



بررسی تغییرات سلولی در کشت اولیه‌ی سلول‌های کبدی ماهی‌هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) در مواجهه با نونیل فنول

نگین درخشش^{۱*}، عبدالعلی موحدی نیا^۱، نگین سلامات^۱، محمود هاشمی تبار^۲، وحید بیاتی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خوزستان، ایران

^۲ گروه تشریح و آناتومی، تحقیقات دارویی، دانشگاه جندی‌شاپور اهواز، خوزستان، ایران

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۶/۰۴/۳۱

اصلاح: ۹۶/۰۹/۰۵

پذیرش: ۹۸/۰۲/۳۰

کلمات کلیدی:

کبد

کشت سلول

نونیل فنول

هامور معمولی

مطالعه‌ی حاضر با هدف استفاده از کشت اولیه‌ی سلول‌های کبد ماهی‌هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) به منظور ارزیابی اثرات سمی آلاینده‌ی نونیل فنول بر زنده ماندن سلول‌ها و بررسی تغییرات مرفولوژیک انجام شد. بدین منظور از ۸ عدد ماهی‌هامور معمولی استفاده گردید. پس از جدا کردن و قطعه کردن کبد، سلول‌های آن با استفاده از روش هضم آنزیمی، جداسازی و شمارش شدند. در این روش با استفاده از آزمایش MTT، میزان IC₅₀ در سلول‌ها پس از مواجهه با آلاینده‌ی مورد مطالعه به صورت جداگانه اندازه‌گیری شد. بر این اساس میزان IC₅₀ در آلاینده برابر با M ۱۰^{-۴} محاسبه گردید. سپس کشت های سلولی کبدی در مواجهه‌ی غلظت‌های تحت کشنده شامل ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد از میزان IC₅₀ (M ۱۰^{-۵}، ۱۰^{-۵} M و ۳×۱۰^{-۵} M) قرار داده شدند. نمونه‌برداری برای سنجش اثرات آلاینده در مدت زمان ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت از زمان شروع مواجهه صورت گرفت. بر اساس نتایج، کم‌ترین غلظت استفاده شده، تأثیر قابل توجهی بر روند رشد سلول‌ها نداشت ولی میزان تخریب و آسیب سلولی به صورت وابسته به دوز و زمان قرارگیری در مواجهه با آلاینده‌ها، افزایش یافت. در مجموع آلاینده‌ی نونیل فنول دارای اثر سایتوتوکسیک در سلول‌های کبدی کشت داده شده‌ی ماهی‌هامور معمولی بود.

مقدمه

کشت سلول به فرآیند کنترل شده‌ی رشد سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی در محیط کشت اطلاق می‌گردد. در این حالت سلول‌ها، روی بستری سخت (معمولاً پلاستیکی) و در انکوباسیون شروع به رشد می‌کنند. سلول‌های کشت داده شده می‌توانند از بافت‌های بالغین و یا از جنین برداشته شوند. کشت حاصل از بافت‌های جنینی عموماً نسبت به بافت‌های بالغین طول عمر بیشتری داشته و بهتر رشد می‌کنند که احتمالاً این موضوع به دلیل عدم تمایز کامل و وجود سلول‌های بنیادی^۱ در بافت‌های جنینی می‌باشد. علاوه بر این، بسیاری از سلول‌های بالغین به علت تمایز کامل قادر به تکثیر و تولید سلول‌های همتای خود نبوده و بنابراین شروع تکثیر در آن‌ها به کندی انجام می‌شود و قدرت تکثیر در آن‌ها نیز کم‌تر می‌باشد. همچنین، این سلول‌ها طول عمر کوتاه‌تری نسبت به سلول‌های جنینی دارند (Cooper et al., 2002; Soldatow et al., 2013).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: negin.biology@gmail.com

^۱ Stem cell

کبد نقش مهمی در پاک‌سازی سموم وارد شده از محیط، به بدن جاندار بر عهده دارد. این اندام همچنین قادر است، انواعی از پروتئین‌های ناقل همچون لیپوپروتئین، آلبومین و ترانسفرین را بسازد (Komai *et al.*, 1992; Parkinson, 1996). علاوه بر این بسیاری از عوامل آنزیمی، مولکولی و بیوشیمیایی کنترل‌کننده بیان و تنظیم ساختار و عملکرد هپاتوسیت‌ها^۱ هنوز ناشناخته باقی‌مانده است. به همین علت، جداسازی هپاتوسیت از بافت کبد و کشت اولیه این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی به منظور انجام مطالعات سلولی و فرآیندهای سمیت در کبد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (LeCluyse *et al.*, 2000; LeCluyse, 2001; Soldatow *et al.*, 2013).

استفاده از روش‌های کشت سلول و تکنیک‌های کشت بافت علم جدیدی است که برای مطالعه‌ی سلول‌های جانوری در بیشتر کشورهای توسعه‌یافته و یا بعضی از کشورهای در حال توسعه به سرعت در حال گسترش است. در این میان توجه به کشت سلول‌های آبزیان به میزان زیادی مورد علاقه‌ی محققین قرار گرفته است و به نظر می‌رسد که در آینده‌ای نه چندان دور، چشم‌انداز این علم پیشرفته‌تر از سایر گروه‌های جانوری شود (Hernandez-Garcia *et al.*, 2014). در این روش از سلول‌های بدن موجودات زنده در زمینه‌های گوناگون تحقیقاتی استفاده‌ی فراوانی شده است، که برخی از آن‌ها شامل مطالعات مرتبط با مکانیسم‌های سلولی و مولکولی، بررسی فرآیندهای فیزیولوژیک، سم‌شناسی، علمی مانند اکوتوکسیکولوژی (Fent, 2001; Wolf, 1988; Parameswaran *et al.*, 2003; Castano and Becerril, 2004; Schimer, 2006; Clem *et al.*, 1996; Bols *et al.*, 2001; Abdul Majeed *et al.*, 2013; Taju *et al.*, 2007)، زیست‌شناسی سرطان (Sanger, 1998; Babich and Borenfreund, 1991)، آبی‌پروری، مطالعات ژنتیکی و بیان ژن (Bols *et al.*, 2005)، تهیه‌ی واکسن و ترکیباتی نظیر آنتی‌بادی، اینترفرون و هورمون‌های انسانی (Montero *et al.*, 1996; Bols *et al.*, 2001; Hernandez-Garcia *et al.*, 2014) هستند.

