

مقاله پژوهشی

پاسخ رنگدانه‌های ملانین، لیپوفوشین و هموسیدرین مراکز ملانوماکروفاژی ماهی قرمز (*Carassius auratus*) به مواجهه با نونیل فنول

رشید علیجانی اردشیر^{۱*}، داریوش غلامی^۱، سارا رستگار^۲، عبدالعلی موحدی‌نیا^۳،
امیر پرویز سلاطی^۴، ابراهیم ذبیحی^۵

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۱

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر نونیل فنول بر فعالیت سیستم ایمنی ماهی قرمز از طریق اندازه‌گیری میزان تجمع رنگدانه‌های ملانوماکروفاژی در بافت کلیه و طحال ماهی قرمز انجام شده است. از این رو، ماهی‌های نابالغ به مدت ۲۵ روز در معرض غلظت‌های 10^{-6} و 10^{-7} مولار نونیل فنول قرار گرفتند. مراحل آماده‌سازی بافت کلیه و طحال و رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین-اوتوزین، پرلز پروسین بلو و اسید پرئودیک شیف به ترتیب برای شناسایی ملانین، هموسیدرین و لیپوفوشین انجام شد. سپس برای کمی‌سازی رنگدانه‌ها از نرم‌افزار Image J (ver. 1.53 e) استفاده شد. قرار گرفتن ماهی در معرض نونیل فنول منجر به کاهش تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی حاوی رنگدانه هموسیدرین در طحال شد و تاثیری بر تشکیل مراکز حاوی این رنگدانه در کلیه نداشت. تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی حاوی رنگدانه لیپوفوشین به ترتیب در طحال و کلیه پس از مواجهه با نونیل فنول کاهش و افزایش یافت ($P < 0.05$)، در حالی که نونیل فنول منجر به افزایش تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی در هر دو اندام به صورت وابسته به غلظت شد. به طور کلی، در میان سه رنگدانه موجود در مراکز ملانوماکروفاژی، ملانین به صورت وابسته به غلظت افزایش یافت و به نظر می‌رسد شاخص بهتری برای قرار گرفتن در معرض نونیل فنول باشد.

واژگان کلیدی: نونیل فنول، ملانوماکروفاژ، رنگدانه‌ها، مواد شیمیایی مختل‌کننده غدد درون‌ریز.

- ۱- استادیار گروه زیست‌فناوری دریا، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
- ۲- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران.
- ۳- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه مازندران، بابل، ایران.
- ۴- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
- ۵- دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.

* نویسنده مسئول: r.aliyani@ausmt.ac.ir

DOI: 10.22124/japb.2022.21179.1448

مقدمه

سمیت در سیستم ایمنی ماهی شوند. اگرچه نقش هورمون استروژن در تنظیم سیستم ایمنی ماهی شناخته شده است (Lukacova et al., 2021)، اما ناشناخته‌های زیادی در مورد تأثیرات ترکیبات زنواستروژنی و مکانیسم‌های این تأثیرات بر سیستم ایمنی ماهی وجود دارد. به منظور کشف این ناشناخته‌ها، باید در جستجوی شاخص‌هایی بود که محل اتصال بین سیستم ایمنی و سیستم درون‌ریز است. یکی از بهترین نشانگرهای زیستی برای EDCها که حد واسط بین سیستم ایمنی و غدد درون‌ریز است، مراکز ملانوماکروفاژی است. این مراکز دارای سلول‌های فاگوسیتی رنگدانه‌دار در مهره‌داران خونسرد (مانند ماهی) هستند و یکی از بهترین نشانگرهای زیستی در مورد آسیب به سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی هستند که ساده و ارزان هستند (Steinel and Bolnick, 2017). ملانوماکروفاژها را که گاهی اوقات پیش‌سازهای تکاملی مراکز زایای پستانداران (Evolutionary Precursors of Mammalian Germinal Centers) می‌نامند (Steinel and Bolnick, 2017)، معمولاً می‌توان در اطراف رگ‌های خونی به صورت ساختارهای گره‌ای با کپسول‌های ظریف

امروزه دریاها توسط بسیاری از ترکیبات صنعتی آلوده شده‌اند که احتمالاً مهم‌ترین آنها مواد شیمیایی مختل‌کننده غدد درون‌ریز (Endocrine Disrupting Chemicals: EDCs) هستند. مواد شیمیایی مانند زنواستروژن‌ها که می‌توانند وظایف هورمون‌های آندروژنی را تقلید کنند یا با فرایندهای اندوکرینی تداخل داشته باشند را EDC می‌نامند (Carnevali et al., 2018). زنواستروژن‌ها ترکیبات شیمیایی غیراستروئیدی ساخت بشر هستند که می‌توانند از طریق بلع یا جذب وارد بدن ماهی شوند و فعالیت‌های استروژنی را تقلید کنند (Wang et al., 2021). این آلاینده‌ها با مراحل مختلف متابولیسم هورمون‌های درون‌زا (Endogenous) و دیگر رویدادهای فیزیولوژیکی که مسئول حفظ تعادل غدد درون‌ریز ماهی هستند، تداخل می‌کنند (Celino-Brady et al., 2020). نونیل فنول (Nonylphenol: NP) یکی از این EDCها است و فعالیت استروژنی دارد که منجر به تداخل در پیام‌دهی طبیعی استروژن می‌شود (Saravanan et al., 2019). مواد زنواستروژن نه تنها بر ساختارها و عملکردهای تولیدمثلی تأثیر منفی می‌گذارند، بلکه می‌توانند منجر به

مراکز ملانوماکروفاژی در ماهی ممکن است مسیر جدیدی را برای دستیابی به یک نشانگر زیستی دقیق سمیت ایمنی EDCها باز کند. برای رسیدن به این درک، می‌توان به ارزیابی میزان تجمع ملانوماکروفاژها در کلیه و طحال ماهی پرداخت تا به عنوان یک شاخص در تشخیص مواجهه با مواد شیمیایی شبه استروژنی مورد استفاده قرار گیرد و حتی نشان دهنده میزان غلظت آلاینده باشد. یک گام به سمت این هدف، ارزیابی پاسخ سه رنگدانه ملانین، هموسیدرین و لیپوفوشین در مراکز ملانوماکروفاژی به قرار گرفتن در معرض نونیل فنل است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر ماده زواستروژنی نونیل فنول بر فعالیت سیستم ایمنی ماهی قرمز از طریق اندازه‌گیری میزان تجمع ملانوماکروفاژی در بافت کلیه و طحال ماهی قرمز انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری ماهی

