰۰۰M، ۱۰<sup>-۲</sup>، ۱۰<sup>-۳</sup>، ۱۰<sup>-۴</sup>، ۱۰<sup>-۵</sup>، ۱۰<sup>-۶</sup>، ۱۰<sup>-۷</sup>، ۱۰<sup>-۸</sup>، ۱۰<sup>-۹</sup>) می باشند. لازم به ذکر است که: پس از تعیین غلظت IC50، ۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪ از غلظت آلاینده به هر کدام از تیمارها به صورت جداگانه اعمال شد. لازم به ذکر است که در کلیه ی مراحل، سلول ها به طور منظم جهت اطمینان از زنده بودن و چسبیدن به ظرف کشت با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی و شمارش شدند (Romijn et al., 2006). برای انجام این کار، ابتدا میزان ۵۰ میکرولیتر از محتویات چاهک با ۵۰ میکرولیتر از رنگ تریپان بلو مخلوط شده و سپس با استفاده از لام تئوبار سلول های زنده و مرده شمارش شدند. طی فرآیند رنگ آمیزی، رنگ تریپان بلو به داخل سلول های مرده نفوذ کرده و این سلول ها به رنگ آبی درآمدند. درصد زنده ماندن سلول ها از طریق فرمول زیر محاسبه شد.

۱۰۰ \* (( تعداد کل سلول ها (زنده+ مرده) // میانگین تعداد سلول های زنده)).

به منظور رسم نمودارها و جداول از نرم افزار Microsoft office Excell, 2007 استفاده شد. کلیه ی داده های موجود در مطالعه ی حاضر (تعداد سلول ها در تیمارهای مختلف) نیز با ۵

سلول هایی که در معرض دوز کم آلودگی قرر داشتند، نسبت به سایر سلول ها میزان آسیب کم تری را از خود نشان دادند. با افزایش میزان دوز و زمان آلودگی، سلول ها شروع به جدا شدن از کف پلیت نموده و به صورت چند وجهی، دوکی، چروکیده، گرد، شفاف و در مجموع به صورت اشکال نامنظم مشاهده شدند.

در ساعت ۲۴، دوره ی آسیب های سلولی مشاهده شده در گروه تیمار شده با آلودگی بنزوالفاپایرن در کلیه ی تیمارها (۱۰۰ μM، ۲\*۱۰۰ μM، ۳\*۱۰۰ μM) به صورت تغییرات مرفولوژیکی قابل ملاحظه در شکل ظاهری سلول ها مشاهده شد که این ضایعات در تیمار ۳\*۱۰۰ μM بنزوالفاپایرن شدیدتر از تیمار ۱۰۰ μM گزارش شد.

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

با توجه به اینکه، بسیاری از آلاینده ها تمایل به تجمع در کبد را دارند، از اینرو این اندام نسبت به سایر اندام ها در معرض مقادیر بیشتری از آلاینده های محیطی قرار دارد (Health, 1995). به همین دلیل، مطالعه ی تاثیرات سمیت در کبد به عنوان شاخص وضعیت سلامت ماهیان در ارتباط با مقادیر مختلف ترکیبات زنبیوتیک روشی معمول می باشد (Au, 2004). به طور کلی، مطالعات زیادی در رابطه با تاثیر آلاینده های محیطی برروی جانوران آبی در محیط آزمایشگاهی (In vitro) و محیط طبیعی (In vivo) صورت گرفته است. اما در مجموع، تعداد بسیار کمی از این مطالعات در رابطه با تاثیر آلاینده ها بر روی کشت سلول های ماهیان دریایی می باشد (Bruschweiler et al., 1995; Xiao and Liu, 2002; Kamer and Rinkevish, 2011; Taju et al., 2013; Abdul Majeed et al., 2014).

