نشریهٔ محیط زیست طبیعی،مجلهٔ منابع طبیعی ایران، دورهٔ ۶۶، شمارهٔ ۲، تابستان۱۳۹۲
صفحات ۲۰۳- ۲۱۲

بررسی شرایط مناسب برای نگهداری نمونه خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با هدف پایش زیستی توسط سنجش کامت

سعید مودی[۱]، حمید فرحمند[۲*]، علیرضامیرواقفی[۳]، علی‌اصغر کوثری[۴]، بیتا خلیلی[۵]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آب‌زیان- گروه شیلات دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران-کرج

۲ و ۳. دانشیار گروه شیلات دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران-کرج

۴. مربی گروه گیاه‌پزشکی دانشکدهٔ مهندسی و فناوری کشاورزی دانشگاه تهران-کرج

۵ . کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی آب‌زیان،گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران-کرج

(تاریخ دریافت : ۱۳۹۰/۱۱/۲٤ – تاریخ پذیرش : ۱۳۹۱/۱۱/۲٤)

چکیده

پایش زیستی از عمده‌ترین راه‌های بررسی وضعیت آلودگی در اکوسیستم‌های آبی است که در آن به منظور ردیابیآثار آلاینده‌ها بر آب‌زیان از بایومارکرها در سطوح گوناگون استفاده می‌شود. ازآنجاکه امروزه بسیاری از آلاینده‌های زیست‌محیطی جهش‌زا شناخته می‌شوند، پژوهش پیرامون تأثیر حضور این‌گونه مواد در اکوسیستم‌های آبی به کمک بایومارکرهای ژنوتوکسیک توجه زیادی را به خود معطوف کرده است. اما یکی از مشکلات اساسی در این زمینه نگهداری مناسب نمونه‌های بیولوژیک و انتقال بدون آسیب آن‌ها به آزمایشگاه است. برای این منظور نیاز است برای اجتناب از بروز خطای آزمایش جهت بررسی آسیب DNA با هدف تحلیل وضعیت زیست‌گاه شرایط مناسب بررسی و استانداردسازی شود. بنابراین، در این تحقیق از سنجش کامت به‌منزلهٔ روشی نوین در زمینهٔ مطالعات بایومارکر مولکولی -که بر مبنای اندازه‌گیری آسیب‌های منعکس‌شده به‌صورت شکست رشته‌ای در سلول‌هاست- برای بررسی اثر مقایسه‌ای سه محلول نگهداری (L-15، FBS و PBS) بر یکپارچگی DNA نمونه سلول‌های خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در زمان‌های گوناگون پس از خون‌گیری (۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) استفاده شد. درصد بقای سلول‌ها نیز در فواصل زمانی مورد نظر با روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو محاسبه شد. نتایج سنجش کامت بر روی نمونه‌های خون نگهداری‌شده در محلول‌های L-15 و FBS تفاوت معنی‌داری را در میزان آسیب DNA بین زمان‌های مورد نظر نشان نداد، درحالی‌که نمونه‌های نگهداری‌شده در PBS از ۲۴ ساعت پس از شروع نگهداری افزایش معنی‌دار سطح آسیب DNA را نسبت به زمان صفر (به‌منزلهٔ شاهد) نشان دادند ($P<0/05$). طبق این نتایج به نظر می‌رسد مهم‌ترین عامل در حفظ بقای گلبول‌های قرمز طی نگهداری در محلول‌های گوناگون اسمولاریتی محیط نگهداری باشد. درمجموع، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نمونه‌های خون ماهی آب شیرین را می‌توان تا ۴۸ ساعت بدون آسیب معنی‌دار DNA در محلول‌های L-15 و یا FBS تحت شرایط دمایی ۴ درجهٔ سانتی‌گراد تاریکی نگهداری کرد.

واژگان کلیدی

آسیب DNA، بایومارکر سمیت ژنتیکی، سلول خون، سنجش کامت، محیط نگهداری.

