

بررسی شرایط مناسب برای نگهداری نمونه خون ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با هدف پایش زیستی توسط سنجش کامت

سعید مودی^۱، حمید فرحمند^{۲*}، علیرضا میرواقفی^۳، علی اصغر کوثری^۴، بیتا خلیلی^۵

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

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

۴. مربی گروه گیاه پزشکی دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی دانشگاه تهران - کرج

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۴)

چکیده

پایش زیستی از عمده ترین راه های بررسی وضعیت آلودگی در اکوسیستم های آبی است که در آن به منظور ردیاب آثار آلاینده ها بر آبزیان از بایومارکرها در سطوح گوناگون استفاده می شود. از آنجاکه امروزه بسیاری از آلاینده های زیست محیطی جهش زا شناخته می شوند، پژوهش پیرامون تأثیر حضور این گونه مواد در اکوسیستم های آبی به کمک بایومارکرها زئوتوکسیک توجه زیادی را به خود معطوف کرده است. اما یکی از مشکلات اساسی در این زمینه نگهداری مناسب نمونه های بیولوژیک و انتقال بدون آسیب آن ها به آزمایشگاه است. برای این منظور نیاز است برای اجتناب از بروز خطای آزمایش جهت بررسی آسیب DNA با هدف تحلیل وضعیت زیست گاه شرایط مناسب بررسی و استاندارد سازی شود. بنابراین، در این تحقیق از سنجش کامت به منزله روشی نوین در زمینه مطالعات بایومارکر مولکولی - که بر مبنای اندازه گیری آسیب های منعکس شده به صورت شکست رشته ای در سلول هاست - برای بررسی اثر مقایسه ای سه محلول نگهداری (FBS، L-15 و PBS) بر یکپارچگی DNA نمونه سلول های خون ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در زمان های گوناگون پس از خون گیری (۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) استفاده شد. درصد بقای سلول ها نیز در فواصل زمانی مورد نظر با روش رنگ آمیزی تریپان بلو محاسبه شد. نتایج سنجش کامت بر روی نمونه های خون نگهداری شده در محلول های L-15 و FBS تفاوت معنی داری را در میزان آسیب DNA بین زمان های مورد نظر نشان نداد، در حالی که نمونه های نگهداری شده در PBS از ۲۴ ساعت پس از شروع نگهداری افزایش معنی دار سطح آسیب DNA را نسبت به زمان صفر (به منزله شاهد) نشان دادند ($P < 0.05$). طبق این نتایج به نظر می رسد مهم ترین عامل در حفظ بقای گلبول های قرمز طی نگهداری در محلول های گوناگون اسمولاریتی محیط نگهداری باشد. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان می دهد که نمونه های خون ماهی آب شیرین را می توان تا ۴۸ ساعت بدون آسیب معنی دار DNA در محلول های L-15 و یا FBS تحت شرایط دمایی ۴ درجه سانتی گراد تاریکی نگهداری کرد.

واژگان کلیدی

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

۱. مقدمه

حساسیت بالایی که دارد استفاده از آن برای مطالعات سمی بودن حاد و مزمن به منزله بایواندیکاتور توصیه شده است (OECD, 1992) و به همراه ماهی مداکای ژاپنی (*latipes Oryzias*) به صورت گسترده‌ای به مثابه 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 در نتیجه DNA است. تهیه نمونه زیاد DNA از مقدار بسیار کمی از خون ماهی نسبتاً آسان است و نیازی به جداسازی سلولی ندارد. علاوه بر این، 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 یک پارچگی DNA در مدل‌های گوناگون آزمایشگاهی سنجش کامت^۴ 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 زمینه بوم‌شناسی^۵ شود (Frenzilli et al., 2009). این رویکرد فرصت مطالعه آسیب ساختاری DNA را در تک تک سلول‌ها، بدون اطلاع قبلی از کاربوتایپ و نرخ جاگردی سلول که در روش‌های ریزهسته^۶ و تبادل کروماتید خواری^۷ مورد نیاز بود، مهیا ساخته است (Belpaeme et al., 1998). با وجود این، تاکنون فقدان روش‌های مناسب برای نگهداری و انتقال نمونه‌های خون ماهیان به صورت سالم و آسیب‌نندیده، با هدف آنالیز شکست رشته 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 al., 2009).