ماهیان قرمز (*Carassius auratus*) سالم با وزن 24 ± 2 گرم از مرکز پرورش ماهی استخوانی رشت تهیه و به آزمایشگاه تحقیقاتی پژوهشکده زیست‌شناسی سلولی- مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل منتقل شدند. ماهی‌ها

مشاهده کرد. منشا این ساختارها، سلول‌های بنیادی خون‌ساز ماتریکس رتیکولاندوتلیال است که می‌تواند به این سلول‌ها در اندام‌های خون‌ساز تمایز یابد (Stosik et al., 2019). مراکز ملانوماکروفاژی علاوه بر شکل، اندازه و محتوای رنگدانه، توزیع و نقش‌های متفاوتی در اندام‌های مختلف دارند. با وجود نقش‌های فیزیولوژیکی و ایمنی پیچیده، عملکرد دقیق این تجمعات سلولی مرموز مبهم باقی مانده است (Sayed and Younes, 2017). ملانین، هموسیدرین و لیپوفوشین (و گاهی اوقات سروئید) سه نوع رنگدانه هستند که اغلب در ساختار این مراکز یافت می‌شوند. مراکز ملانوماکروفاژی از نظر ریخت‌شناسی و محتوای رنگدانه به عوامل داخلی و خارجی مختلفی مانند سن، دما، فصل، جنسیت، هیپوکسی، خواب زمستانی، ترکیبات شیمیایی، عفونت و هورمون‌ها پاسخ می‌دهند (Zieri et al., 2015).

اگرچه مشخص شده است که استروژن طبیعی و زواستروژن بر مراکز ملانوماکروفاژی در اندام‌های مختلف تاثیر می‌گذارند، بسیاری از سوالات مربوط به تاثیرات ترکیبات شبه استرادیول بر مراکز ملانوماکروفاژی در ماهی بی‌پاسخ مانده است. درک رابطه بین استروژن و

استفاده در گروه‌های تیمار) با غلظت ۰/۰۲ درصد قرار گرفت. این غلظت‌های NP می‌تواند مقدار ثابتی از ویتلوژنین را در ماهی قرمز القا کنند (Soverchia et al., 2005). ماهی‌ها یک بار در روز با جیره پلت تجاری تغذیه شدند. پس از ۲۵ روز قرار گرفتن در معرض NP، ماهی‌ها با بریدن سر کشته و تشریح شدند و نمونه‌های بافتی از اندام‌های کلیه و طحال جدا شدند. نمونه‌های بافت در فرمالین ۱۰ درصد خنثی (pH ۷/۲) تثبیت شدند. کلیه آزمایش‌ها بر اساس کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل انجام گرفت (<https://ethics.research.ac.ir>).

مطالعه بافت‌شناسی

بافت‌های تثبیت شده به روش بافت‌شناسی کلاسیک آب‌گیری (در سری افزایشی الکل)، شفاف‌سازی (در گزیلول) و در پارافین جاسازی شدند. مقاطع بافتی پارافینی شده در ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و سپس رنگ‌آمیزی شدند. رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین-انوزین (H&E)، پرلز پروسین بلو (PPB) و اسید پرئودیک شیف (PAS) به ترتیب برای شناسایی ملانین، هموسیدرین و لیبوفوشین طبق روش ارائه شده توسط Ferreira (۲۰۱۱) انجام شد. به منظور

در یک آکواریوم شیشه‌ای ۵۰ لیتری حاوی آب شهری کلرزدایی شده به مدت ۲ هفته با ۱۲ ساعت روشنایی - تاریکی با شرایط آزمایشی سازگار شدند. کیفیت آب، روزانه با دستگاه مولتی فانکشن شیمیایی دیتالاگر (WA-2017SD، Lutron، تایوان) مجهز به pH متر، دماسنج و اکسیژن‌سنج مورد ارزیابی قرار گرفت. در طول مدت نگهداری ماهی‌ها میانگین شاخص‌های کیفی آب شامل دما 20 ± 3 درجه سانتی‌گراد، pH 7.3 ± 0.2 و اکسیژن محلول (DO) 7.3 ± 0.4 میلی‌گرم در لیتر بودند. تغذیه ماهی‌ها یک بار در روز، به میزان ۱/۵ درصد وزن بدن با جیره پلت تجاری (ماهیران، ایران) انجام شد. تعویض آب به صورت هفتگی و اکسیژن دهی با دستگاه هواده صورت گرفت.

طراحی آزمایش

در مجموع ۴۲ ماهی به سه گروه شامل دو گروه مواجهه و یک گروه شاهد (در دو تکرار) تقسیم شدند و در معرض 10^{-6} و 10^{-7} مولار نونیل فنول (NP) (Sigma-Aldrich، آمریکا) (Lu et al., 2012) محلول در اتانول خالص (Merck، آلمان) در آکواریوم‌های شیشه‌ای (۲۰ لیتری) قرار گرفتند (۷ ماهی در هر آکواریوم). گروه شاهد در معرض حامل (اتانول مورد

اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، تصاویر با وضوح ۱۵۰ dpi و با بزرگ‌نمایی $\times 200$ تهیه شدند که مساحتی حدود ۱۳۴/۴۴۱ میکرومتر مربع را شامل می‌شد. برای هر بافت در هر ماهی، ۹ تا ۱۲ میدان تصویر برای بررسی انتخاب شد. ابتدا فرمت تصویر از حالت RGB به فرمت سیاه و سفید تبدیل شد. سپس با دستور Threshold نواحی لکه‌دار جداسازی و مساحت مورد نظر با مقیاس میکرومتر مربع سنجش شد. در نهایت با حذف نویزها و تقسیم تعداد ناحیه ماکروفاژی به کل ناحیه، متوسط مساحت ماکروفاژی محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور مقایسه آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 24 و آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده شد. نرم‌افزار Image J (ver. 1.53 e) برای کمی‌سازی رنگدانه‌ها و مراکز ملانوماکروفاژی مورد استفاده قرار گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 استفاده شد. ضریب همبستگی پیرسون نیز در نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 محاسبه شد.