* نویسنده مسئول تلفن: ۰۹۱۲۷۶۶۹۴۶۱

Email: hfarahmand@ut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

۱. مقدمه

پایش زیستی[1] یکی از موضوعات مهم در حیطهٔ علوم محیط‌زیستی محسوب می‌شود و از عمده‌ترین راه‌های بررسی وضعیت آلودگی است که امروزه به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان در حال انجام است. پایش زیستی یک اکوسیستم آبی به کمک بایومارکرها در سطوح گوناگون مولکولی، بیوشیمیایی، سلولی، بافتی، خون‌شناسی، آنزیمی و جمعیتی صورت می‌گیرد که به ردیابی آثار ثانویهٔ آلاینده‌ها می‌پردازد و وضعیت بیولوژیک آب‌زی را جهت ارزیابی سلامت آب‌زیان و نهایتاً اکوسیستم آبی بررسی می‌کند و به‌وسیلهٔ آن تغییرات اکوسیستم‌های آبی به‌سرعت تشخیص داده می‌شود و از تأثیرات مخرب آلاینده‌ها قبل از اینکه کنترل‌ناپذیر شوند، جلوگیری می‌شود (Hussein *et al*., 2008). در این بین بایومارکرهای مولکولی مزیت‌هایی دارند: از جمله اینکه در این سطوح اولیهٔ بیولوژیکی، پاسخ‌ها زودتر مشاهده‌پذیرند و اختصاصیت پاسخ‌ها از عوامل تنش‌زا بیشتر است. به‌علاوه، در آن‌ها مشکلات جداسازی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم وجود ندارد. ازآنجاکه امروزه بسیاری از آلاینده‌های زیست‌محیطی جهش‌زا شناخته می‌شوند، تحقیقات پیرامون تأثیر حضور این عوامل در اکوسیستم‌های آبی توجه زیادی را به خود معطوف کرده است و سنجش آسیب ژنتیکی ناشی از آن‌ها را می‌توان یک بایومارکر سمی بودن ژنتیکی مناسب در نظر گرفت. از طرف دیگر، به‌دلیل اینکه محیط‌های آبی مقصد نهایی بیشتر مواد ژنوبایوتیک[2]اند، گونه‌های آب‌زی و مشخصاً ماهیان در مواجههٔ همیشگی با آلاینده‌هایند و به‌طور جدی تحت تأثیر این مواد قرار دارند. بنابراین، استفاده از این موجودات به‌مثابهٔ شاخص زیستی[3] آثار آلودگی حائز اهمیت است و می‌توانند در تشخیص زودهنگام مشکلات اکوسیستم‌های آبی مفید واقع شود (Jha, 2008). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ماهی آب شیرین است و در شرایط آب با اکسیژن بالا، سرد و تمیز زندگی می‌کند و به‌دلیل حساسیت بالایی که دارد استفاده از آن برای مطالعات سمی بودن حاد و مزمن به‌منزلهٔ بایوانديکاتور توصیه شده است (OECD, 1992) و به همراه ماهی مداکای ژاپنی (*latipes Oryzias*) به‌صورت گسترده‌ای به‌مثابهٔ موجودات آزمایشگاهی برای مطالعات مرتبط با جهش و سرطان استفاده می‌شود (Dizer *et al*., 2002). آزمایش‌های ژنوتوکسیک در ماهیان معمولاً با استفاده از گلبول‌های قرمز بافت خون صورت می‌گیرد، زیرا بالغ بر ۹۸ درصد کل سلول‌های خون را گلبول‌های قرمز تشکیل می‌دهد که برخلاف پستانداران حاوی هسته و درنتیجه DNA است. تهیهٔ نمونهٔ زیاد DNA از مقدار بسیار کمی از خون ماهی نسبتاً آسان است و نیازی به جداسازی سلولی ندارد. علاوه‌براین، اندازه‌گیری شاخص‌های آسیب ژنتیکی آلودگی‌ها مستقیم است و از روش‌های نمونه‌گیری و یا تنش ناشی از دست‌کاری تأثیر نمی‌پذیرد (Hayashi *et al*., 1998).

طبق نظر بسیاری از محققان معمول‌ترین و در عین حال مطمئن‌ترین روش برای ارزیابی یک‌پارچگی DNA در مدل‌های گوناگون آزمایشگاهی سنجش کامت[4] است (Lee & Steinert, 2003; Dhawan *et al*., 2009; Valverde & Rojas, 2009) و بهینه‌سازی این روش برای بی‌مهرگان و گونه‌های مهره‌دار غیرانسانی توانسته است تا حد زیادی باعث پیشرفت در زمینهٔ بوم سم‌شناسی[5] شود (Frenzilli *et al*., 2009). این رویکرد فرصت مطالعهٔ آسیب ساختاری DNA را در تک تک سلول‌ها، بدون اطلاع قبلی از کاریوتایپ و نرخ جاگردی سلول که در روش‌های ریزهسته[6] و تبادل کروماتید خواهری[7] مورد نیاز بود، مهیا ساخته است (Belpaeme *et al*., 1998). با وجود این، تاکنون فقدان روش‌های مناسب برای نگهداری و انتقال نمونه‌های خون ماهیان به‌صورت سالم و آسیب‌ندیده، با هدف آنالیز شکست رشتهٔ DNA، کاربرد روش کامت را در مطالعات میدانی با مشکل مواجه کرده و اغلب به مناطق نمونه‌گیری نزدیک به امکانات آزمایشگاهی و یا موجودات در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی محدود شده است (Conrad *et*

1. Biomonitoring
2. Xenobiotic
3. Bioindicator
4. Comet assay
5. Ecotoxicology
6. Micronucleus
7. Sister chromatid exchange