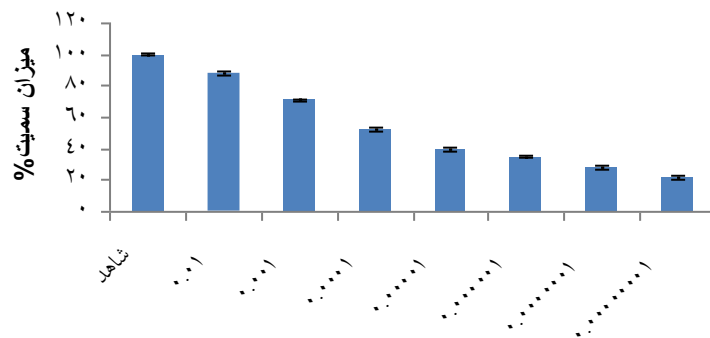
بار تکرار و به صورت میانگین در هر گروه متغییر ارائه شد. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه one-way ONOVA و نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ استفاده شد. در تمام بررسی ها نیز سطح معنی داری  $R < 0.05$  در نظر گرفته شد.

#### ۳. نتایج

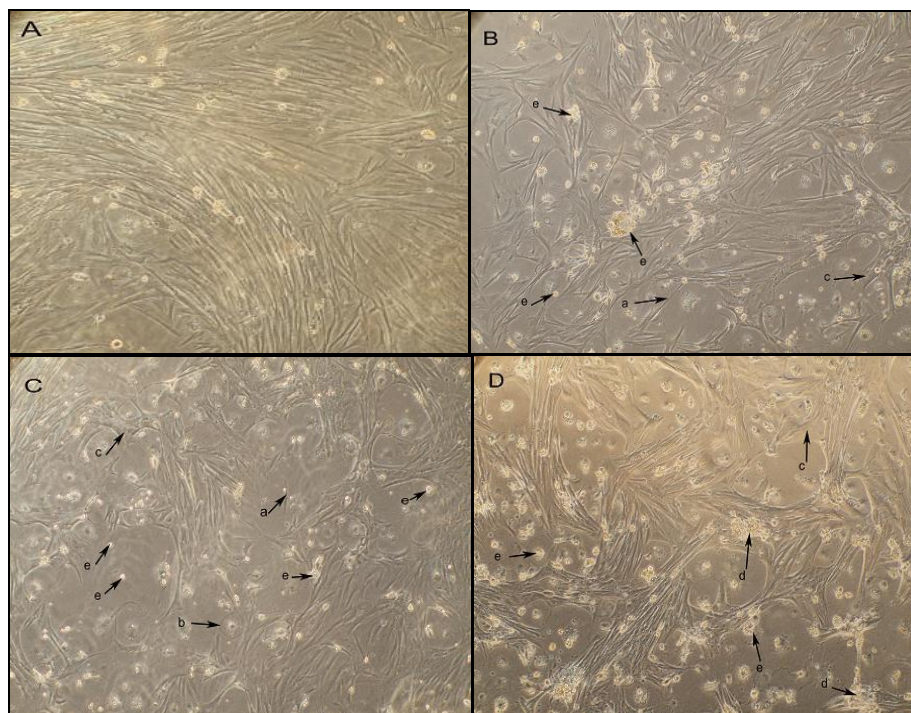
مطابق با نتایج به دست آمده در این مطالعه، میزان تست IC50 برابر با ۱۰۰ μM گزارش شد و در مجموع اختلاف آماری معنی داری در بین غلظت های تحت مطالعه مشاهده شد ( $P < 0.05$ ).

همانگونه که در شکل ۱ نشان داده شده، یافته های به دست آمده از سنجش MTT نشان دهنده ی درصد بقا (Viability) و درصد زنده ماندن سلول ها ی تحت تیمار با آلاینده بنزوالفاپایرن در غلظت های ذکر شده در قسمت بالا در مدت زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد به ترتیب برابر با ۳۱/۹۹۳، ۳۹/۰۰۸، ۴۷/۸۹۵، ۶۰/۵۲۴، ۶۵/۱۰۸، ۶۶/۹۴۱ و ۷۴ به دست آمد. مطابق با نتایج به دست آمده اثر کشندگی سلولی آلاینده ی بنزوالفاپایرن در مدت زمان ۲۴ ساعت وابسته به دوز و زمان می باشد و به طور تقریبی غلظت ۱۰۰ μM از این آلاینده موجب القای ۵۰ درصد مرگ سلولی در سلول ها می شود. در ادامه، سلول های بافت کبدی در زمان های ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت با میزان دز آلاینده های (۱۰۰ μM، ۲\*۱۰۰ μM، ۳\*۱۰۰ μM) تحت مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از این بررسی با میکروسکوپ معکوس و با میزان بزرگنمایی ۱۰۰\* مطالعه شد. در (شکل های ۲، ۳ و ۴) نتایج این بررسی نشان داده شده است.