رنگ‌آمیزی H&E، نمونه‌ها بعد از پارافین‌زدایی در گزیلول، آب‌گیری در سری کاهشی الکل و شستشو در آب، رنگ‌آمیزی شدند. برای رنگ‌آمیزی PPB، نمونه‌ها بعد از پارافین‌زدایی در محلول باتینگ (Butting Solution) حاوی کلریدریک اسید ۲ درصد و پتاسیم فری‌سیانید ۲ درصد) گرم غوطه‌ور شدند و بعد از شستشو در آب با اتوزین افزایش کنتراست داده شدند. به منظور رنگ‌آمیزی PAS، نمونه‌ها بعد از پارافین‌زدایی با پیریدودیک اسید ۰/۵ درصد اکسیده شده، بعد از شستشو در آب با عامل شیف مواجه شده و در نهایت با همتوکسیلین افزایش کنتراست داده شدند. در هر گروه آزمایشی، از ۴ ماهی برای تهیه نمونه بافت طحال و کلیه نمونه‌برداری شد و از هر نمونه بافت چهار اسلاید و از هر اسلاید پنج تصویر با کمک میکروسکوپ نوری (Eclipse TS100، Nikon، ژاپن) مجهز به دوربین دیجیتال تهیه شد. پس از پردازش اولیه تصاویر، مساحت اشغال شده (میکرومتر مربع) توسط مراکز ملانوماکروفاژی حاوی رنگدانه با روش Analyzing Particle در نرم‌افزار ImageJ (ver. 1.53 e) بر اساس روش توصیف شده توسط Mentino و همکارانش (۲۰۱۷)

نتایج

رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف

در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با PAS، مراکز ملانوماکروفاژی با رنگدانه لیپوفوشین حاوی ماکروفاژهای رنگدانه‌ای قهوه‌ای رنگ بودند (شکل ۳). مطابق با نتایج کمی، گروه شاهد در طحال مقدار بالایی از مراکز ملانوماکروفاژی حاوی رنگدانه لیپوفوشین را نشان داد و تشکیل آنها پس از قرار گرفتن در معرض NP در طحال کاهش یافت. از طرف دیگر، قرار گرفتن در معرض NP منجر به افزایش تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی حاوی رنگدانه لیپوفوشین در کلیه شد (شکل ۲-ب).

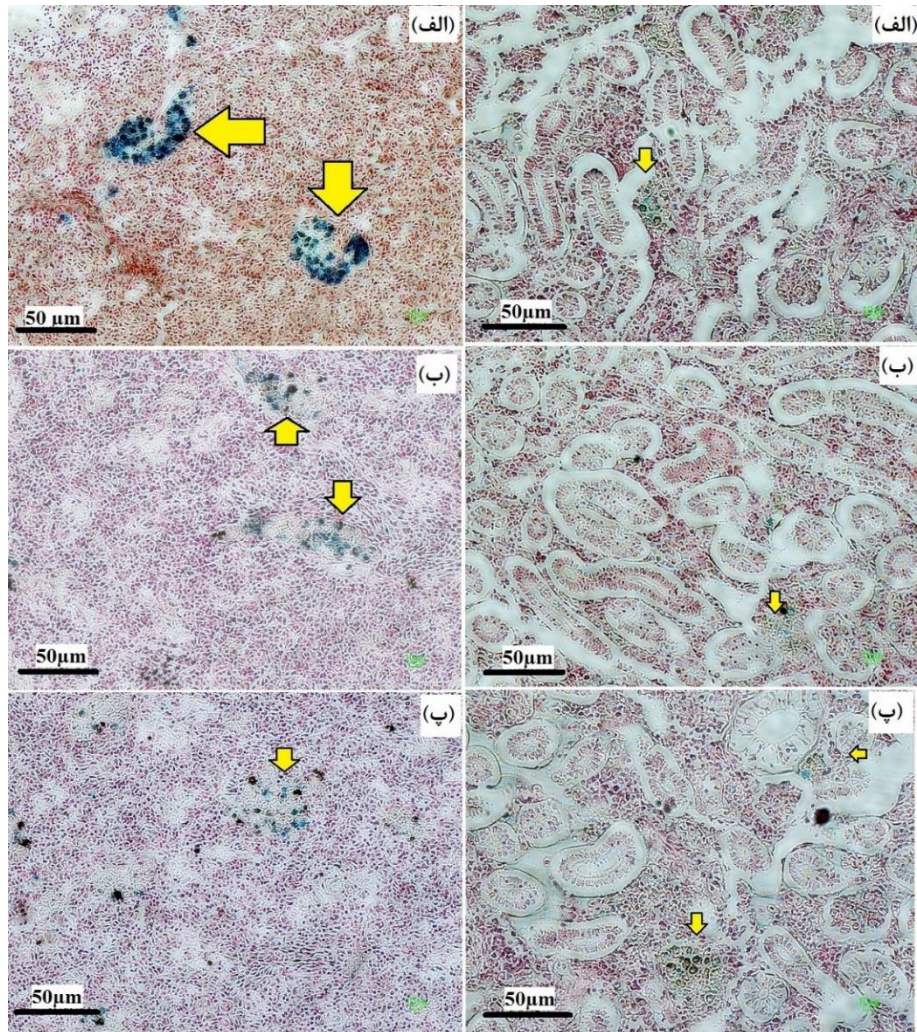
رنگ‌آمیزی همانوکسیلین - آئوزین

در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده توسط H&E مراکز ملانوماکروفاژی حاوی رنگدانه ملانین دارای تجمعات نامنظمی از ماکروفاژهای قهوه‌ای تیره یا سیاه رنگ بودند (شکل ۴). مطابق با نتایج کمی، گروه شاهد در طحال و کلیه سطح پایینی از تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی حاوی رنگدانه ملانین را نشان دادند و قرار گرفتن در معرض NP منجر به افزایش تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی در هر دو اندام به صورت وابسته به غلظت شد ($P=0/86$ ؛ شکل ۲-ج).