اخیراً با توجه به گسترش آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های دریایی استفاده از روش‌های کشت سلول به مطالعه و شناسایی نشانگرهای زیستی جدید کمک شایانی کرده است (Hernandez-Garcia *et al.*, 2014; Mogan and Darling, 1994). بنابراین با استفاده از این روش می‌توان با حداقل بهره‌گیری از موجودات زنده به ارزیابی ظرفیت القاء گروه‌های مختلف آلاینده در ارگان‌های دریایی پرداخت. بنابراین، ضرورت انجام این پژوهش و پژوهش‌های مشابه در این زمینه بیش از پیش آشکار می‌گردد تا با استفاده از آن زمینه‌ی لازم برای انجام سایر مطالعات گوناگون در حیطه‌ی بیولوژی، فیزیولوژی و پزشکی فراهم گردد. علاوه بر این تغییرات سلولی پس از مواجهه‌ی کوتاه مدت با آلاینده در سلول‌ها به عنوان کوچک‌ترین عضو زیست‌شناختی در بدن موجودات زنده، منجر به شناخت بیشتر از نحوه‌ی عملکرد سلول‌ها شده و در نتیجه اطلاعات ارزشمندی را در زمینه‌ی ساختار سلول‌ها به عنوان مدلی از جاندار در شرایط آزمایشگاهی و در محیط کشت ارائه می‌دهد.

گونه‌ی مورد مطالعه در این پژوهش ماهی هامور معمولی با نام انگلیسی Orange – spotted grouper و نام علمی *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1882)، از خانواده‌ی سرانیده^۲ و زیرخانواده‌ی Epinephleida می‌باشد. این ماهی دارای گوشت لذیذی بوده و جزء آبزیان ارزشمند و اقتصادی محسوب می‌شود که از میزان صید بالایی نیز برخوردار است. علاوه بر این گونه‌های مختلفی از این خانواده، در بسیاری از کشورهای آسیای جنوب شرقی و قسمت‌هایی از خاورمیانه مثل کویت نیز پرورش داده می‌شود (Assadi and Dehghani, 1997). در رابطه با کشت سلول‌های کبدی ماهی هامور معمولی، تا کنون

¹ Hepatocyte

مطالعه‌ای گزارش نشده است. تنها تحقیقات صورت گرفته در این زمینه مربوط به تهیه‌ی رده‌ی سلولی از باله‌ی دمی جاندار توسط Chi و همکاران (۱۹۹۹)، تهیه‌ی رده‌ی سلولی از چشم جاندار توسط Paraeswaran و همکاران (۲۰۰۷) و تهیه‌ی رده‌ی سلولی از مغز جاندار توسط Wen و همکاران (۲۰۰۸) می‌باشد.

لازم به ذکر است که در روش کشت سلولی، برای شمارش سلول‌هایی که در معرض عوامل شیمیایی و داروهای سیتوتوکسیک قرار گرفته‌اند، به دلیل تعداد زیاد نمونه‌ها، نمی‌توان از لام نئوبار استفاده نمود. بنابراین به منظور شمارش سلول‌ها در این روش از آزمایش MTT استفاده می‌شود (Kemnitzer *et al.*, 2007). آزمایش MTT، یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول صورت می‌گیرد. در واقع احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان^۱ می‌شود که در زیر میکروسکوپ به راحتی قابل تشخیص هستند. وقتی این ترکیب در محیط محلول نمکی فاقد فنل رد آماده‌سازی می‌شود، محلول زرد رنگی تولید می‌کند. این ترکیب در میتوکندری سلول‌های زنده توسط آنزیم دهیدروژناز احیا شده و به فرم کریستال‌های فورمازان غیر محلول در سلول‌های زنده رسوب می‌کند. این کریستال‌ها به رنگ بنفش بوده و میزان تولید کریستال‌های غیر محلول متناسب با فعالیت سلول می‌باشد. از طرفی سلول‌هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند، MTT را احیا نموده و به عنوان سلول زنده در نظر گرفته می‌شوند (Momeni *et al.*, 2010)، که این محصول توسط حلال‌هایی مانند ایزوپروپانل اسیدی یا DMSO^۲ (دی متیل سولفوکسید) حل شده و رنگ ارغوانی-بنفش را ظاهر می‌سازد (Mosmann, 1983). لذا با توجه به عدم وجود اطلاعات سم‌شناسی جاندار در کشت سلولی و فقدان اطلاعات در رابطه با غلظت کشندگی (IC50) آلاینده‌ی نونیل فنول در گونه‌ی مذکور لزوم انجام این آزمایش لازم و ضروری به نظر می‌رسید.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه

در مطالعه‌ی حاضر تعداد ۸ قطعه ماهی‌هامور معمولی سالم به وزن تقریبی ۲۵۰ گرم، از ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) (استان خوزستان) تهیه و به صورت زنده به آزمایشگاه تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز منتقل گردید. در مرحله‌ی اول، ماهی‌ها به وسیله‌ی ۲-فنوکسی اتانول ۰/۲ درصد بی‌هوش شده و تمام سطح بدن توسط الکل اتانول ۷۰٪ ضدعفونی گردید (Wen *et al.*, 2008). در مرحله‌ی بعد، کبد هر یک از ماهیان به صورت جداگانه و در شرایط کاملاً استریل از بدن ماهی جدا و به لوله فالکون ۵۰ ml که حاوی محلول PBS به همراه ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد در میلی لیتر استرپتومایسین و ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر آمفوتریسین B بود، منتقل شد (Ellesat *et al.*, 2011). سپس به منظور هضم بهتر اتصالات بافت و جداسازی سلول‌ها، از آنزیم کلاژناز (نوع ۴) به صورت جداگانه استفاده شد (Baksi and Frazier, 1990; Mommsen *et al.*, 1994; Pesonen and Andersson, 1997). در این مرحله، بافت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق با PBS که شامل ۰/۱٪ آنزیم کلاژناز بود، تکان داده شدند. سپس به منظور خنثی کردن آنزیم کلاژناز ابتدا از محیط کشت حاوی FBS ۱۰٪ استفاده شد و بعد از آن به منظور جداسازی بهتر سلول‌ها از یکدیگر از فیلتری با منافذ ۷۰ میکرون استفاده گردید. پلیت‌های سلولی حاصل نیز ۲ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ و سلول‌های حاصل شمارش شدند.