Archive of SID

www.SID.ir

al., 2000; Hartl *et al*., 2010). اخیراً پیشنهاد شده است که حفظ و نگهداری موقت از نمونه‌های سوسپانسیون زندهٔ سلول‌های خون می‌تواند امکان انجام سنجش کامت را در مطالعات میدانی در مناطق دورافتاده فراهم کند و همچنین مدیریت حجم سنگین کار آزمایشگاهی مرتبط با تعداد نمونه‌های زیاد را آسان کند (Hartl *et al*., 2010). اما طی نگهداری کوتاه‌مدت، تغییرات متعددی در ترکیب خون و محصولات خونی سلولی رخ می‌دهد. تغییرات بیوشیمیایی ذخیره‌شده در گلبول‌های قرمز اغلب به کاهش سطح آدنوزین تری‌فسفات (ATP) و ۲،۳ دی‌فسفوگلیسرات (DPG) و همچنین کاهش دگردیس‌پذیری[1] گلبول‌های قرمز مربوط است (Kor *et al*., 2009). به‌علاوه گلبول قرمز گرفته شده ممکن است به‌صورت خودبه‌خودی اکسید شود و به‌تدریج به مت هموگلوبین تبدیل شود. از طرف دیگر DNA سلول به‌شدت مستعد تخریب به‌وسیلهٔ نوکلئاز هیدرولیتیک و اکسیداتیو درون‌زاد است و در صورت پیش‌گیری نشدن، رشته‌های بسیار طولانی DNA به قطعات کوچکی شکسته می‌شود که استفاده از آن برای آنالیزهای مولکولی تا حد زیادی کاهش می‌یابد (Dawson *et al*., 1998). برای پیش‌گیری از بروز این حالت به محیط نگهداری مناسب نیاز است تا فعالیت آنزیمی و درنتیجه تخریب DNA را محدود کنیم. نقش محیط‌های نگهداری این است که با جمع‌آوری رادیکال‌های اکسیداتیو، محیط خارج سلولی متعادلی را برای سلول‌ها فراهم آورد و pH خارج سلولی را در محدودهٔ فیزیولوژیکی مورد نیاز نگه دارد (Hartl *et al*., 2010). از جمله محیط‌های نگهداری می‌توان سرم جنین گاوی (FBS) را نام برد که به‌دلیل خصوصیات و ترکیباتش محیط مناسبی برای نگهداری نمونه‌ها گزارش شده است، زیرا منبعی غنی از پروتئین‌ها، فاکتورهای رشد، اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها، یون‌ها ویتامین‌ها و سایر ترکیبات است. به‌علاوه میزان زیاد گلوکز موجود در آن در نقش یک منبع انرژی برای متابولیسم سلولی عمل می‌کند (Scott *et al*., 2005). همچنین محیط کشت L-15 از مواد مغذی اسید آمینه‌ای غنی است و ازآنجاکه نیازی به تعویض CO_2 ندارد در کشت سلول‌های ماهی با موفقیت استفاده می‌شود و با توجه به این مزیت، بیش از ۸۰ درصد از تیره‌های سلولی ایجادشده پس از سال ۱۹۹۴ از این محیط کشت استفاده می‌کنند (Lakra *et al*., 2011). محلول بافر فسفات (PBS) نیز یک محلول نگه‌دارنده است که معمولاً در مطالعات بیوشیمی به‌کار می‌رود، اما کاربردهای دیگری نیز دارد که ایزوتونیک و غیرسمی بودن برای سلول از آن جمله‌اند (Ramsdorf *et al*., 2009).

باتوجه به اینکه تاکنون مطالعات اندکی درخصوص اثرات شرایط نگهداری روی آسیب DNA گلبول قرمز ماهیان صورت گرفته و راهبرد مؤثری به‌منظور جلوگیری از وقوع این حالت گزارش نشده است، هدف از این مطالعه بررسی مقایسه‌ای سه محیط نگهدارنده شامل محلول بافر نمکی فسفات (PBS)[2]، سرم جنین گاوی (FBS)[3] و محیط کشت L-15[4] برای نگهداری کوتاه‌مدت نمونهٔ خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با هدف آنالیز داده‌های بایومارکری (بقای سلول و آسیب DNA هسته‌ای) است.

۲. مواد و روش‌ها

محلول‌های PBS (11-PB1-100) و FBS (12-FB1-100) از شرکت نوآوری زیستی گویا با نام تجاری INOCLON خریداری و محیط کشت L-15 (11415-064) از شرکت اینویتروژن تهیه شد.

۲. ۱. نمونه‌گیری و شرایط نگهداری

شش عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با وزن متوسط ۱۰۰ گرم پس از یک هفته آداپتاسیون در شرایط نرمال برای آزمایش استفاده شدند. خون‌گیری از هر ماهی پس از بیهوش کردن با پودر گل میخک از ساقهٔ دمی به‌وسیلهٔ سرنگ هپارینه صورت گرفت. سطح آسیب پایه‌ای DNA[5] و بقای سلولی بلافاصله پس از خون‌گیری (زمان صفر به‌منزلهٔ گروه شاهد) تعیین شد. برای تهیهٔ تیمارهای آزمایشی، ۱۰ µl خون از

1. Deformability

2. Phosphate Buffered Saline
3. Fetal Bovine Serum
4. Leibovitz Media
5. Baseline DNA damage

Archive of SID

www.SID.ir

هر ماهی به اپندورف حاوی ۱ ml محلول نگهداری FBS یا L-15 و یا PBS اضافه و رقیق‌سازی شدند و سوسپانسیون‌های سلولی حاصله در شرایط تاریکی و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. در فواصل زمانی ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از خون‌گیری، آزمایش‌های سنجش میزان بقای سلولی و آسیب DNA روی سوسپانسیون‌های سلولی نگهداری‌شده صورت گرفت.