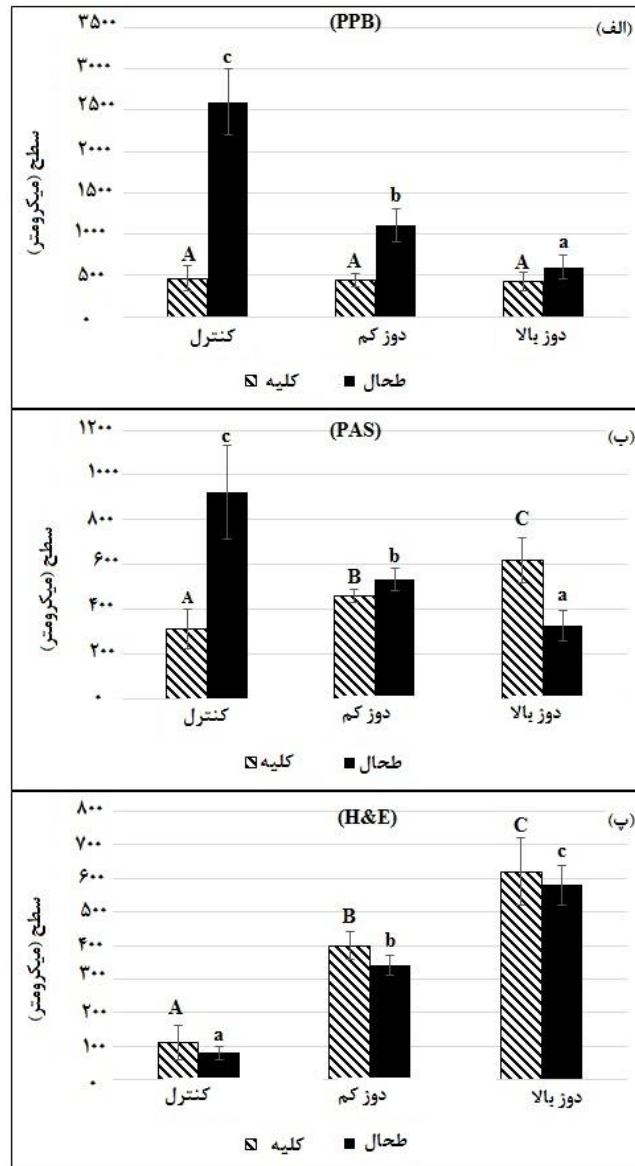
نتایج نشان داد که ریخت‌شناسی و توزیع متفاوتی از رنگدانه‌ها در مراکز ملانوماکروفاژی ماهی قرمز در دو اندام وجود داشت. مراکز ملانوماکروفاژی در کلیه چندشکلی بودند در حالی که به نظر می‌رسد آنهایی که در طحال هستند شکل منظمی داشته باشند. گاهی اوقات، این توده‌های سلولی توسط حاشیه‌ای از بافت همبند نازک احاطه شده‌اند و به خوبی در مقابل پارانشیم قرار گرفته‌اند.

رنگ‌آمیزی پرلز پروسین بلو

در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با PPB، مراکز ملانوماکروفاژی کنتراست رنگ بالایی با هموسیدرین (شکل ۱) بویژه در بافت طحال داشتند. مطابق با نتایج تجزیه و تحلیل کمی (شکل ۲) در گروه شاهد، سطح تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی حاوی رنگدانه هموسیدرین در طحال نسبت به کلیه به طور معنی‌داری بالاتر بود. از سوی دیگر، قرار گرفتن در معرض هر دو غلظت نونیل فنول (NP) منجر به کاهش تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی حاوی رنگدانه هموسیدرین در طحال شد ($P<0/05$) و بر تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی در کلیه تاثیری نداشت (شکل ۲-الف).

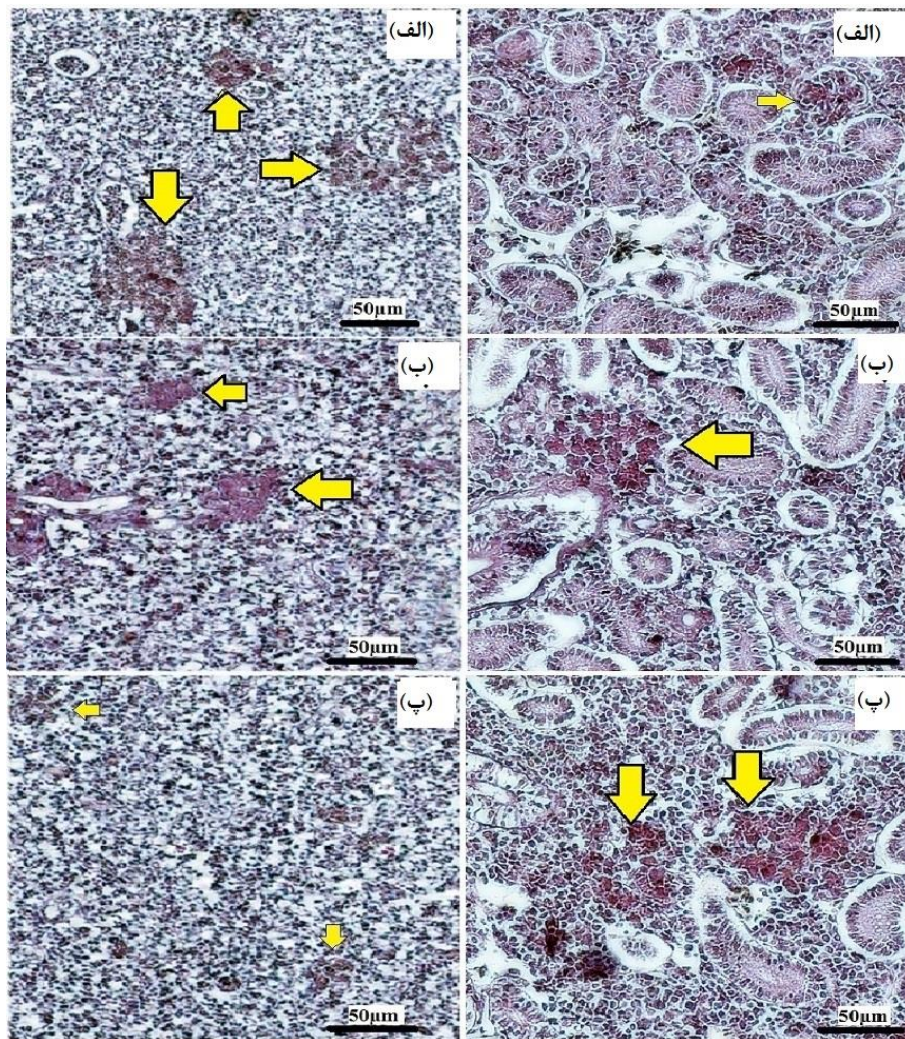


شکل ۱: مقاطع بافت‌شناسی رنگ آمیزی شده توسط پرلز پروسین بلو (PPB)، مراکز ملانوماکروفاژی را در طحال (چپ) و کلیه (راست) ماهی قرمز نشان می‌دهد. الف) گروه شاهد؛ ب) گروه مواجهه با 10^{-7} مولار نونیل فنول؛ پ) گروه مواجهه با 10^{-6} مولار نونیل فنول. فلش‌های زرد مراکز ملانوماکروفاژی حاوی هموسیدرین را نشان می‌دهند.

