

## بررسی مقایسه‌ای سطح پایه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) در مدل طبیعی (استفاده از جاندار) و مدل آزمایشگاهی (کشت سلول)

نگین درخشش<sup>۱</sup>، عبدالعلی موحدی نیا<sup>۲\*</sup>، نگین سلامات<sup>۳</sup>، محمود هاشمی تبار<sup>۴</sup>، وحید بیاتی<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

۳- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

۴- دانشیار گروه تشریح و آناتومی، تحقیقات دارویی، دانشگاه جندی شاپور اهواز

۵- استادیار گروه تشریح و آناتومی، تحقیقات دارویی، دانشگاه جندی شاپور اهواز

### چکیده

در این مطالعه، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در دو مدل آزمایشگاهی (استفاده از کشت سلول) و مدل طبیعی (استفاده از جاندار) و در گروه‌های وزنی ۱۰۰، ۵۰۰ و ۹۰۰ گرمی با یکدیگر مقایسه شدند. در بخش نخست این مطالعه به منظور انجام روش کشت سلولی از ۵ قطعه ماهی هامور معمولی استفاده شد. ابتدا بدن ماهی ضدعفونی شده و پس از جدا کردن بافت کبد، بافت‌ها توسط آنزیم کلژناز تیپ ۴ هضم و به مدت ۲ هفته در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  در انکوباتور و محیط کشت (Lebowitz (L-15) کشت داده شدند. در بخش دوم این پژوهش از تعداد ۳ قطعه ماهی هامور معمولی استفاده شد. مطابق با نتایج حاصل از این مطالعه، اختلاف آماری معنی‌داری در بین دو مدل تحت مطالعه، مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). بررسی میزان همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های وزنی نیز بیانگر وجود همبستگی معنی‌دار در بین گروه‌ها بود ( $P < 0.05$ ). در مجموع با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، می‌توان به این نتیجه دست یافت که در مطالعات زیست‌شناختی، به جای استفاده از موجود زنده از روش کشت سلولی استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، کشت اولیه سلول‌های کبدی.

## مقدمه

به طور طبیعی در فرآیندهای متابولیسمی، گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS)<sup>۱</sup> تشکیل می‌شوند که با مولکول‌های مهم بدن نظیر لیپید، پروتئین و اسیدهای نوکلئیک واکنش می‌دهند. همه موجودات زنده دارای سیستم‌های محافظت کننده در مقابل واکنش‌های رادیکال‌های آزاد هستند از آن جمله می‌توان به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیوی اشاره کرد. در واقع این سیستم‌های محافظت کننده قادر هستند در شرایط طبیعی بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژنی تعادل ایجاد کنند. عدم وجود تعادل در این فرآیند منجر به عدم تعادل در سیستم هموستاز بدن و ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های مختلف موجودات زنده می‌شود. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل دو نوع آنزیمی و غیرآنزیمی است که برخی از انواع آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز است ( Ahmad et al., 2000; Kohen and Nyska, 2002; Wang et al., 2007). بنابراین به طور کلی، موجودات زنده برای جلوگیری از اثرات زیانبار گونه‌های فعال اکسیژنی دارای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی هستند که در شرایط فیزیولوژیکی معمول، سطح این مولکول‌ها را که در طی متابولیسم بدن ایجاد می‌شوند، به خوبی کنترل می‌کنند (Farombi et al., 2007; An et al., 2008).

پاسخ‌های دفاعی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی عموماً در همه موجودات خشکی‌زی و آبی‌زی مطرح است ( Zikic et al., 1996; Livingstone, 2001; Valavanidis et al., 2006; Miller et al., 2009) و به طور معمول به منظور ارزیابی پاسخ و میزان آنزیم‌ها در موجودات زنده، انجام برنامه‌های پایش زیست‌محیطی ضروری است. در بیش‌تر پژوهش‌های انجام شده در این زمینه از آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز استفاده شده است ( Akcha et al., 2000; Regoli et al., 2002; Sole et al., 2007) که به علت قابلیت میزان فعالیت این آنزیم‌ها در سطح بافت و سلول است.

طبق مطالعات انجام گرفته توسط سایر پژوهشگران، کبد به عنوان یک اندام متابولیسمی و فیزیولوژیکی، نقش مهمی در سم‌زدایی دارد ( Health, 1995; Hinton et al., 2001; Di Giulio and Hinton, 2008; Fernandes et al., 2008). بنابراین یکی از مهم‌ترین نشانگرهای زیستی

<sup>۱</sup> Reactive Oxygen Species

به منظور ردیابی آلاینده‌ها، پالایش آلودگی، سنجش وضعیت محیط و سلامت جاندار محسوب می‌شود و با توجه به عملکرد آن، غالب مطالعات زیست‌شناختی مانند ارزیابی فعالیت‌های اکسیداتیوی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، در این بافت صورت می‌گیرد (Stehr et al., 2004; Oliveria et al., 2008; Haschek et al., 2010). علاوه بر این، اندام کبد نقش مهمی در سنتز پروتئین‌ها از جمله پروتئین‌های پلاسما بر عهده دارد. عوامل گوناگونی مانند سموم و تغییرات شرایط محیطی مانند تغذیه، افزایش تعداد گلبول‌های قرمز خون، اختلال در تعادل آب بدن و تغییر در ساختار کبد نیز می‌تواند منجر به ایجاد تغییرات افزایشی یا کاهشی در میزان آنزیم‌های موجود در پلاسما شوند (Bernet et al., 2001; Fernandes et al., 2008).