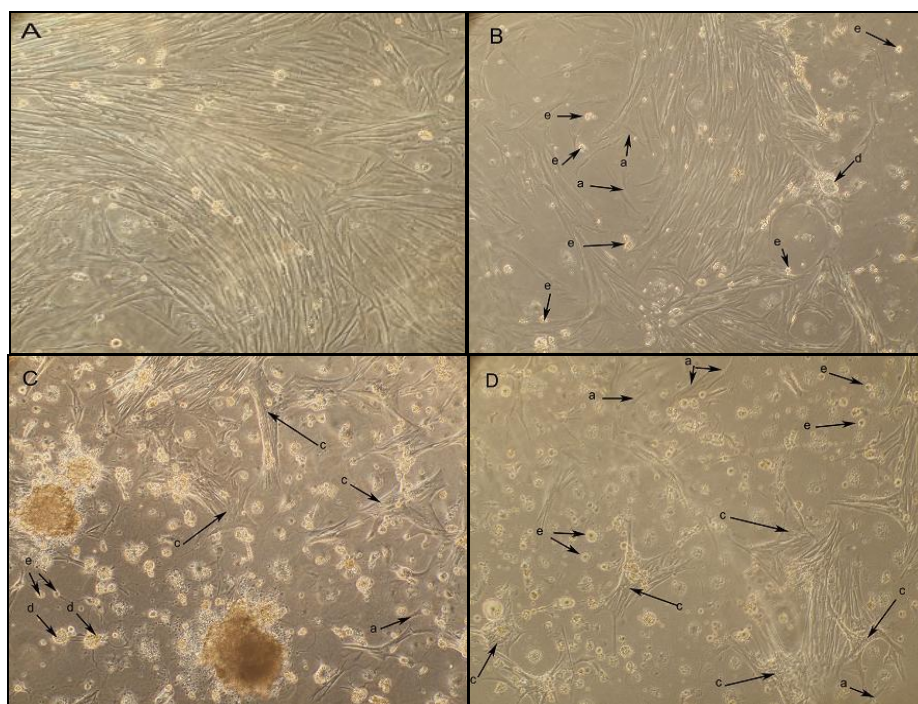
همانگونه که در (شکل های ۳، ۴ و ۵) نشان داده شده است، نمونه های حاوی کشت اولیه سلول های کبدی در گروه شاهد، دارای ساختاری طبیعی و منظم بوده و همگی به شکل سلول های فیبروبلاستی و چسبیده به پلیت های ۲۴ خانه مشاهده شدند.



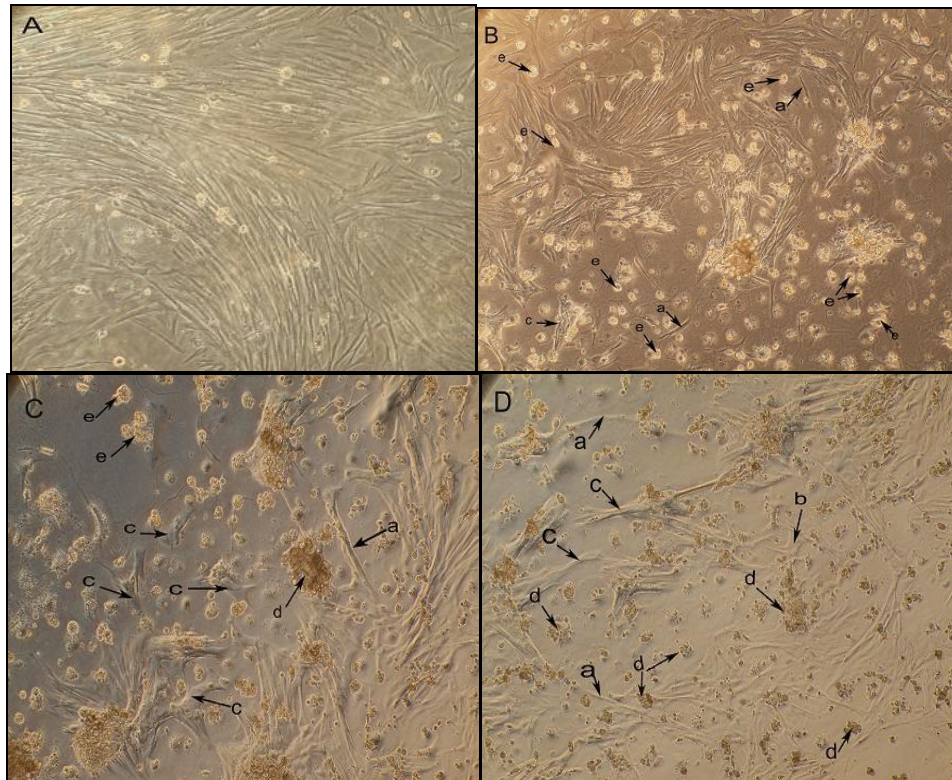
شکل ۱- نمودار میزان بقا سلول ها در غلظت های مختلف آلاینده ی بنزوالفاپایرن (M)