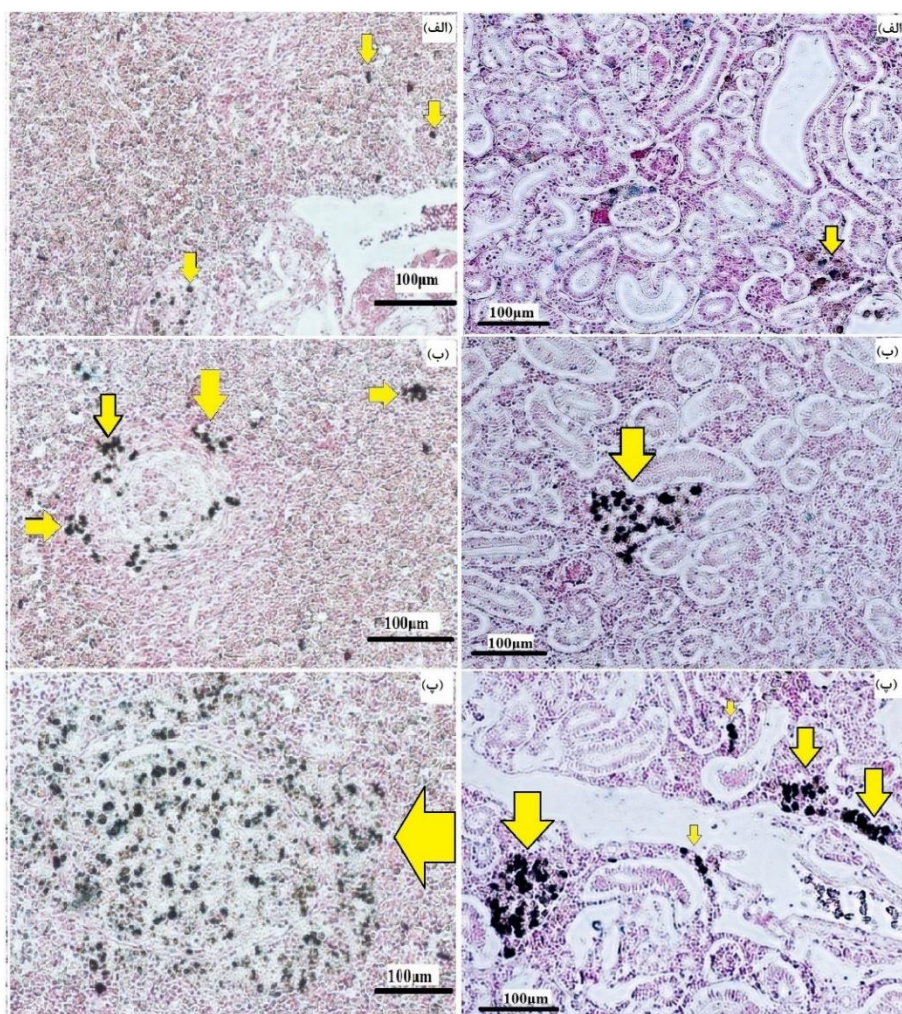


شکل ۲: مقایسه کمی مساحت مراکز ملانوماکروفازی در کلیه وطحال ماهی قرمز مواجهه شده با دو غلظت نونیل فنول (میانگین \pm انحراف معیار). الف) هموسیدرین، رنگ آمیزی شده با پرلز پروسین بلو (PPB)؛ ب) لیپوفوشین، رنگ آمیزی شده با پرئودیک شیف (PAS)؛ پ) ملانین، رنگ آمیزی شده با همتوکسیلین-انوزین (H&E). حروف بزرگ متفاوت اختلاف معنی دار را بین گروه‌های مختلف در کلیه و حروف کوچک

متفاوت اختلاف معنی‌دار را بین گروه‌های مختلف درطحال نشان می‌دهد ($P < 0.05$). دوز کم نشان دهنده غلظت 10^{-7} و دوز بالا نشان دهنده غلظت 10^{-6} مولار نونیل فنول است.



شکل ۳: مقاطع بافت‌شناسی رنگ‌آمیزی شده با اسید پرئودیک شیف (PAS)، مراکز ملانوماکروفاژی را در طحال (چپ) و کلیه (راست) ماهی قرمز نشان می‌دهد. الف) گروه شاهد؛ ب) گروه مواجهه با 10^{-7} مولار نونیل فنول؛ پ) گروه مواجهه با 10^{-6} مولار نونیل فنول. فلش‌های زرد مراکز ملانوماکروفاژی حاوی لیپوفوشین را نشان می‌دهند.



شکل ۴: مقاطع بافت‌شناسی رنگ‌آمیزی شده توسط هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) که مراکز ملانوماکروفاژی طحال (چپ) و کلیه (راست) ماهی قرمز را نشان می‌دهد. الف) گروه شاهد؛ ب) گروه مواجهه با 10^{-7} مولار نونیل فنول؛ ب) گروه مواجهه با 10^{-6} مولار نونیل فنول. فلش‌های زرد مراکز ملانوماکروفاژی را نشان می‌دهند.

بحث

ملانوماکروفاژی را در کبد ارزیابی کنند و گزارش دادند که مشاهده هیپرتروفی و هیپرپلازی در این مراکز ملانوماکروفاژی نشان دهنده اهمیت آنها در سم‌زدایی و فرآیندهای مرتبط با ایمنی است. با این وجود، Shirdel و همکاران (۲۰۲۰) هیچ‌گونه مرکز ملانوماکروفاژی را در کلیه و غدد جنسی ماهی قزل‌آلای خزری (*Salmo trutta caspius*) مواجهه شده با ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر نونیل فنول به مدت ۲۱ روز گزارش نکردند. بنابراین، این مطالعات همراه با مطالعه حاضر نشان می‌دهند که مراکز ملانوماکروفاژی بر اساس نقش خود می‌توانند در اندام‌های مختلف ظاهر شوند. مراکز ملانوماکروفاژی عمدتاً در استرومای بافت‌های خون‌ساز و لنفوئیدی، یعنی کلیه و طحال ماهی‌های استخوانی وجود دارند (Stosik et al., 2019). بنابراین، در این مطالعه تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی در این دو اندام مورد بررسی قرار گرفت. اهمیت طحال و کلیه در تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی در مطالعات قبلی مورد ارزیابی قرار گرفت. Balamurugan و همکاران (۲۰۱۲) تجمع مراکز ملانوماکروفاژی در طحال *Plotosus lineatus* را به عنوان یک شاخص زیستی تغییر محیطی معرفی کردند. Abd-Elkareem و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که قرار گرفتن