در چند دهه اخیر، مطالعه و بررسی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و پاسخ اکسیداتیو به عنوان عاملی مفیدی برای تخمین وضعیت موجود در محیط‌های طبیعی و پرورشی، به میزان زیادی در حال افزایش است (Montero et al., 1996; Holmblad and Soderhall, 1999; Blos et al., 2014; Hernandez-Garcia et al., 2005). علاوه بر این، تکنیک‌های جایگزین در این زمینه مانند استفاده از کشت سلول‌ها مورد علاقه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است و در سرتاسر جهان یکی از متداول‌ترین روش‌ها در بررسی‌های زیستی محسوب می‌شود. از جمله مزایای این روش کاهش استفاده از حیوانات در پژوهش‌ها است و هم چنین می‌توان به تخمین نتایج با سرعت و دقت بیش‌تر اشاره کرد (Fent, 2001; Castano et al., 2003). در این روش، برای رشد سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی، باید شرایط کشت سلول‌ها در محیط کشت تا حدود زیادی مشابه با محیط طبیعی جاندار باشد. عواملی که در این کار نقش اساسی را برعهده دارند شامل غلظت اکسیژن، دی‌اکسید کربن، pH، اسمولاریته و غذا هستند.

در این مطالعه به منظور تعیین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در تیمارهای مختلف، از بافت کبد ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) استفاده شد. این گروه از ماهیان جز گونه‌های غالب و اصلی خلیج فارس و جنوب شرق آسیا محسوب می‌شوند و در منطقه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (Randal, 1995). بنابراین هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در ماهی هامور معمولی، به منظور مقایسه دو مدل استخراج شده از جاندار در شرایط آزمایشگاهی (استفاده از کشت سلولی) و شرایط

طبیعی (استفاده از جاندار) است، تا بدین وسیله تفاوت کلی بین میزان فعالیت آنزیم ها در سلول و هم چنین در بافت کبد جاندار مشخص شود. با توجه به اینکه مطالعاتی در زمینه کشت سلول و تخمین میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهی هامور معمولی صورت نگرفته است، بنابراین امکان مقایسه داده‌های حاضر با سایر مطالعات فراهم نبود و تنها مطالعات صورت گرفته در این گونه مربوط به تهیه رده‌های سلولی از قسمت باله جانور (Chi et al., 1999)، تهیه رده سلولی چشم در ماهی (Parameswaran et al., 2007) و تهیه رده سلولی مغز (Wen et al., 2008) است.

## مواد و روش‌ها

### روش جداسازی و کشت اولیه سلول‌های کبدی در ماهی هامور معمولی (مدل آزمایشگاهی)

در این مطالعه به منظور جداسازی سلول‌های کبدی، از هر گروه ۵ عدد ماهی هامور معمولی سالم و نابالغ که متعلق به ۳ گروه وزنی ۱۰۰، ۵۰۰ و ۹۰۰ گرمی بودند، به عنوان مدل حیوانی در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. در مرحله اول ماهی‌ها توسط (۲-فنوکسی اتانول ۰/۲ درصد) بیهوش شده، به طور کامل توسط اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شدند (Wen et al., 2008). لازم به ذکر است که کلیه مراحل نمونه‌گیری بافت در شرایط استریل و با استفاده از وسایل تشریح استریل و در زیر هود انجام شد. در ادامه روند کار، بافت کبد جاندار با استفاده از تیغ پیستوری از کیسه صفرا جدا شد و توسط قیچی جراحی و پنس در لوله فالكون حاوی نمک بافر فسفات (PBS)<sup>۱</sup> به همراه ۴۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۴۰۰ واحد در میلی‌لیتر استرپتومایسین که در درون یخ قرار داشت، منتقل شد. پس از شستشوی اولیه نمونه‌ها در محلول بافر، کلیه نمونه‌ها توسط قیچی استریل به قطعات ۱ cm<sup>۳</sup> تقسیم شدند. سپس به منظور هضم قطعات بافتی و مشاهده سلول‌های کبدی، نمونه‌های موجود به لوله فالكونی که دارای ۰/۱٪ آنزیم کلاژناز بود، منتقل شده، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تکان داده شدند. پس از این مرحله، به منظور خنثی کردن آنزیم تریپسین، مقداری محیط کشت (Lebowitz (L-15) که حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)<sup>۲</sup> بود، به نمونه‌ها اضافه شد. در این مرحله نیز به منظور جداسازی بهتر سلول‌ها از یکدیگر از فیلتری با منافذ

<sup>۱</sup> Phosphate-Buffered Saline

<sup>۲</sup> Fetal Bovine Serum

۷۰ میکرون استفاده شد و در نهایت، پلیت‌های سلولی حاصل، ۲ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰ rpm سانتی‌فیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل به همراه محیط کشت L-15 که حاوی FBS ۲۰٪ و مکمل انسولین، ترانسفرین، سلنیوم (ITS) ۱٪ بود، به درون فلاسک منتقل شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور فاقد گاز کربنیک انکوبه شد. در این مطالعه از محیط کشت L-15 استفاده شد که به جای قند گلوکز دارای گالاکتوز است و برای کشت سلولی در سیستم‌های فاقد دی‌اکسید کربن طراحی شده است (Lakra et al., 2011).

پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان انکوباسیون، سلول‌های غیرچسبیده از محیط فلاسک دور ریخته شد و سلول‌های چسبیده ۳ بار با PBS گرم شستشو داده شد و مجدداً محیط کشت L-15 حاوی FBS ۲۰٪ و ITS ۱٪ به نمونه‌ها اضافه شد. بعد از گذشت ۱۴ روز و مشاهده تراکم سلولی بیش از ۸۰٪ در کف فلاسک، سلول‌های حاصل با استفاده از آنزیم تریپسین از کف فلاسک جدا شدند و به پلیت‌های ۲۴ خانه منتقل شدند. ۲۴ ساعت پس از گذشت زمان انکوباسیون و اشباع شدن بیش از ۸۰٪ کف پلیت از سلول، سلول‌ها با استفاده از کاردک‌های مخصوص از کف پلیت جدا شدند. سپس عصاره سلولی حاصل به کرایوتیوپ‌هایی که حاوی بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ نرمال با pH ۷ بود، منتقل شد و تا زمان سنجش آنزیم در فریزر  $80^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شد.

#### استفاده از مدل حیوانی به منظور ارزیابی آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی

در این مطالعه نیز، ابتدا ماهیان توسط ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۱ گرم) توزین و به ۳ گروه وزنی ۱۰۰، ۵۰۰ و ۹۰۰ گرمی تقسیم شدند. سپس نمونه‌ها بیهوش شدند و از هر گروه وزنی ۵ تکرار در نظر گرفته شد. سپس بافت کبد به طور کامل از بدن جاندار خارج شد. در نهایت بخشی از بافت کبد برای سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در محفظه‌های پلاستیکی شماره‌گذاری شده منتقل و تا زمان سنجش آنزیم‌های مورد مطالعه در فریزر  $80^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شد.

### آنالیزهای بیوشیمیایی

برای انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در مدل آزمایشگاهی (استفاده از کشت سلول) از کرایوتیوپ‌های حاوی عصاره سلولی به همراه بافر فسفات پتاسیم استفاده شد و به منظور ارزیابی آنالیزهای بیوشیمیایی در مدل حیوانی (استفاده از جاندار) از حدود ۰/۳ گرم بافت کبد که به دقت از هر ماهی جدا شده بود، استفاده شد. در مجموع، هر دو گروه به صورت جداگانه در ۳ میکرولیتر از بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار با pH ۷/۵ هموژنیزه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و در نهایت به میکروتیوپ‌های استریل منتقل شد. از عصاره به دست آمده به منظور سنجش محتوای پروتئینی و فعالیت آنزیمی استفاده شد (An et al., 2008).

### پروتئین کل

به منظور سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز نیاز بود که در ابتدا میزان کل پروتئین‌های موجود در سرم بررسی شود که برای تخمین آن، از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. در این روش، میزان سرم آلبومین گاوی به عنوان محلول استاندارد در نظر گرفته شد و غلظت پروتئین در طول موج ۵۴۶ نانومتر و در دمای ۳۷°C به دست آمد.

### آنزیم کاتالاز (CAT)

به منظور اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز از روش Goth (۱۹۹۱) استفاده شد. در این روش مخلوط واکنش شامل PBS یک مولار، ۲/۰۷ میلی‌لیتر  $H_2O$ ، ۱۰ میکرولیتر عصاره خام و ۰/۶ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن یک مولار بود که به منظور سنجش آنزیم، ۰/۳ میلی‌لیتر از آن جدا شد و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تجزیه شدن پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی  $39/4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  اندازه‌گیری شد.

### آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم بر اساس مهار اتواکسیداسیون پیروگالل (۱، ۲، ۳ تری‌ال‌بنزن) محاسبه شد. سرعت اتواکسیداسیون پیروگالل در طول موج ۳۲۵ نانومتر سنجیده شد. بدین منظور

از بافر تریس ۵ میلی‌مولار استفاده شد. محلول حاصل توسط اسید کلریدریک به pH ۸ رسانده شد و با استفاده از آن، محلول ۰/۳ مولار پیروگال در بافر Tris-HCl و pH=۸ تهیه شد و طیف در طول موج ۳۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Maklund, 1974).

## ۲-۳-۴) آنالیزهای آماری

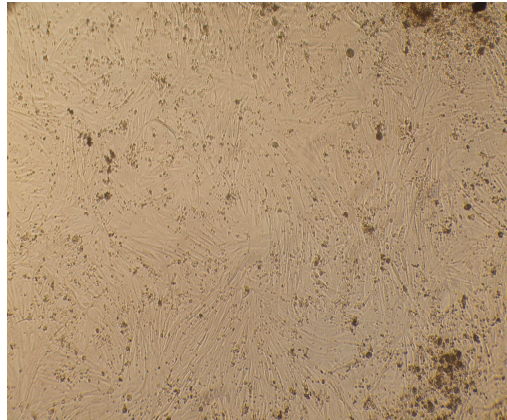
به منظور رسم نمودارها از نرم افزار Microsoft Office Excel, 2007 استفاده شد. کلیه داده‌های موجود در مطالعه حاضر (تعداد سلول‌ها در تیمارهای مختلف) با ۵ بار تکرار و به صورت میانگین در هر گروه متغیر ارائه شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه<sup>۱</sup> در نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ استفاده شد. در تمام بررسی‌ها نیز سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد و در صورت مشاهده اختلاف بین گروه‌ها از پس‌آزمون دانکن استفاده شد. برای تعیین ضریب همبستگی بین مقادیر آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در مدل طبیعی (استفاده از جاندار) و مدل آزمایشگاهی (استفاده از کشت سلول) در گروه‌های وزنی، از آزمون همبستگی و رگرسیون خطی استفاده شد و معادله رگرسیون به صورت  $Y = ax^2 + bx + c$  به دست آمد.

