magiran.com

بررسی اثرات میتوژنی فیتوهماگلوتینین (PHA-P) و لیپوپلی ساکارید (LPS) استخراج شده از باکتری *E. coli* بر شاخص میتوزی لنفوسیتهای کشت داده شده تاسماهی شیپ (*Acipenser nudiventris*) دریای خزر

محمدرضا نوروزفشخامی [۱]*؛ شیلا صفائیان [۲]؛ محمود بهمنی [۳] و فروزان چوبیان [٤]

۱، ۳ و ٤- انستیتوتحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت صندوق پستی ٣٤٦٤-٤١٦٣٥

۲- دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، خیابان شهید فلاحی، پلاک ١٤، کد پستی: ١٩٨٧٩٧٤٦٣٥

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۸۷　　تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۸۸

لغات کلیدی: شاخص میتوزی، تاسماهی شیپ، *Acipenser nudiventris*، PHA-P، LPS

به‌رغم کاربردها و مزایای فراوان کشت لنفوسیتهای خون در ماهیان، پایین بودن شاخص میتوزی در لنفوسیتهای کشت داده شده یکی از مشکلات موجود در این روش می‌باشد که این مشکل را با افزودن مواد محرک تقسیمات میتوزی میتوژن می‌توان تا حد زیادی برطرف نمود. البته در این ارتباط نوع و غلظت مواد میتوژن مورد استفاده بسیار مهم می‌باشد. پس از اینکه Nowell در سال ۱۹۶۰کشف کرد ماده فیتوهماگلوتینین می‌تواند تقسیمات میتوزی را در لنفوسیتهای انسان تحریک کند، بعدها محققین مختلف این ماده را بعنوان ماده میتوژن در کشت لنفوسیتهای ماهیان مختلف از جمله تاسماهی سفید *Acipenser transmontanus* (Eenennaam *et al.*, 1998)، ماهی ازون‌برون *Acipenser stellatus* و فیلماهی *Huso huso* (Nowruzfashkhami & Khosroshahi, 1999)، تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* (Nowruzfashkhami *et al.*, 2000)، ماهی بستر (*Huso huso* × *Acipenser sturio*) و تاسماهی سفید (Fujiwara *et al.*, 2001) بکار بردند. تعدادی از محققین نیز ماده LPS را بدین منظور استفاده کردند.

در این تحقیق ضمن بدست آوردن بیشترین شاخص میتوزی در لنفوسیتهای کشت داده شده تاسماهی شیپ با استفاده از دو ماده میتوژن فیتوهماگلوتینین (PHA-P) و ماده لیپوپلی ساکاریدی (LPS) استخراج شده از باکتری *E. Coli*، روش کشت گلبولهای سفید خون این ماهی نیز به منظور بدست آوردن تعداد زیادی گسترش کروموزومی با کیفیت مناسب بهینه گردید.

برای انجام آزمایشات تعداد۲۰ عدد ماهی شیپ دو ساله با میانگین وزنی (± انحراف استاندارد) ۵۳/۵۶±۱۳۷/۲۸ گرم و میانگین طولی (± انحراف استاندارد) ۴/۳±۳۲/۱۵ سانتیمتر بطور تصادفی جدا و در یک وان فایبرگلاس۵۰۰ لیتری نگهداری شدند. به منظور تعیین شاخص میتوزی ابتدا بوسیله یک سرنگ ۲ میلی‌لیتری حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر ماده ضد انعقاد هپارین سدیم (۵۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) از رگ ساقه دمی ماهیان مورد آزمایش خونگیری شد. سپس تعداد لکوسیتهای هر ماهی با استفاده از لام هموسیتومتر (نئوبار تکمیل شده) و طبق روش کار عامری مهابادی (۱۳۷۸) تعیین شد. از آنجاییکه از بین لکوسیتها فقط لنفوسیتها قادر به تکثیر در محیط کشت (*in vitro*) می‌باشند لذا تعداد لنفوسیتهای هر ماهی نیز از طریق شمارش افتراقی لکوسیتها در گسترشهای خونی تهیه شده، مشخص گردید. سپس کشت گلبولهای سفید خون ماهیان مورد آزمایش نیز طبق روش بکار برده شده برای تاسماهی ایرانی با کمی تغییر انجام شد (Nowruzfashkhami *et al.*, 2000). بدین ترتیب که ابتدا محیط کشت اختصاصی {۴ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI- 1640 (Sigma) + ۱ میلی‌لیتر سرم جنین گاو (FBS) (دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران)، مواد میتوژن: PHA-P (Sigma) یا LPS (Sigma) با مقادیر صفر، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ میکروگرم یا ۲۰۰ میکروگرم PHA-P (Sigma) + ۴۰۰ میکروگرم LPS (Sigma)، ۵۰۰ واحد پنی‌سیلین پتاسیم G (Sigma)، ۵۰۰ میکروگرم استرپتومایسین سولفات (Sigma)،