^۱ Formazun

^۲ Dimethyl Sulfoxid (DMSO)

ارزیابی سمیت سلول‌ها

هنگامی که تراکم سلول‌ها در کف فلاسک به بیش از ۷۰٪ رسید. به منظور جلوگیری از مرگ و اتمام مواد غذایی مورد نیاز برای رشد، سلول‌ها جداسازی و به پلیت‌های جدید منتقل شدند. بدین منظور از آنزیم تریپسین استفاده شد. بنابراین پس از جدا شدن تمامی سلول‌ها از کف فلاسک، به سوسپانسیون سلولی حاصل میزان ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی FBS ۱۰٪ اضافه شد تا پروتئین‌های موجود در سرم باعث غیرفعال شدن آنزیم تریپسین شوند. سپس به منظور ارزیابی آزمایش سمیت از پلیت‌های ۹۶ چاهکی استفاده شد. برای انجام این کار تعداد ۳۰۰ هزار سلول در هر چاهک قرار داده شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در درون انکوباتور در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند تا به سلول‌ها اجازه داده شود که کف پلیت‌ها را پر کنند. پس از اطمینان از پر شدن کف ظرف توسط سلول‌ها، محیط کشت L-15 خارج و با محیط کشت جدید جایگزین شد. محیط کشت جدید حاوی ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت L-15 تازه به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر DMSO بود تا دامنه‌ی غلظت آلاینده، در آن حل شود (Arukwe et al., 1999; Yao et al., 2007; Shelley et al., 2012).

تعیین غلظت بازدارندگی میانی سلولی (IC₅₀)

با توجه به عدم وجود اطلاعات سم‌شناسی در کشت‌های سلولی ماهی‌هامور معمولی و فقدان اطلاعات در رابطه با میزان IC₅₀ آلاینده‌ی نونیل فنول در گونه‌ی مورد مطالعه، انجام این آزمایش لازم و ضروری به نظر می‌رسید. لذا در ابتدا به منظور تخمین دامنه‌ی غلظت‌های مؤثر در آلاینده‌ی نونیل فنول از مقالاتی نظیر Arukwe و همکاران (۱۹۹۹)، Yao و همکاران (۲۰۰۷)، Shelley و همکاران (۲۰۱۲) استفاده شد تا در نهایت میزان زنده ماندن ۵۰٪ از سلول‌ها در محیط کشت توسط آزمایش MTT محاسبه گردد (Mosmann, 1983). بر این اساس، محدوده‌ی غلظتی در آلاینده‌ی مورد مطالعه برابر با 10^{-6} M، 10^{-5} M، 10^{-4} M، 10^{-3} M، 10^{-2} M و 10^{-1} M در نظر گرفته شد. پس از تعیین غلظت IC₅₀، در ابتدا سلول‌ها (با نسبت ۱۰^۵ سلول) به درون پلیت‌های ۲۴ خانه منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله‌ی بعد و پس از چسبیدن سلول‌ها، محیط رویی خارج و محیط کشت جدید که حاوی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد از غلظت آلاینده به همراه ۱٪ از محلول DMSO بود، به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و پلیت‌های حاوی سلول‌ها به ترتیب در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت در انکوباتور و دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند، تا تغییرات مرفولوژیک در سلول‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

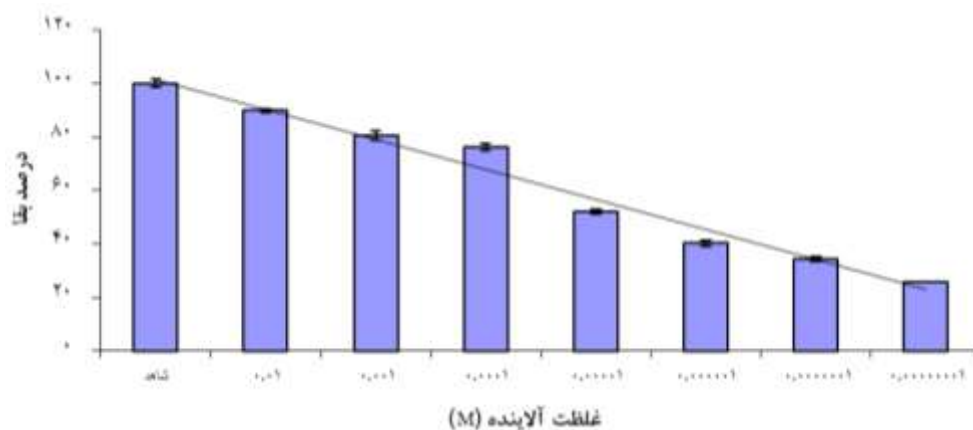
آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی اختلاف بین آن‌ها و مقایسه در تیمارهای مختلف از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه one-way ANOVA در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ استفاده شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها و به منظور تفکیک گروه‌ها از یکدیگر از پس آزمون توکی استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها نیز، اختلاف در سطح اطمینان بالای ۹۵٪ ($P < 0.05$) مورد پذیرش قرار گرفت. به منظور رسم نمودار و جدول‌ها از نرم‌افزار Excell، 2007 استفاده و اختلاف بین تیمارها با حروف الفبای انگلیسی نشان داده شد.