## نتایج

سلول‌ها ۷ روز پس از قرارگیری در محیط کشت شروع به رشد کردند و پس از گذشت ۱۴ روز از کشت اولیه سلول‌ها، اولین لایه سلولی در کف فلاسک مشاهده شد. شکل ۱ نیز لایه سلولی تشکیل شده بعد از قرارگیری سلول‌ها در کف پلیت‌های ۲۴ خانه را نشان می‌دهد.

---

<sup>۱</sup>One-way ANOVA



شکل ۱: تراکم سلولی حاصل در ماهی هامور معمولی پس از قرار دادن نمونه‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه در مدت زمان ۲۴ ساعت

برای محاسبه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز از سلول‌هایی که به میزان ۱۰۰٪ کف پلیت‌های ۲۴ خانه را اشباع کرده بودند، استفاده شد که در جدول ۱ میزان این آنزیم‌ها در گروه‌های وزنی ۱۰۰، ۵۰۰ و ۹۰۰ گرمی در محیط طبیعی (بدن جاندار) و در محیط آزمایشگاهی (استفاده از کشت سلول) نشان داده شده است.

طبق جدول ۱، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در شرایط طبیعی (استفاده از کبد جاندار) در همه موارد بیش‌تر از میزان فعالیت این آنزیم‌ها در شرایط آزمایشگاهی (استفاده از کشت سلول) است.

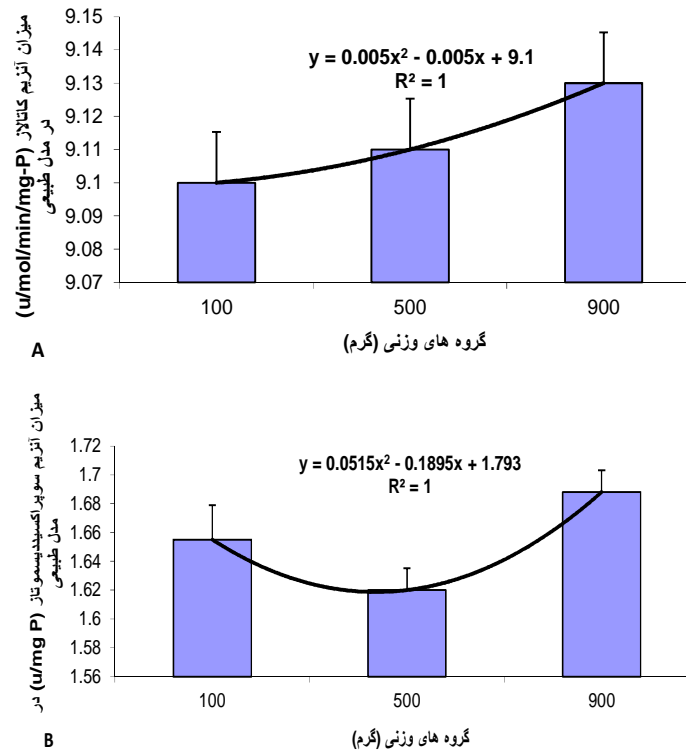


جدول ۱: میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در کشت سلولی و در بدن جاندار (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

دامنه تغییرات	تعداد	گروه طولی (سانتی‌متر)	گروه وزنی (گرم)	آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی	
۱/۶۴-۱/۶۶	۳	۱۵ $\pm$ ۲	۱۰۰		
۱/۶۲-۱/۶۴	۳	۲۴ $\pm$ ۲	۵۰۰	<b>SOD</b>	
۱/۶۷-۱/۷۰	۳	۳۰ $\pm$ ۳	۹۰۰		مدل طبیعی (بدن جاندار)
۹/۰۰-۹/۲۰	۳	۱۵ $\pm$ ۲	۱۰۰		
۹/۱۰-۹/۱۴	۳	۲۴ $\pm$ ۲	۵۰۰	<b>CAT</b>	
	۳	۳۰ $\pm$ ۳	۹۰۰		
۹/۱۲-۹/۱۴	۵	۱۵ $\pm$ ۲	۱۰۰		
۱/۳۸-۱/۴۱	۵	۲۴ $\pm$ ۲	۵۰۰	<b>SOD</b>	
۱/۳۶-۱/۳۸	۵	۳۰ $\pm$ ۳	۹۰۰		مدل آزمایشگاهی (کشت سلول)
۱/۴۰-۱/۴۲	۵	۱۵ $\pm$ ۲	۱۰۰		
۴/۵-۵	۵	۲۴ $\pm$ ۲	۵۰۰	<b>CAT</b>	
۵/۲-۵/۸	۵	۳۰ $\pm$ ۳	۹۰۰		

به منظور مقایسه بهتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بین دو مدل طراحی شده، شرایط آزمایشگاهی (کشت سلول) و محیط طبیعی (بدن جاندار)، از نمودارهای شکل‌های ۲ و ۳ استفاده شد. همانگونه که در این نمودارها مشاهده می‌شود اختلاف قابل توجهی در سطح پایه دو آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در بین دو مدل طراحی شده مشاهده شد. مطابق با نتایج آماری بررسی شده نیز اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های مختلف وزنی در هر دو مدل در آنزیم کاتالاز مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). نتایج حاصل شده از این روند در آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در مجموع، بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در دو مدل طراحی شده اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). اما بین هر یک از مدل‌ها در گروه‌های وزنی ۱۰۰، ۵۰۰ و ۹۰۰ گرمی اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ).

در شکل ۲ رابطه همبستگی در آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های وزنی در شرایط طبیعی با یکدیگر مقایسه شده‌اند.