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی از تغییرات مرفولوژیک ایجاد شده در مواجهه با بنزولفاپایرن در تیمار ۱ ( $10^{-10}$  M): A: شکل طبیعی سلول ها، B: سلول های کشت داده شده در ساعت ۶، C: سلول های کشت داده شده در ساعت ۱۲، D: سلول های کشت داده شده در ساعت ۲۴. a: سلول هایی جدا شده از یک مجموعه (Cell detachment)، b: چند وجهی شدن سلول ها (Less polyhedric)، c: دوکی و حجیم شدن سلول ها (More fusiform)، d: چروک شدگی، افت حجمی و جمع شدگی سلول ها (Shrinkage) و e: سلول های گرد شده (Rounded)؛ میکروسکوپ معکوس مقیاس برابر با:  $100\mu\text{m}$



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپی از تغییرات مرفولوژیک ایجاد شده در مواجهه با بنزولفاپایرن در تیمار ۲ ( $10^{-8}$  M): A: شکل طبیعی سلول ها، B: سلول های کشت داده شده در ساعت ۶، C: سلول های کشت داده شده در ساعت ۱۲، D: سلول های کشت داده شده در ساعت ۱۲. a: سلول هایی جدا شده از یک مجموعه، b: چند وجهی شدن سلول ها، c: دوکی و حجیم شدن سلول ها، d: چروک شدگی، افت حجمی و جمع شدگی سلول ها و e: سلول های گرد شده؛ میکروسکوپ معکوس مقیاس برابر با:  $100\mu\text{m}$



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپی از تغییرات مرفولوژیک ایجاد شده در مواجهه با بنزوآلفا پیرن در تیمار ۳ (۱۰<sup>-۵</sup> M). A: شکل طبیعی سلول ها، B: سلول های کشت داده شده در ساعت ۶، C: سلول های کشت داده شده در ساعت ۱۲، D: سلول های کشت داده شده در ساعت ۲۴. a: سلول هایی جدا شده از یک مجموعه، b: چند وجهی شدن سلول ها، c: دوکی و حجیم شدن سلول ها، d: چروک شدگی، افت حجمی و جمع شدگی سلول ها و e: سلول های گرد شده؛ میکروسکوپ معکوس مقیاس برابر با: ۱۰۰µm

افزایش میزان غلظت آلاینده میزان مرگ سلولی نیز افزایش می یابد. وجود اختلاف معنی دار در بین غلظت های مختلف آلاینده تایید کننده ی وجود اختلاف در میزان آلودگی وارد شده به سلول ها است.

آلودگی که در این مطالعه استفاده گردد، بنزوآلفا پیرن از گروه هیدروکربن های آروماتیک حلقوی می باشد که با حل شدن در غشا چرب هیاتوسیت ها منجر به تغییر پذیری در سلول ها و در نهایت پارگی غشا در آن ها می شود (Suresh, 2009). نتایج این فرآیندها در شکل های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

غالب مطالعات صورت گرفته توسط محققین در زمینه ی تاثیر آلاینده ها بر روی سلول ها، به دو عامل زمان قرار گیری موجود و دوز پاسخگویی آن ها و تاثیر همزمان این دو عامل پرداخته شده است (Weber and Janz, 2001). Abdul Majeed et al. (2014) بیان کردند که تغییرات مشاهده شده در مرفولوژی سلول ها وابسته به دوز و زمان قرارگیری در معرض آلاینده ها بوده و میزان آسیب های مشاهده شده در مدت زمان و دوزهای بالاتر، بیشتر از سایر دوزها گزارش شده است. این نتایج بر روی گونه های جانورری مختلف در شرایط و محیط طبیعی نیز تایید شده