۲. ۲. سنجش بقای سلول

برای بررسی میزان بقای سلول‌ها در فواصل زمانی از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو[1] استفاده شد. بدین ترتیب که در زمان‌های مورد نظر، در زیر هود و شرایط استریل از هر اپندورف ۳۰ µl سوسپانسیون سلول برداشته و با حجم مساوی از محلول تریپان بلو ۰/۴ درصد به‌خوبی مخلوط شد. سپس ۱۰ µl از این مخلوط روی لام نئوبار[2] منتقل و در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد. سلول‌هایی که زیر میکروسکوپ بی‌رنگ بودند و غشای آن‌ها سالم بود زنده و سلول‌هایی که رنگ آبی گرفته بودند و غشای آن‌ها چروکیده بود مرده در نظر گرفته شدند (شکل ۱). سپس با استفاده از معادلهٔ ۱ درصد زنده ماندن سلول‌ها محاسبه شد (Anderson *et al.*, 1994).

$$\text{بقا } \% = \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{کل سلول های شمارش شده}} \times ۱۰۰ \qquad \text{(معادله ۱)}$$

۲. ۳. سنجش یکپارچگی DNA

اندازه‌گیری آسیب DNA در سلول‌های خونی ماهی به روش سنجش کامت قلیایی با اندکی اصلاحات صورت گرفت (Mitchelmore & Chipman, 1998). به‌طور خلاصه در زمان‌های مورد نظر، سوسپانسیون گلبول قرمز موجود در محلول‌های نگهداری با آگارز ۰/۵ درصد (w/v) نقطهٔ ذوب پایین[3] به نسبت ۱:۱۲ مخلوط شد، سپس روی لام‌های پوشش‌داری ریخته شد که از قبل تهیه شده بود. لام‌های حاوی نمونه در محلول بافر لیزکنندهٔ (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% DMSO and 10 mM Tris, pH 10.0) تازه تهیه شده به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. در ادامه لام‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول بافر قلیایی (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH>13) قرار داده شدند و سپس به تانک الکتروفورز منتقل شدند و الکتروفورز به مدت ۲۵ دقیقه و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد (۲۵ ولت، ۲۷۰ میلی‌آمپر). پس از آن لام‌ها در سه حمام ۵ دقیقه درون بافر خنثی‌سازی (تریس ۰/۴ مولار، pH =۷/۵) قرار داده شدند. پس از اتمام مراحل لام‌ها با اتیدیم برماید (۲۰ µg/ml) رنگ‌آمیزی شدند و به کمک میکروسکوپ اپی فلوئورسانس (Zeiss, Germany)، مجهز به دوربین مورد مشاهده قرار گرفتند (شکل ۲). برای کمی‌سازی آسیب DNA، در هر لام حدود ۱۰۰ سلول به‌طور تصادفی انتخاب و سطح آسیب‌ها ارزیابی شد. یکی از مهم‌ترین پارامترها که قضاوت در مورد میزان آسیب وارده به DNA بر مبنای آن انجام می‌شود، درصد کمی DNA در دنباله[4] (%DNAT) است (Konca *et al.*, 2003) که طبق معادلهٔ ۲ با نرم‌افزار Comet V 1.5 Score™ ارزیابی شد؛ در این معادله T دنباله[5] و H سر[6] کامت است.

(معادلهٔ ۲)

$$\%DNA_T = 100 \times (DNA_C - DNA_H)/DNA_C$$

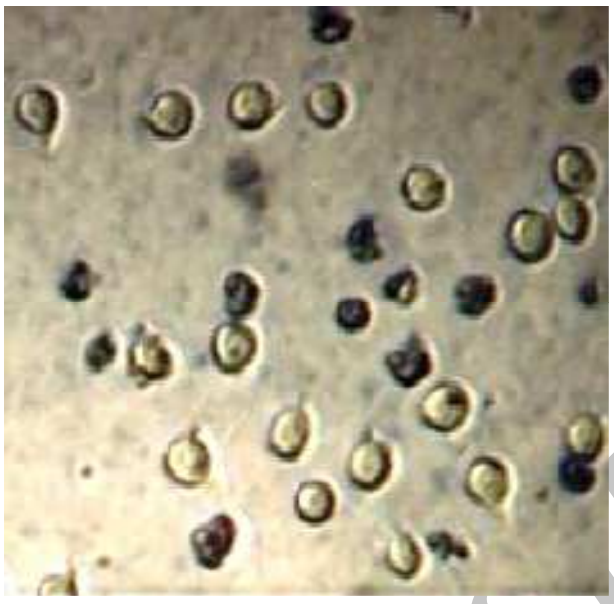
۲. ۴. آنالیزهای آماری

نرمال بودن متغیرها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد. برای مقایسهٔ تفاوت آسیب DNA بین محلول‌های نگهداری و زمان‌های گوناگون از آزمون ناپارامتری کروسکال-والیس در سطح ۹۵ درصد و آزمون توکی استفاده شد.