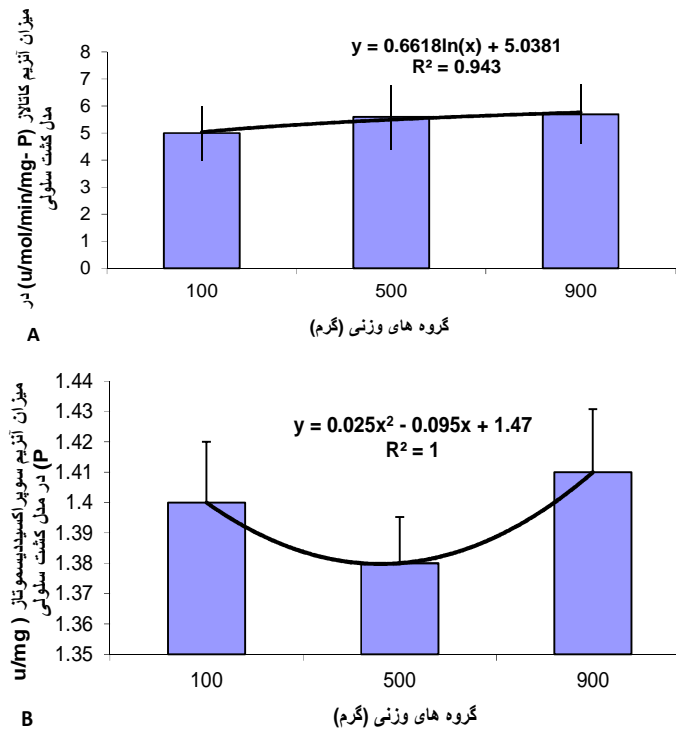


شکل ۲: (A) همبستگی میزان آنزیم کاتالاز در محیط طبیعی با گروه‌های وزنی؛ (B) همبستگی میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در محیط طبیعی با گروه‌های وزنی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار).

طبق نمودارهای شکل ۲ و همچنین نتایج حاصل از آنالیز آماری، بین دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز بافت کبد ماهی هامور معمولی در محیط طبیعی در بین گروه‌های مختلف وزنی همبستگی معنی‌داری وجود دارد.

رابطه همبستگی بین این دو آنزیم در شرایط آزمایشگاهی در شکل ۳ نشان داده شده است. همانگونه که در نمودارهای شکل ۳ مشاهده می‌شود، رابطه همبستگی معنی‌داری نیز در شرایط

آزمایشگاهی (استفاده از کشت سلول) در میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز بافت کبد ماهی هامور معمولی مشاهده شد.



شکل ۳: A) همبستگی میزان آنزیم کاتالاز در شرایط آزمایشگاهی (استفاده از کشت سلول) با گروه‌های وزنی (B) همبستگی میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط آزمایشگاهی با گروه‌های وزنی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار).

### بحث

در مطالعه حاضر به منظور مقایسه بهتر عملکرد و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در دو مدل آزمایشگاهی و شرایط طبیعی از بافت کبد ماهی هامور معمولی استفاده شد. هر آنزیم عملکردی ویژه و منحصر به فرد دارد که برای زنده ماندن سلول‌ها ضروری است (Michiels et al., 1994). با توجه به این که در تمامی گزارش‌ها و مطالعات صورت گرفته توسط پژوهشگرانی

مانند: Moerland و Sidell (۱۹۸۱) و Birnbaum و همکاران (۱۹۷۶) بیشترین میزان رشد سلول‌های کبدی در گروه وزنی ۲۰۰ تا ۸۰۰ گرمی مشاهده شده است و همچنین، با توجه به رشد کند و حساسیت بالای سلول‌های کبدی به تغییر شرایط، پیشنهاد شده است که از دما و شرایط مطلوب برای رشد هر گونه استفاده شود. بنابراین با توجه به وجود محدودیت در کشت‌پذیری سلول‌های کبدی، در این مطالعه از ماهیانی که در گروه‌های وزنی زیر یک کیلوگرم بودند برای مقایسه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده شد.

علاوه بر این، عدم وجود اطلاعات کافی در زمینه کشت سلول‌های آبزیان به ویژه در این گونه از ماهیان، امکان مقایسه داده‌های مطالعه حاضر با سایر پژوهش‌های انجام گرفته در این زمینه را بسیار محدود کرده است. بنابراین کلیه نتایج در این پژوهش به صورت فرضیه مطرح شده است و لزوم انجام پژوهش‌های بیشتر در این زمینه مشاهده می‌شود. Sturm و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که در شرایط طبیعی موجود حساس‌تر از شرایط آزمایشگاهی است. آن‌ها همچنین در مطالعات خود بیان کردند که برای اثبات این فرضیه به پژوهش‌های بیشتری نیاز است. Freshney (۱۹۸۷) نیز در پژوهش‌های خود بیان کرد که کشت‌های اولیه سلولی ممکن است نشان دهنده مدلی از بافت در شرایط و محیط طبیعی باشد. اما برای دست یافتن به این مهم نیاز است که اندام‌ها و کشت‌های مختلف در گونه‌های ماهیان بررسی شود تا میزان شباهت و یا تفاوت در بین اندام‌ها و گونه‌ها مشخص شود.

آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که در بافت کبد بیشترین میزان فعالیت را دارند و به نظر می‌رسد دلیل اهمیت این آنزیم‌ها، به خاطر جایگاه ویژه واکنش‌های اکسیدانی چندگانه و حداکثر تولید رادیکال‌های آزاد در این بافت باشد (Gule et al., 1997). نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج به دست آمده از مطالعه غواصی (۱۳۹۱) که میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را به عنوان نشانگرهای زیستی مناسب برای پایش آلودگی‌های حاصل از هیدروکربن‌های حلقوی (فنانترن) معرفی کردند، مطابقت دارد. آن‌ها در نتایج خود، میزان سطح پایه آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را در یک گروه وزنی ۲۰۰ گرمی معرفی کردند که مطابق با نتایج ارائه شده در این پژوهش است.