در روش کشت سلولی، به منظور شمارش سلول هایی که در معرض عوامل شیمیایی و داروهای سایتوتوکسیک قرار گرفته اند، از آزمایش MTT استفاده می شود. سنجش MTT برای دامنه ی وسیعی از ترکیبات نظیر: آلاینده ها و سموم (Bruschweiler et al., 1995; Borenfreund et al., 1988 Li and Fent and Hunn, 1996) و حشره کش ها (Zhang, 2002) مورد استفاده قرار می گیرد و نتایج حاصل از این آزمایش، توسط رده های سلولی گروه های مختلف جانداران نظیر: پستانداران و آبزبان نیز تایید شده است (Laville et al., 2005; Castano and Gomez-Lechon, 2004). اختلاف زمان، شرایط، جنسیت و اندازه می تواند در میزان MTT سلول ها تاثیر بگذارد (Chae et al., 2009; Taju et al., 2014). Abdul Majeed et al. (2014)، گزارش کردند که با افزایش میزان آلودگی، میزان این تست نیز در غالب رده های سلولی جانوران افزایش می یابد. این نتایج توسط سایر آزمایش های تست سمیت نظیر NR (Neutral red) نیز تایید شده است. سایر محققین نظیر: (Abdul Majeed et al., 2013; Taju et al., 2013) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. به گونه ایی که با

زنده و ایجاد خسارت ناشی از آسیب وارد شده به DNA سلولی استفاده کرد. آن ها در گزارشات خود بیان کردند که سلول هایی که در معرض  $100 \mu\text{M}$  غلظت بیشتری از آلودگی قرار داشتند، دچار بیشترین میزان آسیب به DNA سلولی شده اند که نتایج این گزارشات نشان دهنده ی فرآیند غالب آپوپتوزیس نسبت به نکروزیس در غلظت های بالاتر می باشد که به نظر می رسد در غلظت های بالاتر و افزایش میزان مرگ سلولی این فرآیند سلولی غالب می باشد. (Forth et al., 2001)، نیز در تحقیقات خود گزارش کردند که غلظت زیاد آلودگی می تواند منجر به توقف سنتز DNA، RNA و یا منجر به شکسته شدن زنجیره ی بین آن ها شده و در نتیجه باعث ایجاد تغییرات مرفولوژیک جبران ناپذیری در سلول ها شود. با توجه به اینکه آلاینده بنزوالفایبرن در مدت زمان بسیار کوتاه (۲۴ ساعت) مورد مطالعه، تاثیرات و آسیب های بسیار شدیدی به سلول ها وارد کرده است و برای سلول ها بسیار سمی بوده و با عبور از غشای پلاسمایی سلول ها موجب ایجاد تغییراتی در ساختار و عملکرد آن ها شده و کاهش کارایی عملکرد بافت کبد را در پی داشته است، پیش بینی می گردد که در مدت زمان طولانی تر در مواجهه با این گروه از آلاینده ها شاهد خسارات جبران ناپذیری در بدن جاندار بوده که در نهایت منجر به مرگ جاندار می گردد. همچنین، آسیب های پاتولوژیک وارد شده به سلول های کبیدی در نتیجه مواجهه با آلاینده، ممکن است مانع از فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری و در نتیجه باعث کاهش تولید آدنوزین تری فسفات شده و به این ترتیب مهار فسفوریلاسیون اکسیداتیو در پی تماس با سموم، باعث افزایش مرگ سلولی شود (Banaee, 2011).