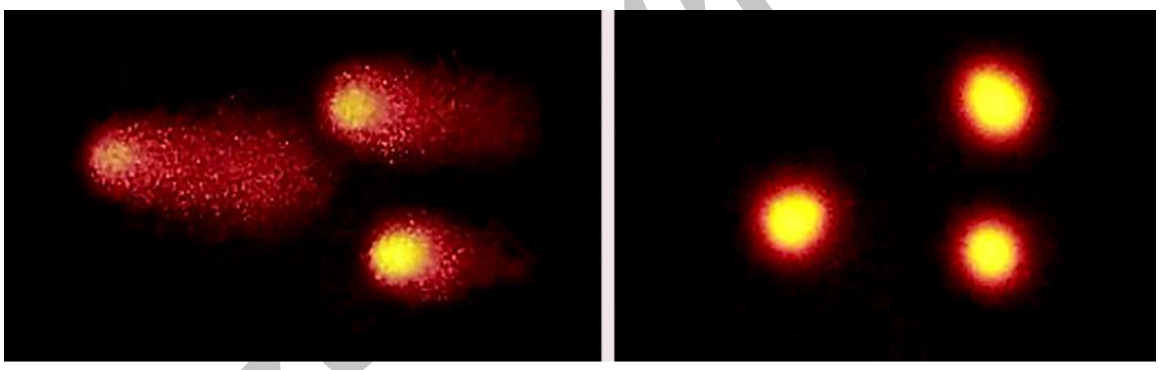
1. Trypan blue exclusion
2. Haemocytometer
3. Low Melting Point Agarose
4. Percent tail DNA
5. Tail
6. Head

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. تصویر سنجش بقای سلول‌های خونی به روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو
(سلولهای مرده برخلاف سلول‌های زنده رنگ را جذب کرده و تیره شده‌اند)



شکل ۲. سمت راست : DNA نمونه سلول‌های گروه شاهد، سمت چپ : نمونه سلول‌های با DNA آسیب‌دیده (نمونه‌ها به‌صورت ستارهٔ دنباله‌دار مشاهده می‌شوند که هر چه طول دنباله بیشتر باشد، درصد آسیب DNA بیشتر است)

۳. نتایج

براساس آنالیزهای آماری تأثیر فاکتورهای زمان و محیط نگهداری روی بقای سلولی معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$)، اما تأثیر متقابل این فاکتورها مشاهده نشد. درصد بقای سلول‌های خونی نگهداری‌شده در محیطهای FBS و L-15 طی زمان‌های آزمایش تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت، اما در محلول PBS، از ۱۲ ساعت پس از شروع نگهداری، در مقایسه با گروه شاهد، کاهش معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) در سطح بقای سلولی نمونه‌های نگهداری‌شده رخ داد. در انتهای آزمایش بیشترین بقای سلولی در سلول‌های نگهداری‌شده در محلول FBS مشاهده شد (۸۱/۳۲ درصد) و کمترین میزان بقای سلولی طی این مدت مربوط به محلول PBS (۴۶/۲۴ درصد) بود (جدول ۱).

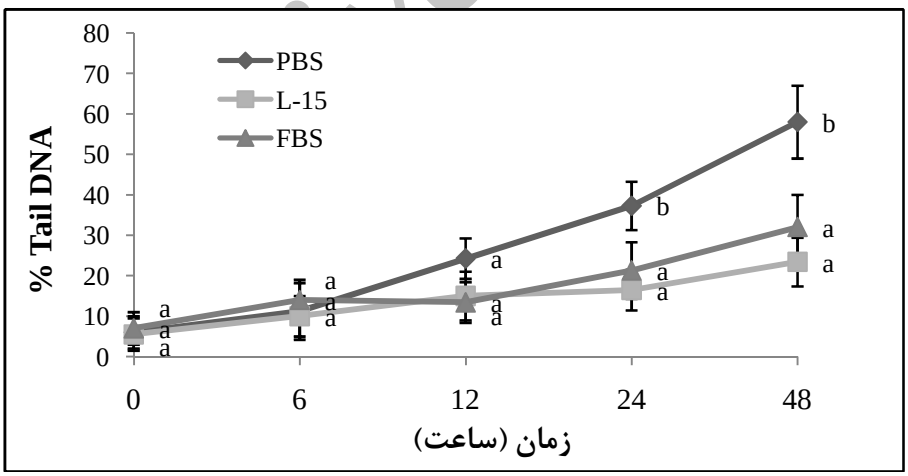
www.SID.ir

جدول ۱. میانگین درصد بقای سلولی در نمونه‌های خون تازه (شاهد) و نگهداری‌شدهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

زمان (ساعت)	محیط نگهداری		
	L-15	FBS	PBS
۰ (شاهد)	۹۴/۳۳ ± ۲/۰۳ [a]	۹۴/۳۳ ± ۲/۰۳ [a]	۹۴/۳۳ ± ۲/۰۳ [a]
۶	۸۶/۷۴ ± ۳/۹۵ [a]	۸۷/۴۵ ± ۳/۵۸ [a]	۸۱/۱۱ ± ۳/۸۰ [a]
۱۲	۸۴/۴۵ ± ۴/۴۶ [a]	۸۳/۵۴ ± ۴/۱۲ [a]	۷۲/۹۳ ± ۶/۵۷ [b]
۲۴	۸۲/۷۳ ± ۶/۵۳ [a]	۸۴/۳۴ ± ۵/۰۳ [a]	۵۹/۶۱ ± ۶/۸۳ [b]
۴۸	۷۹/۳۶ ± ۷/۳۸ [a]	۸۱/۳۲ ± ۴/۹۷ [a]	۴۶/۲۴ ± ۷/۱۶ [c]