در مطالعه حاضر، تاثیر دو غلظت نونیل فنول بر توزیع و محتوای سه رنگدانه مراکز ملانوماکروفاژی در کلیه و طحال ماهی قرمز نابالغ بررسی شد. ویژگی‌های مراکز ملانوماکروفاژی در ماهی می‌تواند نشانگر زیستی مفیدی برای تنش‌های مختلف از جمله استرس‌های محیطی و آلاینده‌ها باشد (Sayed et al., 2019; Abd-Elkareem et al., 2020). رنگدانه‌های مراکز ملانوماکروفاژی در طحال و کلیه ماهی قرمز تفاوت‌هایی در توزیع داشتند که نشان می‌دهد مراکز ملانوماکروفاژی ممکن است نقش‌های مختلفی در اندام‌های مختلف داشته باشند. مطالعات قبلی (Ribeiro et al., 2011) نشان داد که مراکز ملانوماکروفاژی موجود در کبد ماهی‌های استخوانی معمولاً بیشتر به متابولیسم آهن کمک می‌کنند و بنابراین در فعالیت فاگوسیتی دخیل هستند، در حالی که مراکز ملانوماکروفاژی در طحال کمتر در فعالیت فاگوسیتی شرکت می‌کنند و عملکردهای ایمنی بیشتری دارند. از سوی دیگر، Sayed و همکاران (۲۰۱۹) گربه‌ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* را به مدت ۲۱ روز در معرض ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NP قرار دادند تا تشکیل مراکز

NP به دلیل افزایش استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی بود. علاوه بر این، NP توانایی ایجاد همولیز و تخریب بافت را دارد (Abd-Elkareem et al., 2018) و رنگدانه لیپوفوشین در مراکز ملانوماکروفاژی به طور مستقیم با فعالیت فاگوسیتی مرتبط است. بنابراین، تغییر بیشتر لیپوفوشین نشان دهنده فعالیت فاگوسیتیک بالاتر مراکز ملانوماکروفاژی حاوی این رنگدانه و نقش‌های فیزیولوژیکی متفاوت است. مطالعات قبلی نشان دادند که مراکز ملانوماکروفاژی در اندام‌ها و جنس‌های مختلف ماهی که در معرض آلودگی قرار دارند واکنش‌های متفاوتی دارند (Dang et al., 2019). به عبارت دیگر چنین مطالعاتی نشان می‌دهند که محتوای رنگدانه لیپوفوشین در مراکز ملانوماکروفاژی نه تنها به نوع و غلظت آلاینده بستگی دارد، بلکه به گونه، جنس، شرایط فیزیولوژیکی و عوامل محیطی نیز بستگی دارد و آن را برای استفاده به عنوان شاخص نامناسب می‌کند.

در مطالعه حاضر، رنگدانه هموسیدرین در طحال ماهیانی که در معرض NP قرار گرفته بودند، کاهش یافت. از سوی دیگر، تغییر در مراکز ملانوماکروفاژی حاوی هموسیدرین پس از قرار گرفتن در معرض NP در کلیه آشکار

گریه‌ماهی آفریقایی در معرض NP منجر به تشکیل مراکز ملانوماکروفاژی در کلیه می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که NP باعث افزایش تشکیل لیپوفوشین در کلیه و کاهش آن در طحال شد. رنگدانه‌های لیپوفوشین یک مخلوط پیچیده‌ای از مولکول‌های زیستی با پیوند متقابل بسیار اکسید شده هستند. ماهیت ساختار متقارن و پلیمری لیپوفوشین باعث می‌شود که در برابر تخریب توسط سیستم‌های پروتئازومی و لیزوزومی و پاکسازی توسط اگزوسیتوز مقاوم باشد (Moreno-Garcia et al., 2018). چرخه‌های مکرر جذب لیزوزومی، آزادسازی ماکرومولکول‌های اکسید شده توسط رادیکال‌های آزاد مشتق از اکسیژن در واکنش فنتون، و متعاقبا اختلال در هموستاز ردوکس منجر به تشکیل لیپوفوشین می‌شود (Jung et al., 2007). بنابراین، پتانسیل تخریب پروتئازومی و لیزوزومی در سلول‌ها مختل شده و در نهایت منجر به افزایش مرگ سلولی آپوپتوزی می‌شود. برخی از مطالعات گزارش کردند که قرار گرفتن در معرض NP می‌تواند استرس اکسیداتیو را افزایش دهد و باعث آپوپتوز شود (Matozzo and Marin, 2005). افزایش رنگدانه لیپوفوشین در مراکز ملانوماکروفاژی پس از قرار گرفتن در معرض

غلظت افزایش یافت. ماکروفازهای رنگدانه‌دار می‌توانند ملانین‌ها را مانند ملانوسیت‌ها تولید کنند و این رنگدانه سموم مختلف را خنثی می‌کند (Kumar et al., 2016). به عبارت دیگر، ملانین موجود در این سلول‌ها با جذب رادیکال‌های آزاد مسئول استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی و با ایفای نقش دفاعی در برابر پراکسید هیدروژن تولید کننده NADH اکسید شده استفاده می‌شود (Suvarna et al., 2018). ایجاد شرایط عدم تعادل پراکسیدانی (Kourouma et al., 2015) و تغییر در سیستم غدد درون‌ریز به دنبال مواجهه با NP منجر به افزایش تجمع ملانین در طحال و کلیه می‌شود. مطالعات قبلی نشان دادند که NP می‌تواند محتوای ملانین را افزایش دهد (Sayed et al., 2019). گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده در طی متابولیسم NP و نقش ملانین در خنثی‌سازی آن می‌تواند دلیلی برای افزایش بیشتر ملانین در این اندام‌ها باشد (Mohamed et al., 2019). Bernabo و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که قرار گرفتن نیوت ایتالیایی (*Lissotriton italicus*) در معرض NP منجر به افزایش محتوای ملانین شد که به عنوان واکنش ناشی از استرس اکسیداتیو و القای CYP1-a تفسیر