Holmblad و Soderhall (۱۹۹۹) نیز نتایج مشابهی را ارائه دادند. آن‌ها در پژوهش‌های خود بیان کردند که سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و پاسخ اکسیداتیوی از جمله پارامترهای سودمندی هستند که به منظور تخمین و بررسی پاسخ ایمنی موجود در محیط‌های طبیعی و آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Adams et al., 1990; Fernandes et al., 2008; Haschek et al., 2010). علاوه بر این، آن‌ها در مطالعات خود گزارش کردند که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با توجه به محیط زندگی جاندار، بافت مورد بررسی و همچنین مراحل مختلف رشد و نمو و شرایط فیزیولوژیکی بدن موجودات زنده، متفاوت است.

بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در محیط طبیعی و آزمایشگاهی مشخص شد که میزان فعالیت در هر دو آنزیم دارای روندی هماهنگ و مشابه است و همانگونه که در شکل‌های ۲ و ۳ ترسیم شده، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت جاندار (مدل طبیعی) در مقایسه با کشت سلولی (مدل آزمایشگاهی) بیش‌تر بود که به نظر می‌رسد به علت نحوه عملکرد سلول‌ها به عنوان کوچک‌ترین عضو زیست‌شناختی در بدن موجود زنده باشد. از طرف دیگر وجود برهم‌کنش سایر اعضا، بر متابولیسم بافت کبدی تاثیر داشته، سبب ایجاد تغییر در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در بافت کبد می‌شود. در واقع با قرارگیری جاندار در معرض عوامل محیطی، موجود زنده دچار تغییرات ساختاری و عملکردی می‌شود. این تغییرات ابتدا در سطح ژن مشاهده می‌شود و سپس با پاسخ در سطح سلول، بافت، اندام و کل موجود دنبال می‌شود (Stentiford et al., 2003; Thophon et al., 2003; Au, 2004; Oliveria et al., 2008).

زیرا تعادل اولیه بین مواد شیمیایی و موجودات زنده در سطح سلول رخ می‌دهد.

میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز نیز ممکن است به عواملی مانند میزان تولید آنزیم در موجود، سن و جنس وابسته باشد. در واقع آنزیم سوپراکسید دیسموتاز آنزیمی است که تبدیل آنیون سوپراکسید را به اکسیژن مولکولی و پراکسید هیدروژن امکان پذیر می‌کند و بنابراین نقشی حیاتی را در مکانیسم‌های سلولی و دفاع آنتی‌اکسیدانی بر عهده دارد (Orbea and Cajaraville, 2007; Radovanovic et al., 2010) که در پی افزایش آن، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نیز به منظور تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن افزایش می‌یابد. بنابراین القا فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز بیانگر افزایش میزان فعالیت اکسیژن و

پراکسید هیدروژن است. در مجموع، ارتباط هماهنگی بین میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مشاهده می‌شود. Filho و همکاران (۱۹۹۳) نیز، میزان فعالیت دو آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را در ۶ گونه از ماهیان دریایی سنجیدند. نتایج این پژوهش‌ها نشان دهنده وجود ارتباط مثبت بین هر دو آنزیم در بافت کبد تمامی ماهیان تحت مطالعه است.

علاوه بر این، به نظر می‌رسد که عدم وجود تغییرات زیاد در میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های وزنی مختلف، به علت یکسان بودن میزان فعالیت این آنزیم‌ها در شرایط طبیعی و بدون ایجاد استرس در بدن جاندار باشد (با توجه به این که این ماهیان پرورشی بودند، استرس کم‌تری را نسبت به ماهیان موجود در محیط طبیعی، متحمل می‌شوند). به علاوه، گمان می‌رود که وجود اختلاف در میزان فعالیت آنزیم‌ها در کوچک‌ترین گروه وزنی (۱۰۰ گرمی) نسبت به گروه وزنی ۵۰۰ گرمی به علت آسیب‌پذیر بودن بدن جاندار در مراحل ابتدایی رشد باشد. با توجه به اینکه رژیم غذایی در این گروه از ماهیان به صورت گوشت‌خواری است (استفاده از ماهی مید *Liza macrolepis*)، به نظر می‌رسد که افزایش هر دو آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه وزنی ۹۰۰ گرمی به علت تغذیه از ماهیان چرب صورت گرفته است. این نتایج توسط Craemer و همکاران (۱۹۹۴) نیز گزارش شده است. آن‌ها در مطالعات خود بر روی موش نشان دادند تیمارهایی که به مدت ۲ هفته از رژیم غذایی ماهیان چرب استفاده کردند، نسبت به گروه‌های شاهد که از سایر گروه‌های غذایی استفاده کرده بودند، از میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز بیش‌تری برخوردار بودند که تایید کننده نتایج مشاهده شده در این پژوهش است. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیمی در بافت جاندار نسبت به سلول، به علت وجود مکانیسم‌های مختلف بافت کبدی باشد که می‌توانند در تسریع و یا کند کردن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دخالت داشته باشند و بنابراین کاملاً طبیعی به نظر می‌رسد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول کم‌تر از بافت جاندار باشد. در مجموع تشابه یافته‌های به دست آمده از هر دو مدل، نشان دهنده تشابه نتایج در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی است (Lilius et al., 1995).