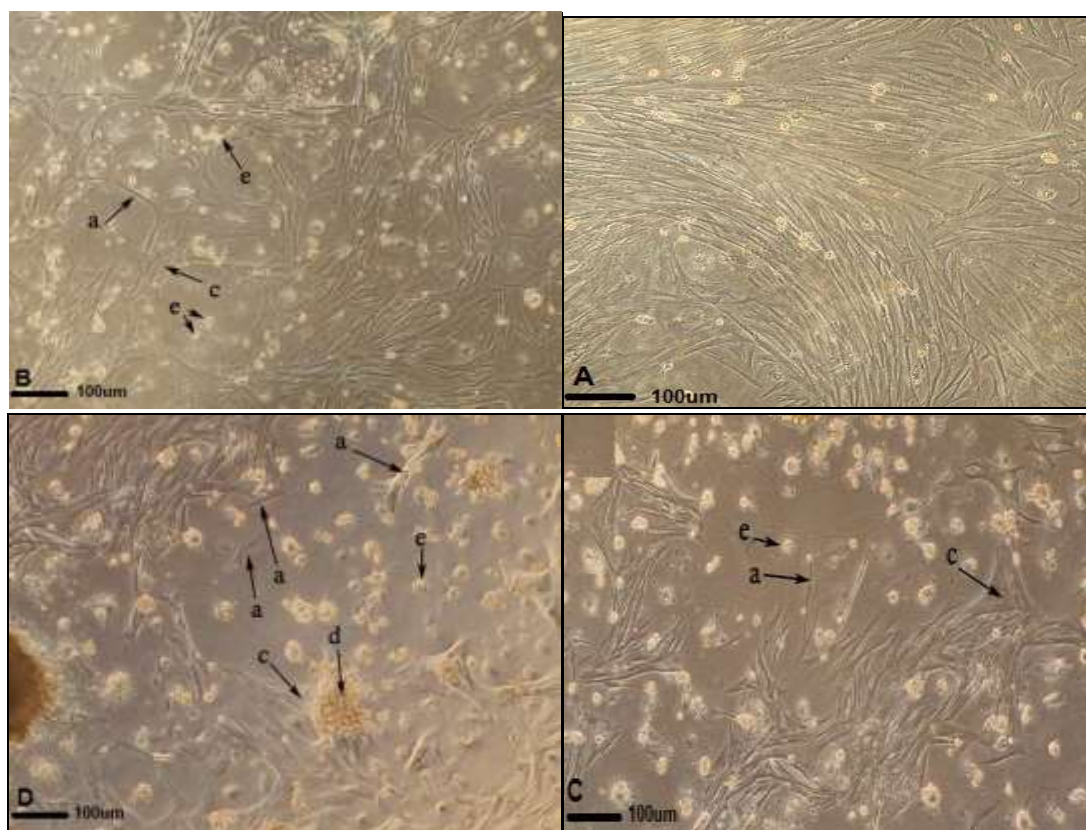
نتایج

غلظت بازدارندگی میانی سلولی (IC₅₀)

مطابق با نتایج به دست آمده، میزان IC_{50} در آلاینده‌ی نونیل فنول برابر با $10^{-4} M$ یا $100 \mu M$ گزارش شد. نتایج حاصل از آنالیز آماری نیز نشان دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف آلاینده بود ($P < 0.05$). در شکل ۱، نمودار حاصل از میزان بقاء سلول‌های کبد در مواجهه با آلاینده‌ی مورد مطالعه نشان داده شده است.



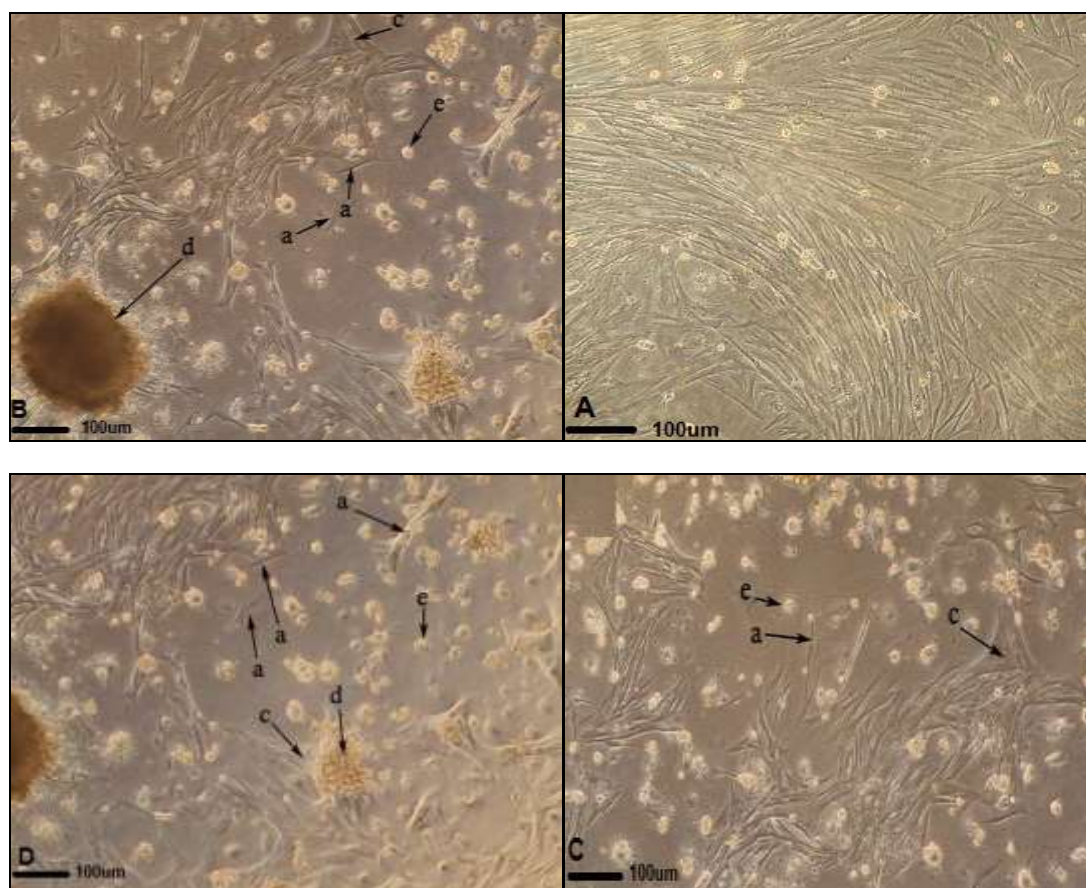
شکل ۱. درصد بقاء سلول‌های کبد ماهی‌هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) در مواجهه با غلظت‌های مختلف آلاینده‌ی نونیل فنول. شیب نمودار نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار غلظت $10^{-4} M$ با گروه شاهد است ($P < 0.05$).