نبود. احتمالاً نقش‌های مختلف فیزیولوژیکی این رنگدانه در طحال و کلیه و اثرات متفاوت NP بر این اندام‌ها می‌تواند این مشاهدات را توضیح دهد. گزارش شده است که میزان کاهش هموسیدرین طحال با سرکوب سیستم ایمنی غیراختصاصی مرتبط با آلودگی در ارتباط است (Bucke et al., 1992). علاوه بر این، اختلالات غدد درون‌ریز می‌تواند ترکیب سلولی را در مراکز ملانوماکروفازی طحال تغییر دهند و بر بیان ژن‌های سیستم ایمنی تاثیر منفی بگذارند (Shved et al., 2009). پس از این اختلال، مراکز ملانوماکروفازی حاوی هموسیدرین در طحال کاهش یافت. از آنجایی که تجمع هموسیدرین در مراکز ملانوماکروفازی احتمالاً با افزایش گردش گلبول‌های قرمز مرتبط است (Fenoglio et al., 2005)، قرار گرفتن در معرض NP ممکن است منجر به ضایعه رگ‌های خونی کوچک شود. علاوه بر این، مطالعات قبلی نشان دادند که برهم‌کنش‌های محیطی بین گلبول‌های قرمز و ماکروفازها منجر به تشکیل مراکز ملانوماکروفازی می‌شود (Passantino et al., 2005). نتایج همچنین نشان داد که در بین سه رنگدانه موجود در مراکز ملانوماکروفازی پس از قرار گرفتن در معرض دو غلظت NP، ملانین آشکارتر بود و بیشتر به صورت وابسته به

حاوی لیپوفوشین در کلیه افزایش یافت. در میان سه رنگدانه موجود در مراکز ملانوماکروفاژی پس از قرار گرفتن در معرض دو غلظت NP، ملانین به صورت وابسته به غلظت افزایش یافت و به نظر می‌رسد شاخص بهتری برای قرار گرفتن در معرض NP باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دکتر علی اکبر هدایتی از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات و علوم محیطی برای تهیه برخی تجهیزات در این پژوهش تشکر می‌کنند.

می‌شود. ملانین اخیراً به عنوان نشانگر زیستی برای مطالعات اکوتوکسیکولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا این رنگدانه پس از قرار گرفتن در معرض چندین آلاینده آبی تولید می‌شود (De Gregorio et al., 2021). علاوه بر NP، چندین EDC دیگر نیز می‌توانند بر محتوای ملانین در ماهی‌ها و دوزیستان تاثیر بگذارند (Chai et al., 2017).

در مجموع، در حالی که مراکز ملانوماکروفاژی حاوی لیپوفوشین و رنگدانه هموسیدرین در طحال پس از قرار گرفتن در معرض NP کاهش یافت، مراکز ملانوماکروفاژی

منابع

- Abd-Elkareem M., Abou Khalil N.S. and Sayed A.E.D.H. 2020.** Cytoprotective effect of *Nigella sativa* seed on 4-nonylphenol-induced renal damage in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Chemosphere*, 259: 1–12 (127379).
- Abd-Elkareem M., Abou Khalil N.S. and Sayed A.H. 2018.** Hepatotoxic responses of 4-nonylphenol on African catfish (*Clarias gariepinus*): Antioxidant and histochemical biomarkers. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44: 969–981.
- Balamurugan S., Deivasigamani B., Kumaran S., Sakthivel M., Rajsekar T. and Priyadharsini P. 2012.** Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bio-indicator of environmental change. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2: 635–638.
- Bernabo I., Biasone P., Macirella R., Tripepi S. and Brunelli E. 2014.** Liver histology and ultrastructure of the Italian newt (*Lissotriton italicus*): Normal structure and modifications after acute exposure to nonylphenol ethoxylates. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 66: 455–468.
- Bucke D., Vethaak A. and Lang T., 1992.** Quantitative assessment of melanomacrophage centres (MMCs) in dab *Limanda limanda* along a pollution transect in the German Bight. *Marine Ecology Progress Series*, 91: 193–196.
- Carnevali O., Santangeli S., Forner-Piquer I., Basili D. and Maradonna F. 2018.** Endocrine-disrupting chemicals in aquatic environment: What are the risks for fish gametes? *Fish Physiology and Biochemistry*, 44: 1561–1576.
- Celino-Brady F.T., Lerner D.T. and Seale A.P. 2020.** Experimental Approaches for Characterizing the Endocrine-Disrupting Effects of Environmental Chemicals in Fish. *Frontiers in Endocrinology*, 11: 1–21.
- Chai L., Chen A., Luo P., Zhao H. and Wang H. 2017.** Histopathological changes and lipid metabolism in the liver of *Bufo gargarizans* tadpoles exposed to triclosan. *Chemosphere*, 182: 255–266.
- Dang M., Nowell C., Nguyen T., Bach L., Sonne C., Norregaard R., Stride M. and Nowak B. 2019.** Characterisation and 3D structure of melanomacrophage centers in shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*). *Tissue and Cell*, 57: 34–41.
- De Gregorio L.S., Franco-Belussi L., Goldberg J. and De Oliveira C. 2021.** Nonylphenol and cyproterone acetate effects in the

- liver and gonads of *Lithobates catesbeianus* (Anura) tadpoles and juveniles. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(44): 62593–62604.
- Fenoglio C., Boncompagni E., Fasola M., Gandini C., Comizzoli S., Milanesi G. and Barni S. 2005.** Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 259–268.
- Ferreira C.M.H. 2011.** Can fish liver melanomacrophages be modulated by xenoestrogenic and xenoandrogenic pollutants? Experimental studies on the influences of temperature, sex, and ethynylestradiol, using the platyfish as the model organism. M.Sc. Thesis, University of Porto, Portugal. 51P.
- Jung T., Bader N. and Grune T. 2007.** Lipofuscin: Formation, distribution, and metabolic consequences. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1119: 97–111.
- Kourouma A., Keita H., Duan P., Quan C., Bilivogui K.K., Qi S., Christiane N.A., Osamuyimen A. and Yang K. 2015.** Effects of 4-nonylphenol on oxidant/antioxidant balance system inducing hepatic steatosis in male rat. *Toxicology Reports*, 2: 1423–1433.
- Kumar R., Joy K. and Singh S. 2016.** Morpho-histology of head kidney of female catfish *Heteropneustes fossilis*: Seasonal variations in melano-macrophage centers, melanin contents and effects of lipopolysaccharide and dexamethasone on melanins. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42: 1287–1306.
- Lu X., Gu Y. and Song Y. 2012.** Toxicity and tissue accumulation of nonylphenol in *Carassius auratus* red variety, grass carp and silver carp. *Journal of Hygiene Research*, 41: 785–789.
- Lukacova J., Knazicka Z., Tyrda E., Massanyi P. and Lukac N. 2021.** The toxic effect of 4-nonylphenol on male reproductive system. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021: 1455–1468.
- Matozzo V. and Marin M.G. 2005.** 4-Nonylphenol induces immunomodulation and apoptotic events in the clam *Tapes philippinarum*. *Marine Ecology Progress Series*, 285: 97–106.
- Mentino D., Scillitani G., Marra M. and Mastrodonato M. 2017.** Seasonal changes in the liver of a non-hibernating population of water frogs, *Pelophylax kl. esculentus* (Anura: Ranidae). *The European Zoological Journal*, 84: 525–535.