پایش زیستی^۱ یکی از موضوعات مهم در حیطه علوم محیط‌زیستی محسوب می‌شود و از عمده‌ترین راه‌های بررسی وضعیت آلودگی است که امروزه به طور 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 ثانویه آلاینده‌ها می‌پردازد و وضعیت بیولوژیک آب‌زی را جهت ارزیابی سلامت آب‌زیان و نهایتاً اکوسیستم آبی بررسی می‌کند و به وسیله آن تغییرات اکوسیستم‌های آبی به سرعت 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 اولیه بیولوژیکی، پاسخ‌ها زودتر مشاهده پذیرند و اختصاصیت پاسخ‌ها از عوامل تنش‌زا بیشتر است. به علاوه، در آن‌ها مشکلات جداسازی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم وجود ندارد. از آنجاکه 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، به دلیل اینکه محیط‌های آبی مقصد نهایی بیشتر مواد ژنوبایوتیک‌اند، گونه‌های آب‌زی و مشخصاً ماهیان در مواجهه همیشگی با آلاینده‌هایند و به طور جدی تحت تأثیر این مواد قرار دارند. بنابراین، استفاده از این موجودات به مثابه شاخص زیستی^۳ آثار آلودگی حائز اهمیت است و می‌تواند 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 به دلیل

4. Comet assay

5. Ecotoxicology

6. Micronucleus

7. Sister chromatid exchange

1. Biomonitoring

2. Xenobiotic

3. Bioindicator

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 به کار 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 گلوبول 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)^۲، سرم جنین گاوی (FBS)^۳ و محیط کشت L-15^۴ برای نگهداری کوتاه‌مدت نمونه 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 اینویترورژن تهیه شد.

۲.۱. نمونه‌گیری و شرایط نگهداری

شش عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با وزن متوسط ۱۰۰ گرم پس از یک هفته آدپتاسیون در شرایط نرمال برای آزمایش استفاده شدند. خون‌گیری از هر ماهی پس از بیهوش کردن با پودر گل می‌خک از ساقه دمی به وسیله سرنگ هیپارینه صورت گرفت. سطح آسیب پایه‌ای DNA^۵ و بقای سلولی بلافاصله پس از خون‌گیری (زمان صفر به‌منزله گروه شاهد) تعیین شد. برای تهیه تیمارهای آزمایشی، ۱۰ μl خون از

اخیراً پیشنهاد شده است که حفظ و نگهداری موقت از نمونه‌های سوسپانسیون زنده 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). اماطی نگهداری کوتاه‌مدت، تغییرات متعددی در ترکیب خون و محصولات خونی سلولی رخ می‌دهد. تغییرات بیوشیمیایی ذخیره‌شده در گلوبول‌های قرمز اغلب به کاهش سطح آدنوزین تری‌فسفات (ATP) و ۲،۳ دی‌فسفوگلیسرات (DPG) و همچنین کاهش دگردیس‌پذیری^۱ گلوبول‌های قرمز مربوط است (Kor et al., 2009). به‌علاوه گلوبول قرمز گرفته شده ممکن است به‌صورت خودبه‌خودی اکسید شود و به تدریج به مت‌هموگلوبین تبدیل شود. از طرف دیگر DNA سلول به‌شدت مستعد تخریب به‌وسیله 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 در نتیجه 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 محدوده فیزیولوژیکی مورد نیاز نگه دارد (Hartl et al., 2010). از جمله محیط‌های نگهداری می‌توان سرم جنین گاوی (FBS) را نام برد که به‌دلیل خصوصیات ترکیباتش محیط مناسبی برای نگهداری نمونه‌ها گزارش شده است، زیرا منبعی غنی از پروتئین‌ها، فاکتورهای رشد، اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها، یون‌ها و 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 از آنجاکه نیازی به تعویض CO₂ ندارد در

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

1. Deformability

شده بود. لام‌های حاوی نمونه در محلول بافر لیزکننده (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 درجه 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 درجه سانتی‌گراد انجام شد (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^۴ (DNAT%) است (Konca et al., 2003) که طبق معادله^۲ با نرم‌افزار Comet V 1.5 ScoreTM ارزیابی شد؛ در این معادله T دنباله^۵ و H سر^۶ کامت است.

(معادله ۲)

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

۴.۲. آنالیزهای آماری

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

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 درجه 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^۱ 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^۲ 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 معادله^۱ درصد زنده ماندن سلول‌ها محاسبه شد (Anderson et al., 1994).