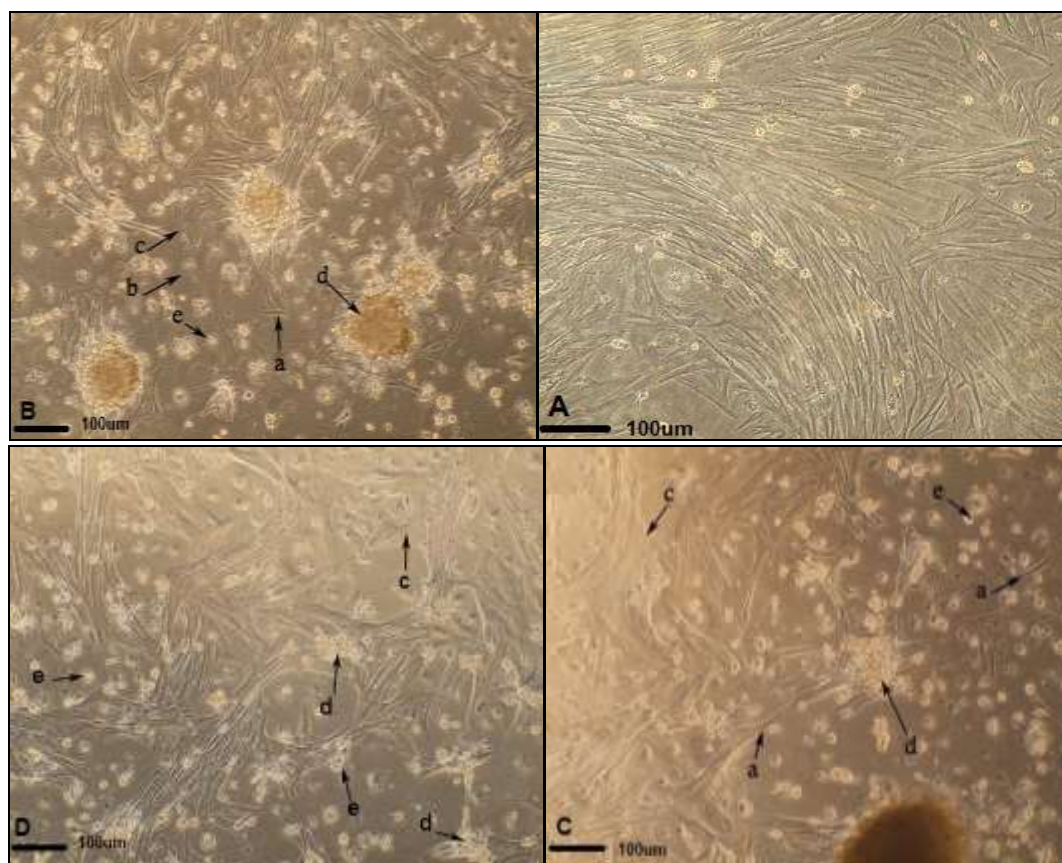
شکل ۲. تصاویر میکروسکوپی از تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده در سلول‌ها پس از مواجهه با نونیل فنول در تیمار $10^{-5} M$. A: شکل طبیعی سلول‌های شبه فیبروبلاستی، B: سلول‌های کشت داده شده در ساعت ۶، C: سلول‌های کشت داده شده در ساعت ۱۲، D: سلول‌های کشت داده شده در ساعت ۲۴. a: جدا شدن اتصال سلول‌ها از کف فلاسک، b: چند وجهی شدن سلول‌ها، c: دوکی و بزرگ شدن سلول‌ها، d: چروک شدگی، افت حجمی و جمع شدگی سلول‌ها و e: سلول‌های گرد شده.

مطالعه‌ی تغییرات سلولی در مواجهه با نونیل فنول

همانگونه که در شکل (۲ تا ۴) نشان داده شده است، پس از القاء آلاینده‌ی نونیل فنول، سلول‌ها در ابتدا از کف فلاسک جدا شده و تغییر در شکل ظاهری آن‌ها ایجاد شد. میزان تغییرات ایجاد شده، در تیمار ۳ بیش‌تر از سایر تیمارها مشاهده شد. علاوه بر این با افزایش مدت زمان قرارگیری در مواجهه با این گروه از آلاینده‌ها، سلول‌های بیشتری از کف ظرف جدا شده و اتصالات سلولی خود را از دست دادند. نمونه‌های فاقد آلاینده در گروه شاهد، دارای ساختار طبیعی و منظم بوده و همگی به شکل سلول‌های شبه فیبروبلاستی مشاهده شدند. سلول‌هایی که در معرض غلظت کم آلودگی (تیمار ۱) قرار داشتند، نسبت به سایر سلول‌ها تغییرات کم‌تری را از خود نشان دادند. این حالت به ویژه در ساعت ۶ نمونه‌گیری مشاهده شد. با افزایش میزان غلظت و زمان قرارگیری در معرض آلاینده، سلول‌ها شروع به جدا شدن از کف پلیت نموده و به صورت چند وجهی، دوکی، چروکیده، گرد و شفاف مشاهده شدند.



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپی از تغییرات مرفولوژیک ایجاد شده در سلول‌ها پس از مواجهه با نونیل فنول در تیمار ۲ ($M \times 10^{-5}$).
 A: شکل طبیعی سلول‌های شبه فیبروبلاستی، B: سلول‌های کشت داده شده در ساعت ۶، C: سلول‌های کشت داده شده در ساعت ۱۲، D: سلول‌های کشت داده شده در ساعت ۲۴. a: جدا شدن اتصال سلول‌ها از کف فلاسک، b: چند وجهی شدن سلول‌ها، c: دوکی و بزرگ شدن سلول‌ها، d: چروک شدگی، افت حجمی و جمع شدگی سلول‌ها و e: سلول‌های گرد شده



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپی از تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده در سلول‌ها پس از مواجهه با نونیل فنول در تیمار ۳ (M) -^۵ ۱۰*۳). A: شکل طبیعی سلول‌های شبه فیروبللاستی، B: سلول‌های کشت داده شده در ساعت ۶، C: سلول‌های کشت داده شده در ساعت ۲۴، D: سلول‌های کشت داده شده در ساعت ۱۲، a: جدا شدن اتصال سلول‌ها از کف فلاسک، b: چند وجهی شدن سلول‌ها، c: دوکی و بزرگ شدن سلول‌ها، d: چروک شدگی، افت حجمی و جمع شدگی سلول‌ها و e: سلول‌های گرد شده