نتایج آزمون رگرسیون نیز که به منظور بیان ارتباط و همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و گروه‌های سنی در محیط طبیعی و محیط آزمایشگاهی صورت گرفت، نشان دهنده وجود ارتباط مشخص و معنی‌دار در بین هر یک از گروه‌های به دست آمده در هر یک

از مدل‌ها، بود. در نتیجه می‌توان به این مهم دست یافت که روند تغییرات در محیط آزمایشگاهی (استفاده از کشت سلولی) مشابه با محیط طبیعی (بدن جاندار) است. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های زیستی از روش جایگزین استفاده از حیوانات (بهره‌گیری از کشت سلول) استفاده کرد.

### **تشکر و قدردانی**

در پایان از بخش آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اهواز (جندی‌شاپور) و به ویژه جناب آقای مهندس صارمی که در انجام این پژوهش یاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌شود.

## منابع

- غواصی ل. ۱۳۹۱. اثرات استرس مواجهه با فنانتین بر شاخص‌های آنزیم‌های کبدی ماهی هامور معمولی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر. ۸۰ص.
- Adams S.M., Shugart L.R., Southworth G.R. and Hinton D.E. 1990.** Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: McCarthy J.F. and Shugart L.R. (Eds). Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, Pp: 333–353.
- Ahmad I., Hamid T., Fatima M., Chand H.S., Jain S.K., Athar M. and Raisuddin S. 2000.** Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1523(1): 37–48.
- Akcha F., Izuel C., Venier P., Budzinski H., Burgeot T. and Narbonne J.F. ۲۰۰۰.**  $\text{C}_{12}$  and  $\text{C}_{18}$  aldehydes formation in benzo[a]pyrene contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 49: 269–287.
- An R., Li Y., Niu X. and Yu H., 2008.** Responses of oxidant enzymes in catfish exposed to liquid crystals from E-waste. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 5(2): 99–103.
- Au D.W.T. 2004.** The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 817–8۳۴.
- Bernet D., Schmidt H., Wahli T. and Burkhardt-Holm P. 2001.** Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(2): 140–۱۴۷.
- Birnbaum M.J., Schultz J. and Fain I.N. 1976.** Hormone-stimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes. *The American journal of physiology*, 231: 191–197.
- Blos N.C., Dayeh V.R., Lee L.E.J. and Schirmer K. 2005.** Use of fish cell lines in the toxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology*. In: Mommsen T.P. and Moon T.W. (Eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol 6. Elsevier, Pp: 43–84.



- Bradford M.M.A. 1976.** Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Castano A., Bols N., Braunbeck T., Dierickx P., Halder M., Isomaa B., Kawahara K., Lee L.E., Mothersill C., Part P., Repetto G., Sintes J.R., Ruffli H., Smith R., Wood C. and Senger H. 2003.** The use of fish cells in ecotoxicology. *Alternatives to Laboratory Animals*, 31(3): 317–351.
- Chi S.C., Hu W.W. and Lo B.J. 1999.** Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases*, 22(3): 173–182.
- Craemer D.De., Vamecq J., Roels F., Vallee L., Pauwels M. and van den Branden C. 1994.** Peroxisomes in liver, heart and kidney of mice fed a commercial fish oil preparation: original data and review on peroxisomal changes induced by high-fat diets. *Journal of Lipid Research*, 35: 1241–1250.
- Di Giulio R.T. and Hinton D.E. 2008.** *The toxicology of fishes*. Boca Raton, Taylor and Francis Group, P: 1101.
- Farombi E.O., Adelowo O.A. and Ajimoko Y.R. 2007.** Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research Public Health*, 4(2): 158–165.
- Fent K. 2001.** Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro*, 15: 477–488.
- Fernandes C., Fontainhas-Fernandes A., Rocha E. and Salgado M.A. 2008.** Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos, Portugal: liver histological and biochemical effects in *Liza salines*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 145: 315–322.
- Filho D.W., Giulivi C. and Boveris A. 1993.** Antioxidant defenses in marine fish teleost. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology*, 106(2): 409–413.
- Freshney R.I., 1987.** *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Alan R. Liss Inc. New York, P: 397.

- Goth L. 1991.** A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196: 143–152.
- Gule I., Leonard B. and Holdway D.A. 1997.** Oil and dispersed oil toxicity to amphipods and snails. *Spill Sciences Technology Bulletin*, 4: 1–6.
- Haschek W.M., Walling M.A. and Rousseaux C. 2010.** *Fundamental of toxicologic pathology*. Academic Press, P: 686.
- Health A.G. 1995.** *Water Pollution and Fish Physiology*, Vol. 2. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, P: 340.
- Hernandez-Garcia A., Romero D., Gomez-Ramirez P., Maria-Mojica P. and Martinez-Lopez E. 2014.** In vitro evaluation of cell death induced by cadmium, lead and their binary mixtures on erythrocytes of common buzzard (*Buteo buteo*). *Toxicology in Vitro*, 28: 300–306.
- Hinton D.E., Segner H. and Braunbeck T. 2001.** Toxic responses of the liver. In: Schlenk D. and Benson W.H. (Eds). *Target organ toxicity in marine and fresh-water teleost*. Taylor and Francis, London, Pp: 224–268.
- Holmblad T. and Soderhall K. 1999.** Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172(13): 111–123.
- Kohen R. and Nyska A. 2002.** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomenon, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicological Pathology*, 30: 620–650.
- Lakra W.S., Swaminathan T.R. and Joy K.P. 2011.** Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(1): 1–20.
- Lilius H., Sandbacka M. and Isomaa B. 1995.** The use of freshwater isolated gill epithelial cells in toxicity testing. *Toxicology in Vitro*, 9: 299–305.
- Livingstone D.R. 2001.** Contaminant-stimulated reactive oxygen species Production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 656–666.
- Maklund S. 1974.** Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 46: 469–474.
- Michiels C., Raes M., Toussaint O. and Remacle J. 1994.** Importance of S-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17: 235–248.