### سپاسگزاری

در پایان از بخش آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اهواز و بالاخص آقای مهندس صارمی کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

### References:

- Au, D.W.T., 2004. The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine pollution bulletin*, 48(9-10), pp.817-834.
- Babich, H. and Borenfreund, E., 1991. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review. *Toxicology in vitro*, 5(1), pp.91-100.
- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R. and Ahmadi, K., 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus*

mykiss). *Pesticide biochemistry and physiology*, 99(1), pp.1-6. (In Persian)

است (Poletta et al., 2013). در مطالعه ی حاضر، وسعت ضایعات ایجاد شده در سلول ها (تنها ۶ ساعت پس از نمونه برداری) کم تر از سایر تیمارها گزارش شد. علاوه بر این، در سلول های تیمار شده با کم ترین غلظت آلودگی (تیمار ۱ ( $100 \mu\text{M}$ )) در کلیه ی زمان ها آسیب بسیار کمی در سلول ها مشاهده شد. بنابراین، در هر دو گروه از تیمارها، تغییرات قابل ملاحظه ایی در شکل و ظاهر سلول ها مشاهده نشد. این درحالیست که در غلظت های بالاتر میزان آسیب وارد شده به سلول های کبیدی بسیار شدید تر بود.

در مجموع، با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، می توان بیان کرد که با اعمال هر دو عامل زمان و غلظت آلودگی، شاهد ایجاد تغییرات مرفولوژیکی در شکل و ظاهر سلول ها و ایجاد پدیده هایی نظیر نکروزیس و در مواقع حادثر آپوپتوزیس در سلول ها بوده، به گونه ایی که با وارد کردن غلظت های بیشتر در مدت زمان ۲۴ ساعت (حداکثر زمان مورد مطالعه) تعداد سلول ها کاهش یافته است. در مجموع، فرآیند نکروز، به دلیل عدم توانایی ماهیان برای باز تولید سلول های کبیدی جدید و یا در نتیجه فرآیند سم زدایی بیش از حد کبد در سلول ها رخ می دهد تا در طی عمل سم زدایی، بافت کبیدی سلول های خود را از ترکیبات سمی پاک کند (Ogundiran et al., 2010)، که به نظر می رسد در این مطالعه، عامل دوم و افزایش بیش از حد آلاینده در سلول های کبیدی منجر به ایجاد آسیب و تغییرات مرفولوژیکی در سلول ها شده است. علاوه بر این، سایر مطالعات صورت گرفته در اندام های گوناگون در این زمینه نظیر: رده های سلولی مغزی نیز تایید کننده ی نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر می باشد (Mukhopadhyay et al., 2004).

در این مطالعه، به منظور بررسی تعداد سلول ها از روش شمارش سلولی استفاده و به منظور انجام مقایسه ی تیمارها با یکدیگر از محیط کشت فاقد آلاینده استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق، با افزایش میزان غلظت آلاینده درصد کم تری از سلول ها زنده باقی ماندند. محققین نظیر: Taju et al. (2014) از این روش سلولی برای ارزیابی میزان سلول های

mykiss). *Pesticide biochemistry and physiology*, 99(1), pp.1-6. (In Persian)

- Benson, W. and Schlenk, D., 2001. *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, Volume 1- Organs*. Taylor & Francis.
- Borenfreund, E. and Puerner, J.A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters*, 24(2-3), pp.119-124.
- Brüschweiler, B.J., Würigler, F.E. and Fent, K., 1995. Cytotoxicity in vitro of organotin