بحث

استرس‌های اکسیداتیو منجر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی و ایجاد آسیب در بافت و سلول‌های بدن جانداران می‌شود (Hai *et al.*, 1997). سلول‌هایی که در معرض غلظت کم‌تری از آلودگی قرار دارند، آسیب و تغییرات مورفولوژیکی کم‌تری را از خود نشان داده‌اند. با افزایش غلظت آلاینده سلول‌ها شروع به جدا شدن، چند وجهی شدن، مخروطی شدن، کاهش حجم سلولی، ایجاد انقباض، شفاف شدگی و در نهایت ایجاد اشکال نامنظم در شکل ظاهری نمودند. در پژوهش حاضر آلاینده‌ی مورد مطالعه، در اولین زمان نمونه‌گیری، (ساعت ۶) تغییرات قابل توجهی را در شکل ساختاری سلول‌ها نسبت به گروه شاهد از خود نشان نداد. بیشترین تغییر وارد شده در شکل ظاهری هپاتوسیت‌ها در پایان مواجهه کوتاه مدت (۲۴ ساعت) و در بیشترین غلظت مورد مطالعه (تیمار ۳، $3 \times 10^{-5} M$) مشاهده گردید. Zacchino و همکاران (۲۰۱۳)، به مطالعه‌ی تأثیر بنزوالفاپایرن بر سلول‌های کبد باس دریایی پرداختند و گزارش کردند که این گونه به آلودگی B[a]P حساس بوده و در مدت زمان ۲۴ ساعت پس از القاء، بیشترین میزان تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌ها را نشان می‌دهد. همچنین آن‌ها بیان کردند؛ حداکثر میزان متابولیسم کبد در ۲۴ ساعت اولیه‌ی مواجهه و به وسیله‌ی واکنش‌های مرحله‌ی یک زیست دگرگونی^۱ کبدی

^۱ Biotransformation

صورت می‌گیرد. سایر محققان نظیر Weber و Janz (۲۰۰۱)، Rao (۲۰۰۶)، Abdul Majeed و همکاران (۲۰۱۴) نیز نتایج مشابهی را گزارش و بیان کردند که فرارگیری سلول‌ها در مدت زمان و غلظت‌های بیشتر آلاینده منجر به کاهش تعداد سلول‌های زنده و اتصالات سلولی به کف فلاسک شده و عوارضی نظیر نکروز و آپوپتوز را در سلول‌ها ایجاد می‌کند. این عوارض به دلیل عدم توانایی تولید هپاتوسیت‌ها و یا در نتیجه‌ی فرآیند سم‌زدایی بیش از حد هپاتوسیت‌ها در بافت کبد به هنگام مواجهه با سموم رخ می‌دهد (Alderman and Clifton, 1993; Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Ogundiran *et al.*, 2010). در ماهیان بیشترین میزان متابولیزه کردن آلاینده در سیتوکروم CYP1A و در کبد صورت می‌گیرد (Pesonen *et al.*, 1990; Taysse *et al.*, 1998). مطالعات نشان می‌دهد که تجزیه‌ی آلاینده‌ی نونیل فنول نیز به کمک سیتوکروم P450 صورت می‌گیرد (Hoffman and Oris, 2006; Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 2007). به طور کلی چندین خانواده از سیتوکروم‌ها که شامل CYP1A1، CYP1A2، CYP3A4، CYP1B1 و CY2 می‌باشد، نقش مهمی در متابولیزه کردن مواد سمی موجود در کبد دارد.

Wheeler و همکاران (۱۹۹۷) نیز بیان کردند که قسمت عمده‌ی متابولیزه ترکیبات نونیل فنول در مرحله‌ی ۲ زیست دگرگونی کبدی و توسط آنزیم گلوکوکورونیک اسید انجام می‌شود. اما مطابق با تحقیقات انجام شده توسط Arukwe و همکاران (۱۹۹۹)، حضور متابولیت‌های سمی هیدروکسیله نشان دهنده‌ی حضور مرحله‌ی ۱ مسیر زیست دگرگونی در سوخت‌ساز نونیل فنول است. Ye و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند حضور متابولیت‌های نونیل فنول هیدروکسیله (۸ و ۹ هیدروکسی نانو فنول) نشان دهنده‌ی تأثیر فاز اول زیست دگرگونی کبدی در متابولیزه کردن ترکیبات نونیل فنول در کبد می‌باشد. Lee و همکاران (۱۹۹۳) نیز در پستانداران، نقش احتمالی CYP1A و ایزوآنزیم‌های ۳A را در متابولیزه کردن ترکیبات نونیل فنول گزارش کردند (Arukwe *et al.*, 1999; Lee, 1999). مطابق با تحقیقات انجام شده توسط Sole و همکاران (۲۰۰۰) نشان داده شد که متابولیت‌های آزاد شده از نونیل فنول، از جمله P363-NP (9,8 hydroxynonylphenol) در مرحله‌ی هیدروکسیلاسیون مرحله‌ی ۱ زیست دگرگونی کبدی قادر به تجمع در بدن جاندار بوده و قابلیت تجزیه شدن آن توسط سلول‌های کبد بسیار محدود می‌باشد. از جمله عوارض ایجاد شده توسط این متابولیت‌ها می‌توان به افزایش فعالیت میتوزی در رحم موش‌های تیمار شده با نونیل فنول و ایجاد تومور و سرطان دستگاه تناسلی در این جاندار اشاره نمود. همچنین، نونیل فنول آزاد شده از پلی استایرن منجر به تحریک رده‌ی سلولی MCF-7 (4-(3,6-dimethyl-3-heptyl) catchol) شده و در نتیجه منجر به سرطان سینه در پستانداران می‌شود. در ادامه به سایر اثرات ایجاد شده توسط آلاینده‌ی نونیل فنول پرداخته شده است. Kudo و همکاران (۲۰۰۴)، گزارش کردند؛ مواجهه با نونیل فنول مانع تکثیر سلول‌ها و مرگ آن‌ها می‌شود. Hughes و همکاران (۲۰۰۰)، علت مرگ سلول‌ها توسط آلاینده‌هایی نظیر نونیل فنول را به دلیل اثر مهارتی این ترکیبات بر مسیر پمپ‌های Ca^{+2} شبکه‌ی آندوپلاسمی بیان کرده‌اند. علاوه بر این، حضور گیرنده‌های استروژنی ER در mRNA سلول‌های کشت داده شده‌ی هیپوفیز قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش شده است (Yadetie *et al.*, 1999). بنابراین گیرنده‌ی ER که تصور می‌شود برای برقراری ارتباط اثرات استروژنیک در نونیل فنول ضروری است، در اندام‌هایی نظیر هیپوتالاموس و هیپوفیز به وفور یافت می‌شود. لذا نونیل فنول با مسدود کردن این گیرنده منجر به اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز ماهی شده و در نتیجه قادر است به سد خونی- مغزی جاندار نفوذ کند.