مقادیر با حروف الفبای بالانویس متفاوت نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) در فواصل زمانی است. (میانگین ± انحراف معیار)

آسیب DNA در گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به‌صورت میانگین درصد DNA دنباله ± انحراف معیار در (شکل ۳) نشان داده شده است. فاکتورهای زمان و محیط نگهداری و همچنین اثرات متقابل این دو عامل بر روی آسیب DNA معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$). آنالیزهای آماری نتایج سنجش کامت، تفاوت معنی‌داری را بین آسیب DNA ناشی از نگهداری سلول‌های خونی در محلول‌های FBS و PBS در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ نشان داد. همچنین تفاوت بین PBS و L-15 نیز در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع نگهداری معنی‌دار بود. اما تفاوت معنی‌داری بین FBS و L-15 در بین هیچ یک از زمان‌های مورد نظر مشاهده نشد. همچنین طبق نتایج سنجش کامت، سطح آسیب DNA در سلول‌های نگهداری‌شده در محیط‌های L-15 و FBS با گذشت زمان افزایش معنی‌داری از زمان صفر (شاهد) پیدا نکرد، درحالی‌که نمونه‌های نگهداری‌شده در PBS، از ۲۴ ساعت پس از شروع نگهداری، افزایش شاخص سطح آسیبها را نشان دادند ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۳).



شکل ۳. نمودار تغییرات سطح آسیب DNA گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نگهداری‌شده در محلول‌های FBS،L-15 و PBS طی آزمایش

www.SID.ir

۴. بحث و نتیجه‌گیری

۴. ۱. بقای سلولی

سمی بودن سلولی[1] به اختلال فعالیت‌های سلولی اشاره دارد که با روش‌های گوناگونی نظیر رنگ‌آمیزی تریپان بلو - که بر مبنای اندازه‌گیری یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول است- بررسی شده است و سنجش درصد بقای سلول شناخته می‌شود. نتایج سنجش بقای سلول ممکن است به‌شدت تحت تأثیر محیط نگهداری قرار گیرد. در بررسی مقایسه‌ای عملکرد محافظتی محیط‌های نگهداری در این مطالعه، FBS و L-15 دارای اثرات بهتری بودند. اصولاً زمانی که محیط پایه با مکمل سرمی مانند FBS غنی‌شده باشد، سمی بودن سلولی کمتر مشاهده می‌شود (Bols *et al.*, 2005). گزارش شده است که FBS حاوی مولکول‌های حفاظتی مانند آنتی‌اکسیدان‌هاست که می‌تواند از تأثیرات منفی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)[2] جلوگیری کند. ازاین‌رو در مطالعات سم‌شناسی این ویترو روی تیره‌های سلولی آب‌زیان معمولاً محیط کشت پایهٔ L-15 به همراه ۱۰ درصد FBS مورد استفاده قرار می‌گیرد (Schirmer *et al.*, 1997). از طرف دیگر درصد بقای سلول‌های نگهداری‌شده با درجهٔ حرارت محیط نگهداری ارتباط معکوس دارد که احتمالاً با کاهش سرعت سوخت‌وساز مرتبط است (Hartl *et al.*, 2010). در این مطالعه نمونه‌ها در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند که با توجه به نتایج بقای سلولی در محیط‌های FBS و L-15 (جدول ۱)، به‌نظر می‌رسد این دما برای نگهداری نمونه‌های خون ماهی مناسب باشد. اما گمان می‌شود مهم‌ترین عامل در حفظ سلامت گلبول‌های قرمز، طی نگهداری در محلول‌های گوناگون، اسمولاریتی محیط نگهداری است و بسته به منشأ دریایی یا آب شیرین بودن ماهی، باید پیش از رقیق‌سازی برای این سلول‌ها تنظیم شود. در مطالعهٔ ما PBS بالاترین شمار سلول‌های مرده را در مقایسه با دو محیط نگهداری دیگر داشت که ممکن است به‌علت اسمولاریتهٔ پایین PBS (۱۵۹ mM) در مقایسه با دو محیط نگهداری دیگر باشد. تفاوت اسمولاریته بین خون و PBS ممکن است به هجوم آب به داخل سلول‌ها منجر شود که با تغییر در مورفولوژی همراه است و به این ترتیب هسته‌ها ممکن است صدمه ببینند و درنهایت درصد بقای سلولی کاهش یابد (Ramsdorf *et al.*, 2009). اسمولاریتی محیط‌های نگهداری FBS و L-15 به‌ترتیب ۳۲۲ و ۳۱۵ mM است که مشابه خون ماهیان آب شیرین (برای مثال ۲۹۲/۵mM در *Salmo trutta* (Potts & Parry, 1964)) است (García-Pérez-Camps & Ximénez, 2008; Ramsdorf *et al.*, 2009).