- Mohamed W.A., El-Houseiny W., Ibrahim R.E. and Abd-Elhakim Y.M. 2019.** Palliative effects of zinc sulfate against the immunosuppressive, hepato-and nephrotoxic impacts of nonylphenol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 504: 227–238.
- Moreno-Garcia A., Kun A., Calero O., Medina M. and Calero M. 2018.** An overview of the role of lipofuscin in age-related neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 12: 1–13 (464).
- Passantino L., Cianciotta A., Jirillo F., Carrassi M., Jirillo E. and Passantino G. 2005.** Lymphoreticular system in fish: Erythrocyte-mediated immunomodulation of macrophages contributes to the formation of melanomacrophage centers. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2(7): 147–161.
- Ribeiro H., Procopio M., Gomes J., Vieira F., Russo R., Balzuweit K., Chiarini-Garcia H., Castro A.C.S., Rizzo E. and Correa J.D. 2011.** Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. *Cell and Tissue Research*, 346: 417–425.
- Saravanan M., Nam S.E., Eom H.J., Lee D.H. and Rhee J.S. 2019.** Long-term exposure to waterborne nonylphenol alters reproductive physiological parameters in economically important marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology (C)*, 216: 10–18.
- Sayed A. and Younes H.A. 2017.** Melanomacrophage centers in *Clarias gariepinus* as an immunological biomarker for toxicity of silver nanoparticles. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 5: 97–104.
- Sayed A.E.D.H., Abd-Elkareem M. and Abou Khalil N.S. 2019.** Immunotoxic effects of 4-nonylphenol on *Clarias gariepinus*: Cytopathological changes in hepatic melanomacrophages. *Aquatic Toxicology*, 207: 83–90.
- Shirdel I., Kalbassi M.R., Esmailbeigi M. and Tinoush B. 2020.** Disruptive effects of nonylphenol on reproductive hormones, antioxidant enzymes, and histology of liver, kidney and gonads in Caspian trout smolts. *Comparative Biochemistry and Physiology (C)*, 232: 1–37 (108756).
- Shved N., Berishvili G., Hausermann E., D'Cotta H., Baroiller J.F. and Eppler E. 2009.** Challenge with 17 α -ethinylestradiol (EE2) during early development persistently impairs growth, differentiation, and local expression of IGF-I and IGF-II in immune organs of tilapia. *Fish and Shellfish Immunology*, 26: 524–530.

- Soverchia L., Ruggeri B., Palermo F., Mosconi G., Cardinaletti G., Scortichini G., Gatti G. and Polzonetti-Magni A. 2005.** Modulation of vitellogenin synthesis through estrogen receptor beta-1 in goldfish (*Carassius auratus*) juveniles exposed to 17- β estradiol and nonylphenol. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209: 236–243.
- Steinel N.C. and Bolnick D.I. 2017.** Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in Immunology*, 8: 1–8 (827).
- Stosik M.P., Tokarz-Deptula B. and Deptula W. 2019.** Melanomacrophages and melanomacrophage centres in Osteichthyes. *Central-European Journal of Immunology*, 44(2): 201–205.
- Suvarna K.S., Layton C. and Bancroft J.D. 2018.** Bancroft's theory and practice of histological techniques. Elsevier Health Sciences, UK. 609P.
- Wang L.H., Chen L.R. and Chen K.H. 2021.** In vitro and vivo identification, metabolism and action of xenoestrogens: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8): 1–27 (4013).
- Zieri R., Franco-Belussi L., De Souza Santos L.R., Taboga S.R. and De Oliveira C. 2015.** Sex hormones change visceral pigmentation in *Eupemphix nattereri* (Anura): Effects in testicular melanocytes and hepatic melanomacrophages. *Animal Biology*, 65: 21–32.



Research Paper

The response of melanin, lipofuscin and hemosiderin pigments in melanomacrophage centers to nonylphenol exposure in goldfish (*Carassius auratus*)

Rashid Alijani Ardeshir^{1*}, Dariush Gholami¹, Sara Rastgar², Abdolali Movahedinia³, Amir Parviz Salati⁴, Ebrahim Zabihi⁵

Received: December 2021

Accepted: May 2022

Abstract

This study aimed to evaluate the histological effect of nonylphenol on the activity of goldfish (*Carassius auratus*) immune system by measuring the accumulation of melanomacrophage pigments in the kidney and spleen of goldfish. Therefore, immature goldfish were exposed to 10^{-6} and 10^{-7} M nonylphenol (NP) for 25 days. Tissue processing was carried out followed by Hematoxylin-eosin (H&E), Perls Prussian blue (PPB) and periodic acid Schiff (PAS) staining to identify melanin, hemosiderin and lipofuscin, respectively. Then, image processing was performed using ImageJ software (ver. 1.53 e) to quantify the pigment content of melanomacrophage centers (MMCs). The exposure to NP led to decrease of MMC formation containing hemosiderin pigment in the spleen, and did not affect the formation of MMCs containing this pigment in the kidney. MMC formation containing lipofuscin pigment decreased and increased in the spleen and kidney, respectively, after exposure to NP ($P < 0.05$). The exposure to NP led to the increase of MMC formation in both organs in a dose-dependent manner. Generally, melanin increased in a dose-dependent manner and seems to be a better indicator of exposure to NP.

Key words: *Nonylphenol, Melanomacrophage, Pigments, Endocrine-disrupting Chemicals.*

1- Assistant Professor in Department of Marine Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

3- Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

4- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

5- Associate Professor in Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

*Corresponding Author: r.aliyani@ausmt.ac.ir

DOI: 10.22124/japb.2022.21179.1448