با توجه به اینکه آلاینده‌ی بنزوآلفاپایرن در مدت زمان (۲۴ ساعت) مورد مطالعه، تأثیرات و آسیب‌های بسیار شدیدی به سلول‌ها وارد نمود، می‌توان به این نتیجه دست یافت که برای سلول‌ها بسیار سمی بوده، با عبور از غشای پلاسمایی آن‌ها باعث ایجاد تغییراتی در ساختار و عملکرد سلول‌ها و کاهش کارایی در بافت کبد می‌شود.

در مجموع آسیب‌های پاتولوژیک وارد شده به سلول‌های کبدی در نتیجه مواجهه با آلاینده ممکن است مانع 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 میزان مرگ سلولی شود. در چنین شرایطی دیگر اکسیداسیون دوباره‌ی نیکوتین امید آدنین دی نوکلئوتید با اکسیژن از طریق زنجیره‌ی تنفسی میسر نیست. بنابراین پیروات به وسیله‌ی نیکوتین امید آدنین دی نوکلئوتید و طی واکنش بیوشیمیایی که به وسیله‌ی آنزیم LDH کاتالیز می‌شود، به لاکتات احیا شده و بدین ترتیب از طریق اکسیداسیون مجدد این ترکیب (نیکوتین امید آدنین نوکلئوتید) به وسیله‌ی لاکتات، فرآیند گلیکولیز در نبود اکسیژن ادامه می‌یابد (Banaee *et al.*, 2011).

منابع

- Abdul Majeed, S., Nambi, K.S.N., Taju, G., Sarath Babu, V., Farook, M.A., Sahul Hameed, A.S. 2014. Development and characterization of a new gill cell line from air breathing fish *Channa striatus* (Bloch 1793) and its application in toxicology: direct comparison to the acute fish toxicity. *Chemosphere*. 96: 89-98.
- Abdul Majeed, S., Nambi, K.S.N., Taju, G., Sundar Raj, N., Madan, N., Sahul Hameed, A.S. 2013. Establishment and characterization of permanent cell line from gill tissue of *Labeo rohita* (Hamilton) and its application in gene expression and toxicology. *Cell Biology Toxicology*. 29: 59-73.
- Alderman, M., Clifton, G. 1993. Introduction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Marine Environmental Research*. 54: 517-520.
- Arukwe, A., Thibaut, R., Ingebrigtsen, K., Celius, T., Goksoyr, A., Cravedi, J.P. 1999. In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*. 49(249): 289-304.
- Assadi, H., Dehghani, R. 1997. Atlas of biomarkers in oil spill risk assessment in the marine environment. *Human and Ecological Risk Assessment*. 12: 1192-1222.
- Babich, H., Borenfreund, E. 1991. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review. *Toxicology in Vitro*. 5: 91-100.
- Baksi, S.M., Frazier, J.M. 1990. Isolated fish hepatocytes-model systems for toxicology research. *Aquatic Toxicology*. 16: 229-256.
- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A., Ahmadi, K. 2011. Effects of diazon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 99: 1-6.
- Bols, N.C., Boliska, S.A., Dixon, D.G., Hodson, P.V., Kaiser, K.L.E. 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochemistry and Molecular Biology Fish*. 6: 44-84.
- Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C., Lee, L.E.J. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental Computational Immunology*. 25: 853-873.
- Bonefeld-Jorgensen, E.C., Log, M., Vnggaard, N.M. 2007. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environmental Health Perspectives*. 115: 69-76.
- Castano, A., Becerril, C. 2004. In vitro assessment of DNA damage after short and long-term exposure to benzo[a]pyrene using PARD and the RTG-2 fish cell line. *Mutation Research*. 552: 141-151.

- Castano, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L.E., Mothersill, C., Part, P., Repetto, G., Sintes, J.R., Ruffli, H., Smith, R., Wood, C., Senger, H. 2003. The use of fish cells in ecotoxicology. *American Theological Library Association Atlantic Universities*. 31(3): 317-351.
- Chi, S.C., Hu, W.W., 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: 173-182.
- Clem, L.W., Bly, J.E., Wilson, M., Chinchar, V.G., Stuge, T., Baker, K., Luft, C., Ryczyn, M., Hogan, R. J., van Lopik, T., Miler, N.W. 1996. Fish immunology: the utility of immortalized lymphoid cells-a mini review. *Veterinar Immunology and Immunopathology*. 54(4): 137-144.
- Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., West, T.L. 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 279: 1-20.
- Ellesat, S.K., Yazdani, M., Holth, T.F., Hylland, K. 2011. Species-dependent sensitivity to contaminants: an approach using primary hepatocyte cultures with three marine fish species. *Marine Environmental Research*. 72: 216-224.
- Fent, K. 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P450A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro*. 15: 477-488.
- Hai, D.Q., Varga, S.I., Mathovics, B. 1997. Organophosphate effects of antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 117: 83-88.
- Hernandez-Garcia, A., Romero, D., Gomez-Ramirez, P., Maria-Mojica, P., Martinez-Lopez, E. 2014. In vitro evaluation of cell death induced by cadmium, lead and their binary mixtures on erythrocytes of common buzzard (*Buteo buteo*). *Toxicology in vitro*. 28: 300-306.
- Hughes, P.J., McLellan, H., Lowes, D.A., Zafar Khan, S., Bilmen, J.G., Tovey, S.C. 2000. Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 277: 568-574.
- Hoffman, J.L., Oris, J.T. 2006. Altered gene expression: A mechanism for reproductive toxicity in Zebrafish exposed to benzo[a]pyrene. *Aquatic Toxicology*. 78: 332-340.
- Kemnitzner, W., Drewe, J., Jiang, S., Zhang, H., Zhao, J., 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. *Journal of Medical Chemistry*. 50(12): 2858-64.
- Komai, T., Shigehara, E., Tokui, T., Koga, T., Ishigami, M., Kuroiwa, C. 1992. Carrier-mediated uptake of pravastatin by rat hepatocytes in primary culture. *Journal of Biochemistry and Pharmacology*. 43(4): 667-670.
- Kudo, C., Wada, K., Masuda, T., Yonemura, T., Shibuya, A., Fujimoto, Y., Nakajima, A., Niwa, H., Kamisaki, Y. 2004. Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of the caspase cascade and regulation of the cell cycle. *Journal of Neurochemistry*. 88: 1416-1423.
- LeCluyse, E.L. 2001. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13(4): 343-368.
- LeCluyse, E.L., Madan, A., Hamilton, G., Carroll, K., Dehaan, R., Parkinson, A. 2000. Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 14: 177-188.
- Lee, H.B. 1999. Review of analytical methods for the determination of nonylphenol and related compounds in environmental samples. *Water Quality Research Journal of Canada*. 34: 3-35.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene line-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell Press*. 75: 843-854.
- Mogan, S.J., Darling, D.C. 1994. *Animal cell culture*. BIOS Scientific Publishers Limited. pp: 1-3.
- Momeni, H.R., Soliemani Mehranjani, M., Abnosi, M.H., Nasimi, P. 2010. Evaluation of viability in adult mouse spinal cord slices by MTT. *Iranian Journal of Biology*. 23(2): 267-274.