* نویسندهٔ مسئول: Nowruzfashkhami@yahoo.com

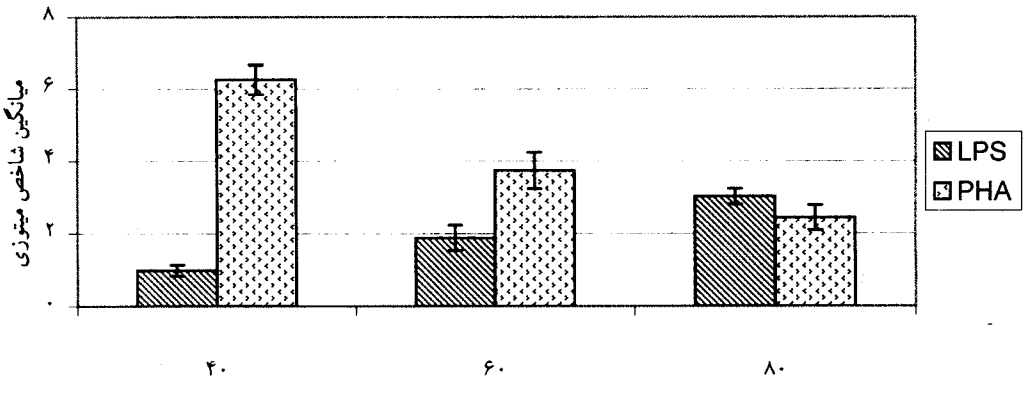
magiran.com

۵۰۰ میکروگرم کانامایسین سولفات (Sigma)} تهیه و استریل شد. با توجه به کسب تجارب قبلی در مورد کشت لکوسیتهای سایر تاسماهیان، در محیط کشتهای مورد استفاده از مقادیر مختلف PHA-P، LPS استخراج شده از باکتری *E. coli* و تلفیقی از مؤثرترین غلظت این دو ماده استفاده شد. سپس ۲ تا ۳ قطره خون به محیط کشت مذکور اضافه گردید و نمونه‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد (داخل انکوباتور) قرار داده شدند. بعد از گذشت تقریباً ۵ روز (۱۲۰–۱۱۰ ساعت) به نمونه‌ها کلشی سین (۰/۵میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد و بعد از گذشت ۴/۵ ساعت نمونه‌ها سانتریفوژ شدند. سپس لکوسیتها با محلول کلرید پتاسیم ۰/۰۷۵ مولار هیپوتونیز و با محلول اسید الکل (محلول کارنوی) تثبیت شدند. در نهایت اقدام به تهیه لام و شمارش گسترشهای کروموزومی موجود در لامها گردید. در این تحقیق تعداد گسترشهای کروموزومی بدست آمده نمایانگر تعداد سلولهای در حال تقسیم (لنفوسیتهای متافازی) بودند. درصد شاخص میتوزی (MI) برای هر یک از ماهیان مورد آزمایش و به ازای غلظتهای مختلف مواد میتوژن PHA-P، LPS و {PHA (۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) + LPS (۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)} محاسبه و نتایج به منظور بررسی اثرات میتوژنی دو میتوژن مذکور با هم مقایسه شد.

به منظور تعیین شاخصهای میتوزی درصد نسبت سلولهای در حال تقسیم (لنفوسیتهای متافازی) به تعداد کل سلولهای (لنفوسیتها) کشت داده شده محاسبه گردید (Howell *et al.*, 2007). برای مقایسه شاخصهای میتوزی بدست آمده در صورت استفاده از مقادیر یک نوع میتوژن (PHA یا LPS) از آزمون ناپارامتری کروکسال وآلیس و برای مقایسه درصد شاخصهای میتوزی حاصل از میتوژنهای مختلف از آزمون چند دامنه توکی استفاده شد.