- compounds to fish hepatoma cells PLHC-1 (Poeciliopsis lucida). *Aquatic toxicology*, 32(2-3), pp.143-160.
- Caminada, D., Escher, C. and Fent, K., 2006. Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Aquatic toxicology*, 79(2), pp.114-123.
- Castaño, A. and Becerril, C., 2004. In vitro assessment of DNA damage after short-and long-term exposure to benzo (a) pyrene using RAPD and the RTG-2 fish cell line. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552(1-2), pp.141-151.
- Castaño, A. and Gómez-Lechón, M.J., 2005. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: a literature survey. *Toxicology in Vitro*, 19(5), pp.695-705.
- Chae, Y.J., Pham, C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J. and Gu, M.B., 2009. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic toxicology*, 94(4), pp.320-327.
- Chi, S.C., Hu, W.W. and Lo, B.J., 1999. Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases*, 22(3), pp.173-182.
- Dabiri, M., 2013. Environmental pollution (air-water-soil-sound), Etihad Publication. Tehran. 399 p.
- Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E., 2008. *The toxicology of fishes*. Crc Press.
- Esmaili Sari, A., 2002. Pollutants, health and standards in the environment. Naqsh Mehr Publishing, Tehran. 767 p.
- Fent, K. and Hunn, J., 1996. Cytotoxicity of organic environmental chemicals to fish liver cells (PLHC-1). *Marine Environmental Research*, 42(1-4), pp.377-382.
- Fent, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in vitro*, 15(4-5), pp.477-488.
- Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Rocha, E. and Salgado, M.A., 2008. Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: Liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 145, pp.315-322.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. and Starke, K., 2001. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Aufl. München: Urban und Fischer*.
- Genten, F., Terwinghe, E. and Danguy, A., 2009. Atlas of fish histology. Science publisher, 92-98, 215p.
- Gernhöfer, M., Pawert, M., Schramm, M., Müller, E. and Triebkorn, R., 2001. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 8, pp.241-260.
- Health, A. G., 1995. Water Pollution and Fish Physiology, seconded. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, pp.125-140.
- Hellawell, J. M., 1986. Biological indicators of freshwater pollution and environmental stressors on fishes. *Elsevier Applied Science Publishers*, 8, pp.51-66.
- Hinton, D. E. and Lauren, D. J., 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: Adams, S. M. (Ed.), *Biological Indicators of Stress in Fish: American Fisheries Symposium 8. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland*, 51-66.
- Kemnitzer, W., Drewe, J., Jiang, S., Zhang, H., Zhao, J. and Crogan- Grundy, C., 2007. Discovery of 4-Aryl-4 H-chromenes as a New Series of Apoptosis Inducers Using a Cell- and Caspase- Based High-Throughput Screening Assay. 3. Structure-Activity Relationships of Fused Rings at the 7. 8- Positions. *Jurnal of Medical Chemistry*, 50 (12), pp.2858-64.
- Landis, W.G., Sofield, R.M. and Yu, M.H., 2017. *Introduction to environmental toxicology: molecular substructures to ecological landscapes*. CRC Press.
- Laville, N., Ait-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C. and Porcher, J.M., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology*, 196(1-2), pp.41-55.
- Law, J.M., 2003. Issues related to the use of fish models in toxicologic pathology: session introduction. *Toxicologic pathology*, 31(1\_suppl), pp.49-52.
- Li, H. and Zhang, S., 2002. In vitro cytotoxicity of the organophosphorus insecticide methylparathion to FG-9307,



- the gill cell line of flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Cell Biology and Toxicology*, 18, pp.235-241.
- Momeni, H. R., Soliemani Mehranjani, M., Abnosi, M. H. and Nasimi, P., 2010. Evaluation of viability in adult mouse spinal cord slices by MTT. *Iranian Journal of biology*, 23(2), pp. 267-274. (In Persian)
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunologic Methods*, 63, pp.55-65.
- Ogundiran, M.A., Fawole, O.O., Adewoye, S.O. and Ayandiran, T.A., 2010. Toxicological impact of detergent effluent on juvenile of African Catfish (*Clarias gariepinus*)(Buchell, 1822). *Agriculture and biology journal of North America*, 1(3), pp.330-342.
- Oliveira, M., Pacheco, M. and Santos, M.A., 2008. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Science of the Total Environment*, 396(1), pp.70-78.
- Parameswaran, V., Ishaq Ahmed, V.P., Shukla, R., Bhonde, R.R. and Sahul Hameed, A.S., 2007. Development and characterization of two new cell lines from milkfish (*Chanos chanos*) and grouper (*Epinephelus coioides*) for virus isolation. *Marine Biotechnology*, 9, pp.281-291.
- Reynaud, S. and Deschaux, P., 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic toxicology*, 77(2), pp.229-238.
- Roesijadi, G. and Robinson, W. E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanism of uptake, accumulation and release. In: Baykan, U., Atli, G. and Canli, M., 2007. The effects of temperature and metal exposures on the profiles of metallothionein-like proteins in *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharamacology*, 23, pp.33-38.
- Romijn, J.C., Verkoelen, C.F. and Schroeder, F.H., 1988. Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects. *The prostate*, 12(1), pp.99-110.
- Roy, S., Chatteraj, A. and Bhattacharya, S., 2006. Arsenic-induced changes in optic tectal histoarchitecture and acetylcholinesterase-acetylcholine profile in *Channa punctatus*: amelioration by selenium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144(1), pp.16-24.
- Rohn, M., Tenhagen, B.A. and Hofmann, W., 2004. Survival of dairy cows after surgery to correct abomasal displacement: 1. Clinical and laboratory parameters and overall survival. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 51(6), pp.294-299.
- Schirmer, K., Dixon, D.G., Greenberg, B.M. and Bols, N.C., 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology*, 127(1-3), pp.129-141.
- Sikkema, J., de Bont, J.A. and Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of biological Chemistry*, 269(11), pp.8022-8028.
- Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M. and Feist, S.W., 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*, 55(2), pp.137-159.
- Suresh, N., 2009. Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in *Tilapia mossambica*. *Journal of environmental biology*, 30(4), pp.505-508.
- Taju, G., Majeed, S.A., Nambi, K.S.N., Farook, M.A., Vimal, S. and Hameed, A.S., 2014. In vitro cytotoxic, genotoxic and oxidative stress of cypermethrin on five fish cell lines. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 113, pp.15-24.
- Taju, G., Majeed, S.A., Nambi, K.S.N. and Hameed, A.S., 2014. In vitro assay for the toxicity of silver nanoparticles using heart and gill cell lines of *Catla catla* and gill cell line of *Labeo rohita*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 161, pp.41-52.
- Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S. and Jaritkhuan, S., 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental pollution*, 121(3), pp.307-320.
- Van Dyk, J.C., Pieterse, G.M. and Van Vuren, J.H.J., 2007. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and environmental safety*, 66(3), pp.432-440.