- Mommsen, T.P., Moon, T.W., Walsh, P.J. 1994. Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (eds.). Biochemistry and molecular biology of fishes. Vol. 3. Analytical techniques. Amsterdam: Elsevier. pp: 355-372.
- Montero, M., Le Belle, N., Vidal, B., Dufour, S. 1996. Primary cultures of dispersed pituitary cells from estradiol-pretreated female liver eels (*Anguilla anguilla*): Immunocytochemical characterization of gonadotropic cells and stimulation of gonadotropin release. General and Comparative Endocrinology. 104(1): 103-115.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. 63: 55-65.
- Mukhopadhyay, I., Chowdhuri, D.K., Bajpayee, M., Dhawan, A. 2004. Evaluation of in vivo genotoxicity cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline comet assay. Mutagenesis. 19(2): 85-90.
- Ogundiran, A., Fawole, O.O., Adewoye, S.O., Ayandiran, T.A. 2010. Toxicological impact of detergent effluent on juvenile of African Catfish (*Clarias gariepinus*) (Buchell, 1822). Agriculture Biology. 10: 2151-7525.
- Parameswaran, V., Ishaq Ahmed, V.P., Ravi, S., Bhone, R.P., 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: 281-291.
- Parkinson, A. 1996. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. Journal of Toxicology & Pathology. 24: 45-57.
- Pesonen, M., Andersson, T. 1997. Fish hepatocyte culture; an important model of xenobiotic metabolism and toxicity studies. Aquatic Toxicology. 39: 253-267.
- Pesonen, M., Hansson, T., Forlin, L., Andersson, T. 1990. Regional distribution of microsomal xenobiotic and steroid metabolism in kidney microsomes from rainbow trout. Fish Physiology and Biochemistry. 8: 141-145.
- Rao, J.V. 2006. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 86: 78-84.
- Sanger, H. 1998. Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. Experimental and Toxicologic Pathology. 86: 1-38.
- Schimer, K. 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. Toxicology. 224: 163-183.
- Shelley, L.K., Ross, P.S., Kennedy, Ch.J. 2012. The effects of an in vitro exposure to 17 β -estradiol and nonylphenol on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood leukocytes. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. 155: 440-446.
- Soldatow, V.Y., LeCluyse, E.L., Griffith, L.G., Rusyn, I. 2013. In vitro models for liver toxicity testing. Toxicity Research. 2: 23-29.
- Sole, M., Porte, C., Barcelo, D. 2000. Vitellogenin induction and other biochemical responses in carp *Cyprinus carpio* after experimental injection with 17 α -ethynylestradiol. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 38: 494-500.
- Taju, G., Abdul Majeed, S., Nambi, K.S.N., Sahul Hameed, A.S. 2013. Development and characterization of cell line from the gill tissue of *Catla catla* (Hamilton, 1822) for toxicological studies. Chemosphere. 90(7): 2172-2180.
- Taysse, L., Chambras, C., Marionnet, D., Bosgiraud, C., Deschaux, P. 1998. Basal level and induction of cytochrome P450, EROD, UDPGT, and GST activities in carp (*Cyprinus carpio*) immune organs (spleen and head kidney). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 60: 300-305.
- Weber, L.P., Janz, D.M. 2001. Effect of B-naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. Aquatic Toxicology. 54: 39-50.
- Wen, C.M., Lee, C.W., Wang, C.S., Cheng, Y.H., 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: 14-21.

- Wheeler, T.T., Heink, J.R., LaTorre, M.R., Janes, A.B. 1997. Mass spectral characterization of p-nonylphenol isomers using high-resolution capillary GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*. 35: 19-30.
- Wolf, K. 1988. *Fish Viruses and fish viral disease*. Cornell University Press, New York. Ithaca. pp: 83-114.
- Yadete, F., Arukwe, A., Goksoyr, A., Male, R. 1999. Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon in vivo by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. *Science of the Total Environment*. 233: 301-310.
- Yao, G., Ling, L., Luan, J., Ye, D., Zhu, P. 2007. Nonylphenol induces apoptosis of Jurkat cells by a caspase-8 dependent mechanism. *International Immunopharmacology*. 7: 444-453.
- Ye, X., Bishop, A.M., Needham, L.L., Calafat, A.M. 2007. Identification of Metabolites of 4-nonylphenol isomer 4-(3, 6- Dimethyl-3) phenol by rat and human liver microsomes. Division of Laboratory Sciences, National Cancer for Environmental Health, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia. 33: 1269-1274.
- Zacchino, V., Centoducati, G., Narracci, M., Selvaggi, M., Santacroce, M.P. 2013. Effect of Benzo[a]Pyrene on Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) hepatocyte exposed in vitro to short and long trials. *Italian Journal of Animal Science*. 12: 1-17.