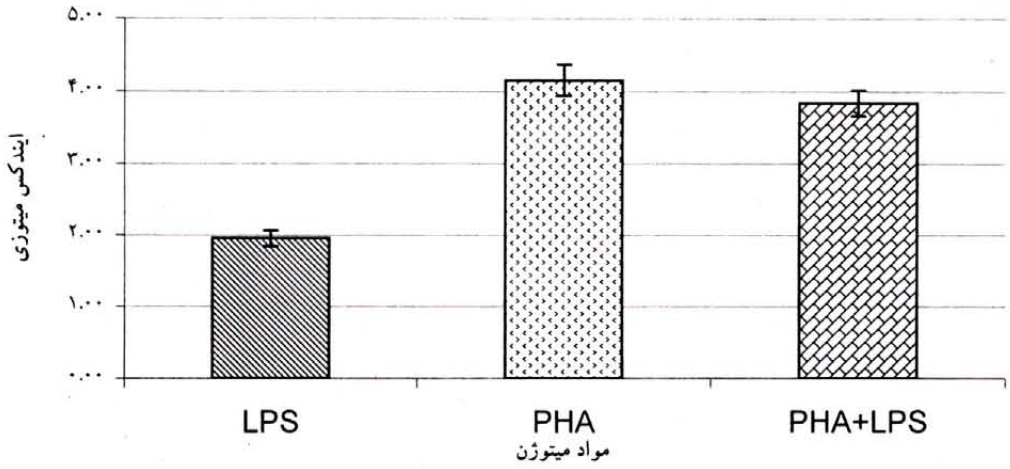
نتایج کسب شده نشان داد حداقل، حداکثر و میانگین شاخصهای میتوزی در ماهیان مورد آزمایش به هنگام استفاده از: صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر ماده PHA-P بترتیب صفر، ۰/۲۰و ۰/۰۵±۰/۱۱ درصد، ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ماده PHA-P بترتیب ۵/۶۸، ۷/۱۸ و ۰/۴۱±۶/۲۶ درصد، ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ماده PHA-P بترتیب ۲/۸۹، ۵/۱۴ و ۰/۵±۳/۷۴ درصد، ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ماده PHA-P بترتیب ۱/۹۵، ۳/۰۹ و ۰/۳۴±۲/۴۴ درصد بود. حداقل، حداکثر و میانگین شاخصهای میتوزی در ماهیان مورد آزمایش به هنگام استفاده از: صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر ماده LPS بترتیب ۰/۰۵، ۰/۱۱ و ۰/۰۲±۰/۰۸درصد، ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ماده LPS بترتیب ۰/۷۸، ۱/۴۸ و ۰/۱۵±۰/۹۹ درصد، ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ماده LPS بترتیب۱/۳۰، ۲/۴۲ و ۰/۳۵±۱/۸۸ درصد،۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ماده LPS بترتیب ۲/۵۶، ۳/۴۸ و ۰/۲۲±۳/۰۲ درصد بود. حداقل، حداکثر و میانگین شاخصهای میتوزی در ماهیان مورد آزمایش به هنگام استفاده از {PHA-P (۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) + LPS (۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)} بترتیب ۲/۸۵، ۴/۸۸ و ۰/۵۸±۳/۸۴ درصد بود (نمودارهای ۱ و ۲).

با بررسی نتایج کسب شده مشخص گردید در صورت استفاده از ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ماده PHA-P در محیط کشت بیشترین شاخص میتوزی در نتیجه بیشترین گسترش کروموزومی تولید شد (شکل ۱).

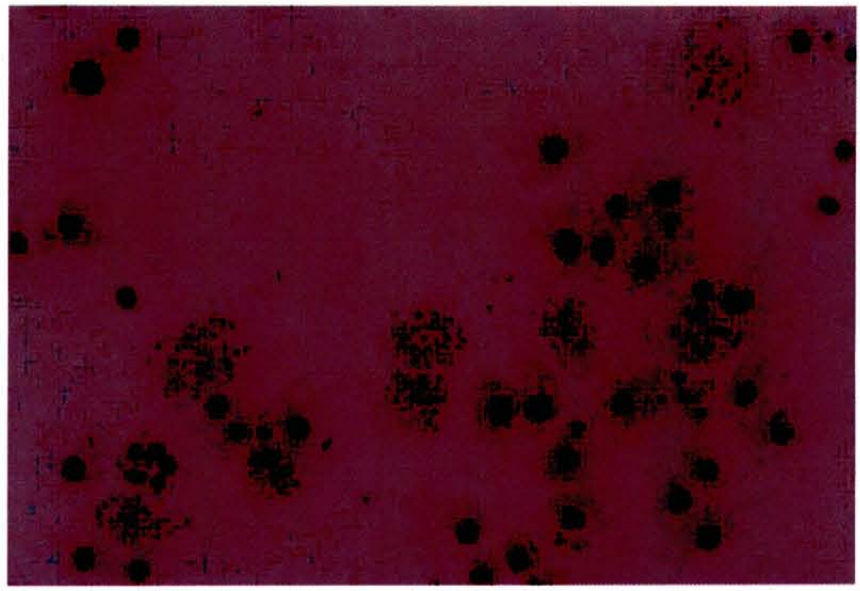


نمودار ۱ : مقایسه شاخصهای میتوزی برحسب غلظتهای مختلف مواد میتوژن مورد استفاده

magiran.com



نمودار۲ : مقایسه شاخصهای میتوزی با توجه به انواع مواد میتوژن مورد استفاده



شکل ۱: گسترشهای کروموزومی ماهی شیپ (۲۰۰× ، رنگ آمیزی شده با گیمسا)