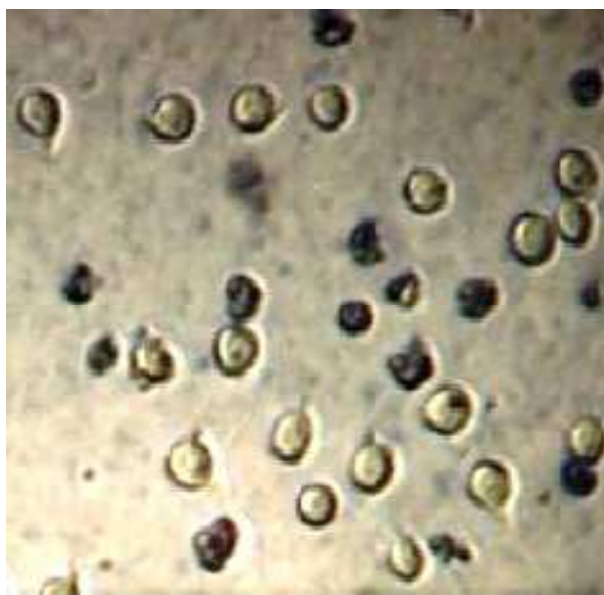
$$\text{(معادله ۱)} \quad \% \text{ بقا} = \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{کل سلول های شمارش شده}} \times 100$$

۳.۲. سنجش یکپارچگی DNA

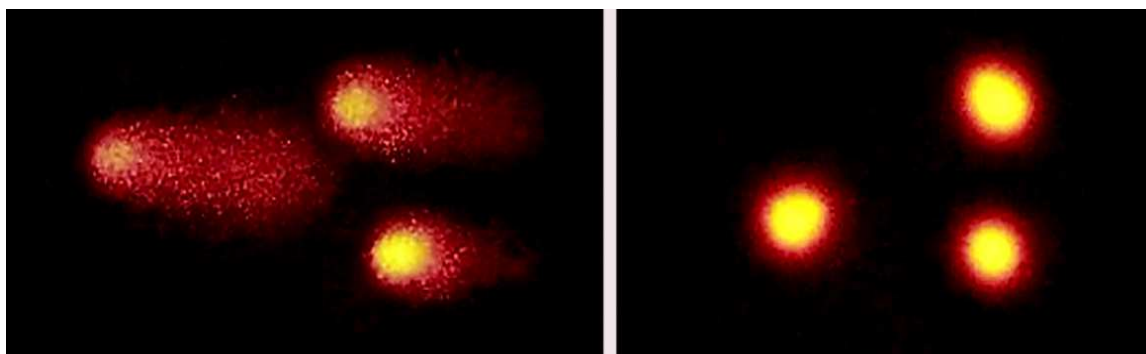
اندازه‌گیری آسیب DNA در سلول‌های خونی ماهی به روش سنجش کامت قلیایی با اندکی اصلاحات صورت گرفت (Mitchelmore & Chipman, 1998). به‌طور خلاصه در زمان‌های مورد نظر، سوسپانسیون گلبول قرمز موجود در محلول‌های نگهداری با آگارز ۰/۵ درصد (w/v) نقطه ذوب پایین^۳ به نسبت ۱:۱۲ مخلوط شد، سپس روی لام‌های پوشش‌داری ریخته شد که از قبل تهیه

4. Percent tail DNA
5. Tail
6. Head

1. Trypan blue exclusion
2. Haemocytometer
3. Low Melting Point Agarose



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 به صورت ستاره‌دنباله‌دار مشاهده می‌شوند که هر چه طول دنباله بیشتر باشد، درصد آسیب DNA بیشتر است)

از ۱۲ ساعت پس از شروع نگهداری، در مقایسه با گروه شاهد، کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) 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).

۳. نتایج

براساس آنالیزهای آماری تأثیر فاکتورهای زمان و محیط نگهداری روی بقای سلولی معنی‌دار بود ($P < 0/05$)، 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،

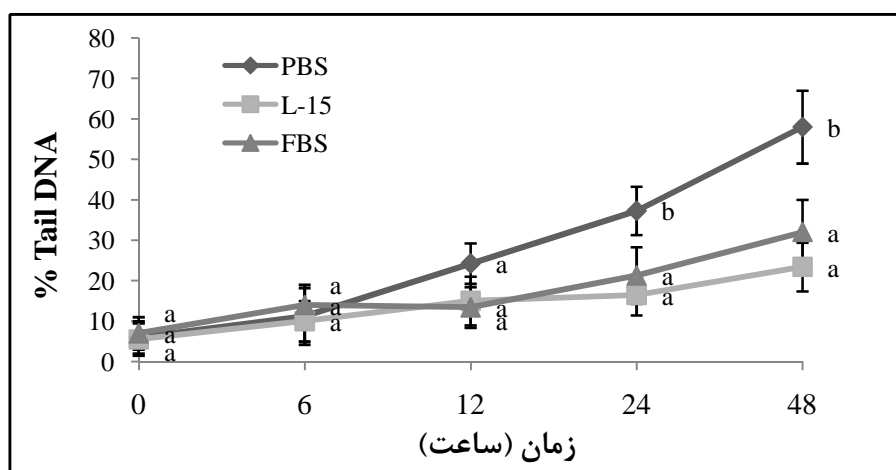
جدول ۱. میانگین درصد بقای سلولی در نمونه‌های خون تازه (شاهد) و نگهداری شده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

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

مقادیر با حروف الفبای بالانویس متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P < 0/05$) در فواصل زمانی است. (میانگین ± انحراف معیار)

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 نگهداری شده در محیط‌های L-15 و FBS با گذشت زمان افزایش معنی‌داری از زمان صفر (شاهد) پیدا نکرد، در حالی که نمونه‌های نگهداری شده در PBS، از ۲۴ ساعت پس از شروع نگهداری، افزایش شاخص سطح آسیبیها را نشان دادند ($P < 0/05$) (شکل ۳).