۴. ۲. آسیب DNA

به‌علت افزایش توجه به استفاده از روش سنجش کامت در مطالعات پایش زیستی میدانی[3]، تطبیق و بهبود تکنیک‌های نگهداری نمونه‌های بیولوژیک جمع‌آوری‌شده با هدف حفظ یکپارچگی DNA ضروری است (Hartl *et al.*, 2010). اگرچه چندین روش برای نگهداری نمونه‌های مورد استفاده در سنجش کامت طی مراحل گوناگون آن پیشنهاد شده است که از آن جمله می‌توان به نگهداری لام‌ها در بافر لایزیس برای مدت یک شب یا چندین ماه قبل از الکتروفورز و یا خشک کردن سریع لام‌ها پس از الکتروفورز اشاره کرد (Hartl *et al.*, 2010)، به هر حال نگهداری بلندمدت ممکن است تغییرات نامطلوبی را در الگوی کامت ایجاد کند و خطای آزمایش را سبب شود (Belpaeme *et al.*, 1998).

بسیاری از عوامل بر حفظ یکپارچگی DNA اثر می‌گذارند که از آن جمله نوع بافت، محیط فیزیکوشیمیایی که بافت در آن نگهداری شده و مدت زمان نگهداری است. با این حال تعامل این عوامل و آثار ناشی از آن‌ها بر ساختار DNA به‌سختی پیش‌بینی‌پذیر است (Dawson *et al.*, 1998). در این مطالعه سنجش کامت شکست‌های DNA خیلی بیشتری را در سلولهای نگهداری‌شده در PBS در مقایسه با FBS و L-15 نشان داد. به‌طور مشابه، مطالعهٔ Ramsdorf و همکارانش روی اثر محافظتی محیط‌های نگهداری گوناگون روی محتوای ژنتیکی نمونه‌های گلبول قرمز خون ماهی کپور معمولی

1. Cytotoxicity
2. Reactive oxygen species
3. In situ

Archive of SID

www.SID.ir

(*Cyprinus carpio*) نشان داد که نمونه‌های نگهداری‌شده در FBS کمترین آسیب را دیده بودند و پس از آن PBS و EDTA در رتبه‌های بعدی قرار داشتند (Ramsdorf *et al.*, 2009). در مطالعهٔ دیگری روی سلول‌های هموسایت صدف، تفاوت زیادی در صدمه به DNA بین سلول‌های نگهداری‌شده در محیطهای HBSS[1] و L-15 در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد مشاهده نشد و نتیجه گرفتند هر دو این محیطها برای نگهداری هموسایت صدف *M. edulis* در شرایط مناسب به‌منظور ارزیابی سنجش کامت به مدت حداقل هفت روز مناسب‌اند. البته شایان ذکر است که در این مطالعه اسمولاریتی محیط‌های نگهداری مورد استفاده با افزودن میزان مناسب NaCl به میزان اسمولاریتی همولنف صدف رسانده و تنظیم شده بود (Hartl *et al.*, 2010). همچنین Olivier و همکارانش در مطالعه‌ای نمونهٔ خون گربه‌ماهی (*Ictalurus punctatus*) را که در دماهای ۴ و ۲۴ درجهٔ سانتی‌گراد با استفاده از سه محلول نگهداری گوناگون شامل یک محلول تجاری تثبیت کنندهٔ سلول انسانی (Streck) یا پارافرمالدهید ۴ درصد و یا اسید سیترات دکستروز (ضد انعقاد) به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شده بود مورد مقایسه قرار دادند و درنهایت، محلول تثبیت‌کنندهٔ اثر محافظتی بهتری را روی سلول‌های خونی به‌منظور مطالعات سلولی و مولکولی نشان داد (Olivier *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای دیگر که Anderson و همکارانش انجام دادند، در سطح آسیب رشته‌ای DNA سلول‌های لنفوسیت خون انسان که در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت چهار روز در محیط کشت RPMI 1640[2] نگهداری شده بود، تغییراتی مشاهده نکردند و این زمان را جهت مطالعات پایش زیستی سلول‌های لنفوسیت خون انسان به کمک سنجش کامت مناسب دانستند (Anderson *et al.*, 1997). اما Narayanan و همکارانش افزایش در شکست‌های رشته‌ای DNA را تحت همان شرایط گزارش کردند (Narayanan *et al.*, 2001). به هر حال احتمالاً درصد زیادی از آسیب DNA ناشی از اثر غیرمستقیم تنش اکسیداتیو ناشی از متابولیت‌های واکنشی است. به‌عبارت دیگر این احتمال وجود دارد که میزان بالایی از محصولات زائد حاصل از سوخت‌وساز که خاصیت ژنوتوکسیک دارند، در طول مدت نگهداری سلول در محیط تولید شده باشد (Hartl *et al.*, 2010). یک دلیل برای پایین بودن سطح آسیب DNA در سلول‌های نگهداری‌شده در محیط FBS حضور ممانعت‌کننده‌های پروتئازی به‌علت فعالیت ضد تریپسینی‌شان است، زیرا از عملکرد این آنزیم در سلول‌های خونی جلوگیری می‌کنند که ممکن است به آسیب ژنومی منجر شود (Ramsdorf *et al.*, 2009). در هر حال این فرضیه به بررسی‌های بیشتری نیاز دارد. یافته‌های مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که اندازه‌گیری آسیب DNA در سلول‌های خون ماهی ممکن است به میزان زیادی تحت تأثیر شرایط نگهداری نمونه‌ها قبل از آزمایش قرار گیرد. درمجموع، نمونه‌های خون ماهی آب شیرین را می‌توان تا ۴۸ ساعت بدون آسیب معنی‌دار DNA در محلولهای L-15 و یا FBS تحت شرایط دمایی ۴ درجهٔ سانتی‌گراد تاریکی نگهداری کرد که این امر امکان انجام پایش زیستی اکوسیستم‌های آبی با بایومارکر مولکولی را با استفاده از ماهیان در شرایط میدانی مهیا می‌کند و تا حد زیادی سبب افزایش دقت و اعتبار این‌گونه مطالعات بایومارکری خواهد شد.