بررسی نتایج کسب شده نشان داد استفاده از ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ماده PHA-P در محیط کشت بیشترین شاخص میتوزی را در ماهیهای مورد آزمایش تولید نمود. با افزایش غلظت این ماده میزان شاخص میتوزی کاهش یافت و با کاهش غلظت آن تقسیمات میتوزی در لنفوسیتهای کشت داده شده متوقف شد (نمودار ۱). در مورد LPS نیز شخص گردید مصرف ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از این ماده باعث تولید بیشترین شاخص میتوزی (MI = ۳/۰۲) در ماهیهای مورد آزمایش گردید. با افزایش غلظت این ماده تقسیمات میتوزی در لنفوسیتهای کشت داده شده متوقف شد و با کاهش غلظت آن شاخص میتوزی نیز کاهش یافت (نمودار ۱). همچنین مشخص شد در صورت استفاده از غلظتهای یکسان هر کدام از دو میتوژن نام برده شده در محیط کشت به تنهایی، میزان شاخص میتوزی به هنگام استفاده از PHA-P بیش از زمانی بود که از همان مقدار LPS استفاده شد (نمودار ۲). با توجه به اینکه مواد PHA-P و LPS محرک تقسیمات میتوزی بترتیب در لنفوسیتهای T و B معرفی شده‌اند (Fujiwara *et al.*, 2001) بنابراین شاید بتوان نتیجه گرفت میزان لنفوسیتهای T در

magiran.com

ماهیهای مورد آزمایش تحقیق حاضر بیش از لنفوسیتهای B بود که البته اثبات این فرضیه مستلزم انجام مطالعات تخصصی در زمینه شناسایی و تعیین تعداد لکوسیتهای T و B ماهی شیپ می‌باشد.

بطورکلی تحت شرایط نامساعد محیطی، به منظور ارتقای سیستم ایمنی بدن تعداد لکوسیتها از جمله لنفوسیتهای ماهیها افزایش می‌یابد. عوامل زیادی از جمله دما، جیره غذایی، جنسیت، سن و آلودگیهای میکروبی باعث تغییر در تعداد لکوسیتهای ماهیان می‌گردند (Gail Nussey *et al.*, 1995). شرایط پرورش از جمله میزان تراکم نیز بنوبه خود در تغییرات تعداد لنفوسیتهای ماهیان موثر است (Palikova *et al.*, 1999). با توجه به اینکه لنفوسیتهای T در این ارتباط نقش اساسی را ایفا می‌کنند (Eliss, 1981) لذا شاید بتوان نتیجه گرفت تعداد لنفوسیتهای T در ماهیان مورد آزمایش تجربه حاضر به سبب شرایط نامساعد محیطی زیاد بود. عده‌ای از محققین نیز معتقدند تغییرات میزان شاخص میتوزی در لنفوسیتهای ماهیان می‌تواند یک صفت وابسته به گونه باشد. لذا عکس‌العمل لنفوسیتهای کشت داده شده متعلق به چند گونه به یک میتوژن خاص ممکن است متفاوت باشد (Liews & Van Dam, 1982 ;Wang *et al.*, 1997; Miller, 1982 برگرفته از: Fujiwara *et al.*, 2001). همچنین طی این تحقیق مشخص شد مقدار شاخص میتوزی در صورت استفاده از (۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فیتوهماگلوتینین + ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ماده لیپوپلی ساکارید) کمتر از مقداری است که فقط از موثرترین غلظت PHA-P (MI = ۶/۲۶) و بیشتر از مقداری است که فقط از موثرترین غلظت LPS (MI = ۳/۰۲) به تنهایی استفاده شود (MI =۳/۸۴، نمودار ۲). در واقع افزودن ماده LPS باعث کاهش اثرات میتوژنی ماده PHA-P شد. برخی از محققین معتقدند مواد میتوژنی می‌توانند بر روی هم اثر ممانعت کنندگی داشته باشند. چنین حالتی در مورد انسان گزارش شده است (Sofuni & Yashida, 1992).