آسیب DNA در گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به صورت 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 ($P < 0/05$). 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



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

۴. بحث و نتیجه‌گیری

۴.۱. بقای سلولی

سمی بودن سلولی^۱ 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 به شدت 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 غنی شده 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)^۲ جلوگیری کند. از این رو در مطالعات سم‌شناسی این ویترو روی تیره‌های سلولی آب‌زیان معمولاً محیط کشت پایه L-15 به همراه ۱۰ درصد FBS مورد استفاده قرار می‌گیرد (Schirmer et al., 1997). از طرف دیگر درصد بقای سلول‌های نگهداری شده با درجه 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 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند که با توجه به نتایج بقای سلولی در محیط‌های FBS و L-15 (جدول ۱)، به نظر 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 مطالعه ما PBS بالاترین شمار سلول‌های مرده را در مقایسه با دو محیط نگهداری دیگر داشت که ممکن است به علت اسمولاریته 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 در نهایت درصد بقای سلولی کاهش یابد (Ramsdorf et al., 2009). اسمولاریتی محیط‌های نگهداری FBS و L-15 به ترتیب ۳۲۲ و ۳۱۵ mM است که مشابه خون ماهیان آب شیرین (برای مثال Potts & Parry, ۱۹۹۲) در *Salmo trutta* (Pérez-Camps & García, ۱۹۶۴) است (Ximénez, 2008; Ramsdorf et al., 2009).

۴.۲. آسیب DNA

به علت افزایش توجه به استفاده از روش سنجش کامت در مطالعات پایش زیستی میدانی^۳، تطبیق و بهبود تکنیک‌های نگهداری نمونه‌های بیولوژیک جمع‌آوری شده 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 لایزاس 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 فیزیکی‌وشیمیایی 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 نگهداری شده در PBS در مقایسه با FBS و L-15 نشان داد. به‌طور مشابه، مطالعه 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

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. به عبارت 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 نگهداری شده در محیط FBS حضور ممانعت‌کننده‌های پروتئازی به علت 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 مطالعه 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. در مجموع، نمونه‌های خون ماهی آب شیرین را می‌توان در ۴۸ ساعت بدون آسیب معنی‌دار DNA در محلول‌های L-15 و یا FBS تحت شرایط دمایی ۴ درجه 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.

نگهداری شده در FBS کمترین آسیب را دیده بودند و پس از آن PBS و EDTA در رتبه‌های بعدی قرار داشتند (Ramsdorf *et al.*, 2009). در مطالعه دیگری روی سلول‌های هموسایت صدف، تفاوت زیادی در صدمه به DNA بین سلول‌های نگهداری شده در محیط‌های HBSS^۱ و L-15 در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مشاهده نشد و نتیجه گرفتند هر دو این محیط‌ها برای نگهداری هموسایت صدف *M. edulis* در شرایط مناسب به منظور 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 نمونه‌های خون گربه‌ماهی (*Ictalurus punctatus*) را که در دماهای ۴ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از سه محلول نگهداری گوناگون شامل یک محلول تجاری تثبیت کننده 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 در نهایت، محلول تثبیت کننده اثر محافظتی بهتری را روی سلول‌های خونی به منظور 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 درجه سانتی‌گراد به مدت چهار روز در محیط کشت RPMI 1640^۲ نگهداری شده بود، تغییراتی مشاهده نکردند و این زمان

Reference

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Wada K, Kinai 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.
- Hussein H, Amer R, Gaballah A, Refaat Y, Abdel-Wahab A (2008) "Pollution Monitoring for Lake Qarun," *Advances in Environmental Biology*, 2: 70-80.
- Jha A N (2008) "Ecotoxicological applications and significance of the comet assay," *Mutagenesis*, 23: 207-221.
- Konca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gózdź 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.
- Kor D J, Van Buskirk C M, Gajic O (2009) "Red blood cell storage lesion," *Bosn J Basic Med Sci*, 9: 21-27.
- 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.
- 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.
- 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.
- Narayanan S, O'Donovan M, Duthie S (2001) "Lysis of whole blood in vitro causes DNA strand breaks in human lymphocytes," *Mutagenesis*, 16: 455.
- 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.

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.