1. Hanks Balanced Salt Solution
2. Roswell Park Memorial Institute

Archive of SID

www.SID.ir

Reference

1. Anderson D, Yu T W, Phillips B, Schmezer P (1994) "The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 307: 261-271.
2. Anderson D, Yu T W, Dobrzy ska M M, Ribas G, Marcos R (1997) "Effects in the comet assay of storage conditions on human blood," *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 17: 115-125.
3. Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M (1998) "Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish," *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 415: 167-184.
4. Bols N, Dayeh V, Lee L, Schirmer K (2005) "Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology," *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 6: 43-84.
5. Conrad K F, Robertson R, Boag P (2000) "Difficulties storing and preserving tyrant flycatcher blood samples used for genetic analyses," *The Condor*, 102: 191-193.
6. Dawson M N, Raskoff K A, Jacobs D K (1998) "Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses," *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 7: 145-152.
7. Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D (2009) "Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models," *Cell biology and toxicology*, 25: 5-32.
8. Dizer H, Wittekindt E, Fischer B, Hansen P D (2002) "The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers," *Chemosphere*, 46: 225-233.
9. Frenzilli G, Nigro M, Lyons B P (2009) "The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments," *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681: 80-92.
10. Hartl M G J, Grigson S J W, Sinet E (2010) "Maintenance of bivalve hemocytes for the purpose of delayed DNA strand break assessment using the comet assay," *Environmental and molecular mutagenesis*, 51: 64-68.
11. Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Wada K, Kinae N, Saotome K, Tanaka N, Takai A, Sasaki Y, Asano N (1998) "Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399: 125-133.
12. Hussein H, Amer R, Gaballah A, Refaat Y, Abdel-Wahab A (2008) "Pollution Monitoring for Lake Qarun," *Advances in Environmental Biology*, 2: 70-80.
13. Jha A N (2008) "Ecotoxicological applications and significance of the comet assay," *Mutagenesis*, 23: 207-221.
14. Konca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gózdz S, Koza Z, Wojcik A (2003) "A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay," *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534: 15-20.
15. Kor D J, Van Buskirk C M, Gajic O (2009) "Red blood cell storage lesion," *Bosn J Basic Med Sci*, 9: 21-27.
16. Lakra W, Swaminathan T R, Joy K (2011) "Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review," *Fish Physiology and Biochemistry*: 1-20.
17. Lee R, Steinert S (2003) "Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals," *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544: 43-64.
18. Mitchelmore C, Chipman J (1998) "DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399: 135-147.
19. Narayanan S, O'Donovan M, Duthie S (2001) "Lysis of whole blood in vitro causes DNA strand breaks in human lymphocytes," *Mutagenesis*, 16: 455.
20. OECD (1992) *Guideline for the testing of chemicals*: (Part 203). Organisation for Economic Co-operation and Development. Adopted by the Council on July 17, 1995.

Archive of SID

www.SID.ir

21. Olivier H M, Dale R, Jenkins J A (2011) "Blood Samples Stabilized in the Field for Laboratory Analyses after 24 Hours," *American Fisheries Society 141st Annual Meeting*, Seattle, Washington.

22. Pérez-Camps M, García-Ximénez F (2008) *Osmolarity and composition of cell culture media affect further development and survival in zebrafish embryos*, Animal-Cambridge University Press, 2: 595.

23. Potts W T W, Parry G (1964) Osmotic and ionic regulation in animals. Osmotic and ionic regulation in animals.

24. Ramsdorf W A, Guimarães F S F, Ferraro M V M, Gabardo J, Trindade E S, Cestari M M (2009) "Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry," *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 673: 78-81.

25. Schirmer K, Chan A, Greenberg B, Dixon D, Bols N (1997) "Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture," *Toxicology in vitro*, 11: 107-113.

26. Scott K L, Lecak J, Acker J P (2005) "Biopreservation of red blood cells: past, present, and future," *Transfusion Medicine Reviews*, 19: 127-142.

27. Valverde M, Rojas E (2009) "Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay," *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681: 93-109.

Archive of SID

www.SID.ir