منابع

عامری مهابادی، م. ، ۱۳۷۸. روشهای آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۲۶ صفحه.

Eenennaam A.L., Murray J.D., and Medrano J.F., 1998. Mitotic analysis of the North American white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson (Pisces, Acipenseridae) a fish with a very high chromosome number. Genome, Vol. 41, No. 2, pp. 266–271.

Ellis A.E., 1981. Stress and modulation of defense mechanisms in fish. *In*: A.D. Pickering (ed.). Stress and fish. Academic Press, London, UK. pp.147-169.

Fujiwara A., Nishida-Umehara C., Sakamoto T., Okamoto N., Nakayama I. and Abe S., 2001. Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. Genetica, 111:77-89.

Gail Nussey J.H., Van Vuren J. and du Preez H.H., 1995. Effect of copper on the differential white blood cell counts of the Mosambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Vol. 111, Issue 3, pp.381-388.

Howell W.M., Keller III G.E., Kirkpatrick J.D., Jenkins R.L., Hunsinger R.N. and McLaughlin E.W., 2007. Effects of the plant steroidal hormone, 24-epibrassinolide, on the mitotic index and growth of onion (*Allium cepa*) root tips. Genetics and Molecular Research, Vol. 6, No. 1, pp.50-58.

Nowell P.C., 1960. Phytohaemaglutinin an initiator of mitosis in cultures of normal human lymphocytes. Cancer Research, 10:462-468.

Nowruzfashkhami M.R. and Khosroshahi M., 1999. Karyotype study on stellate and great sturgeon by leukocyte culture. Journal of Applied Ichthyology, Vol. 15, No. 4-5, 283P.

Nowruzfashkhami M.R., Pourkazemi M. and Baradarannoveiri S., 2000. Chromosome study of Persian Sturgeon. *Acipenser persicus* B. Cytologia, 65:197-202.

magiran.com

Palikova M., Mares J. and Jirasek J., 1999. Characteristics of leucocytes and thromobocytes of selected sturgeon species from intensive breeding. Acta Veterinaria Brno, 68:259-264.

Sofuni T. and Yoshida M.C. 1992. Combined use of several mitogens for mitotic stimulation to human lymphocytes. Journal of Radiation Research Supplement, 33:222-230.

magiran.com

Iranian Scientific Fisheries Journal Short Communication Vol. 18, No. 3, Autumn 2009

Mitogenic effects of phytohemagglutinin (PHA-P) and lipopolysacharide extracted from *E.coli* on cultured lymphocyte of the Caspian Sea ship sturgeon *(Acipenser nudiventris)*

Nowruzfashkhami M.R.[(1)*]; Safaiian S.[(2)]; Bahmani M.[(3)] and Chubian F.[(4)]

1,3 & 4- International Sturgeon Research Institute, P.O. Box 41635-3464, Rasht, Iran

2- Faculty of Marine Sciences and Technology, Azad Islamic University, No. 14, Shahid Falahi Ave., Zip cod: 19877974635, Tehran, Iran

Received: June 2008 Accepted: October 2009

Keywords: Mitosis Index, Ship sturgeon, *Acipenser nudiventris*, PHA-P, LPS

Abstract

The present study was designed to obtain the most effective dose for phtytohemagglutinin (PHA-P) and lipopolysaccharide (LPS) extracted from *E. coli* to optimize the lymphocyte culture method, the highest mitotic index (MI) and metaphase plates number of ship sturgeon, *Acipenser nudiventris*. Twenty specimens of two-year old *A. nudiventris* weighing on average 137g and with an average length of 32cm were used in this study. Different doses (0, 40, 60 and 80μgml^{-1}) of PHA-P, LPS and a combination of the most effective dose of both mitogenic factors {(40μgml^{-1}) PHA-P + (80μgml^{-1}) LPS} were added to the culture media and mitotic indices were calculated for each treatment.

Results indicated that a dose of 40$\mu g\ ml^{-1}$ PHA-P and 80$\mu g\ ml^{-1}$ LPS produced the highest MI (6.26 and 3.02 respectively). Using higher concentrations of PHA-P and LPS resulted in decreased MI, whereas at lower doses of these mitogenic factors, mitotic arrest of cultured lymphocytes was observed. Using a combination of the most effective dose of the two mentioned mitogens {(40μgml^{-1}) PHA-P + (80μgml^{-1}) LPS} yielded a MI of about 3.84. A dose of 40ug ml^{-1} PHA-P produced the highest MI (6.26), the highest number of lymphocytes was cultured and the largest number of metaphase plate was counted.

* Corresponding author: Nowruzfashkhami@yahoo.com