- Weber, L.P. and Janz, D.M., 2001. Effect of  $\beta$ -naphthoflavone and dimethylbenz [a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. *Aquatic Toxicology*, 54(1-2), pp.39-50.
- Velma, V. and Tchounwou, P.B., 2010. Chromium-induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of goldfish, *Carassius auratus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 698(1-2), pp.43-51.
- Wen, C.M., Lee, C.W., Wang, C.S., Cheng, Y.H. and Huang, H.Y., 2008. Development of two cell lines from *Epinephelus coioides* brain tissue for characterization of betanodavirus and megalocytivirus infectivity and propagation. *Aquaculture*, 278(1-4), pp.14-21.
- Zhou, B., Liu, C., Wang, J., Lam, P.K. and Wu, R.S., 2006. Primary cultured cells as sensitive in vitro model for assessment of toxicants-comparison to hepatocytes and gill epithelia. *Aquatic toxicology*, 80(2), pp.109-118.



Available Online: <http://jmst.kmsu.ac.ir>

Original Article



## Study of Morphological Changes in Liver Primary Cell Culture Exposed to Benzo[a]pyrene in Grouper Fish, *Epinephelus coioides*

NeginDerakhshesh<sup>1\*</sup>, Abdol Ali Movahedinia<sup>2</sup>, Negin Salamat<sup>2</sup>, Mahmoud

Hashemitabar<sup>3</sup>, Vahid Bayati<sup>3</sup>

1. Department of Marine Biology, Faculty of Marine and Oceanic Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

2. Department of Marine Biology, Faculty of Marine and Environmental Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

3. Department of Anatomical Sciences, Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

\*Corresponding Author E-mail: [negin.biology@gmail.com](mailto:negin.biology@gmail.com)

Received: 11 December 2015

Revise Date: 18 December 2015

Accepted: 16 April 2016

DOI: 10.22113/JMST.0621.151304

### Abstract

The liver is one of the most important organs of animals that know as a detoxifying and filtering toxin in the body and the most studies was used the target organ. In present study, hepatocytes were isolated from 8 immature grouper fish (equal to the number of male and female). Then, anesthetized fish and the head was separated from the body. The fish wiped with 70% ethanol alcohol. The liver was removed was cutted with scissors. Finally, the cells digested by collagen type 4. Then, the cells incubated in 30°C and 20% FBS+ITS during two weeks. The doses of pollutant (100 µM, 2\*100 µM, 3\*100 µM) added to samples, then were studied in 0, 6, 12 and 24 time. The morphological analysis exhibited that the cell death incubated by B[a]P polluted by concentration of 100 µm results in 50% of apoptosis cell death. Our finding from this study showed that using lower dosage of B[a]P during 24h treatment period cause inhibition of proliferation in time and dose dependent manner and higher dosage cause lysis and necrosis.

**Keywords:** grouper fish (*Epinephelus coioides*), cytotoxicity, hepatocyte cells, Benzo[a]pyrene.

### Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