- Miller L.L., Rasmussen J.B., Palaceb V.P. and Hontela A. 2009.** The physiological stress response and oxidative stress biomarkers in rainbow trout and brook trout from selenium-impacted streams in a coal mining region. *Journal of Applied Toxicology*, 29(8): 681–688.
- Moerland T.S. and Sidell B.D. 1981.** Characterization of metabolic carbon flow in hepatocyte isolated from thermally acclimated killifish *Fundulus heteroclitus*. *Physiological Zoology*, 54(3): 379–389.
- Montero M., Le Belle N., Vidal B. and Dufour S. 1996.** Primary cultures of dispersed pituitary cells from estradiol-pretreated female liver eels (*Anguilla anguilla*): Immunocytochemical characterization of gonadotropic cells and stimulation of gonadotropin release. *General and Comparative Endocrinology*, 104(1): 103–115.
- Radovanovic T.B., Mitic S.S.B., Perendija B.R., Despotovic S.G., Pavlovic S.Z., Cakic P.D. and Saicic Z.S. 2010.** Superoxide dismutase and catalase activities in the liver and muscle of barble (*Barbus barbus*) and its intestinal parasite (*Pomphorynchus laevis*) from the Danube River, Serbia. *Archives of Biological Science Belgrade*, 62(1): 97–105.
- Randal J.E. 1995.** Coastal fishesh of Oman. University of Hawaii Press, Honolulu, P: 439
- Regoli F., Gorbi S., Frenzilli G., Nigro M., Corsi I., Focardi S. and Winston G.W. 2002.** Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research*, 54: 419–423.
- Oliveria M., Pacheco M. and Santos M.A. 2008.** Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Science of Total Environment*, 96: 70–78.
- Orbea A. and Cajaraville M.P. 2007.** Peroxisome proliferation and antioxidant enzymes in transplanted mussels of basque estuaries with different levels of polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl pollution. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 1616–1626.
- Stehr C.M., Myers M.S., Johnson L.L., Spencer S. and Stein J.E. 2004.** Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada. *Marine Environmental Research*, 75: 55–74.

- Sole M., Buet A., Ortiz L., Maynou F., Bayona J.M. and Albaiges J. 2007.** Biochemical responses in mussels exposed to the water-accommodated fraction of the " Prestige" fuel oil. *Scientia Marina*, 71: 373–382.
- Stentiford G.D., Longshaw M., Lyons B.P., Jones G., Green M. and Feist S.W. 2003.** Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environment Research*, 55: 137–159.
- Sturm A., Cravedi J.P., Perdu E., Baradat M. and Segner H. 2001.** Effects of prochloraz and nonylphenol diethoxylate on hepatic biotransformation enzymes in trout: a comparative in vitro/ in vivo-assessment using cultured hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 53: 229–245.
- Parameswaran V., Ishaq Ahmed V.P., Ravi S., Bhonde R.P. and Sahul Hameed A. S. 2007.** Development and characterization of two new cell lines from milkfish (*Chanos chanos*) and grouper (*Epinephelus coioides*) for virus isolation. *Marine Biotechnology*, 9: 281–291.
- Thophon S., Kruatrachue M., Upatham E.S., Pokethitiyook P., Sahaphong S. and Jaritkhuan S. 2003.** Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 121: 307–320.
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M. and Scoullos M. 2006.** Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 64: ۱۷۸- ۱۸۹.
- Wang L., Li Y. and Yan B. 2007.** Effect of cadmium on SOD and POD isozyme in tissues of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*). *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 13(6): 823–829.
- Wen C.M., Lee C.W., Wang C.S., Cheng Y.H. and Huang H.Y. 2008.** Development of two cell lines from *Epinephelus coioides* brain tissue for characterization of betanodavirus and megalocytivirus infectivity and propagation. *Aquaculture*, 278: 14–21.
- Zikic R.V., Saicic Z.S., Spasic M.B., Ziemnicki K and Petrovic V.M. 1996.** The activities of superoxide dismutase, catalase and ascorbic acid content in the liver of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiological Research*, 45: 479–481.

## Comparative study of the basic levels of antioxidant enzyme activity superoxide dismutase and catalase enzymes of fish grouper (*Epinephelus coioides*) in *in vitro* and *in vivo* models

Negin Derakhshesh<sup>1</sup>, Abdolali Movahedinia<sup>2\*</sup>, Negin Salamat<sup>3</sup>, Mahmoud Hashemitabar<sup>4</sup>, Vahid Bayati<sup>5</sup>

1- Ph.D Student in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

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

3- Assistant Professors in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

4- Associated Professors in Department of Anatomical sciences, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of medical sciences, Ahvaz, Iran.

5- Assistant Professors in Department of Anatomical sciences, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of medical sciences, Ahvaz, Iran.

Received: October 2014

Accepted: December 2014

### Abstract

In present study, two natural antioxidant enzyme, catalase and superoxide dismutase, activities were compared in different conditions, *in vivo* and *in vitro* models, and weights (100, 500 and 900 g) in grouper *Epinephelus coioides*. After wiping the fishes with, the liver was removed and digested by collagenase type 4. Then, the separated cells were cultured in Lebowitz (L-15) medium and incubated at 30°C for two weeks. In the next stage of the study, three grouper in each group were used. According to the results, a statistically significant difference was observed between two models ( $P < 0.05$ ). A significant correlation was also observed in the activity of antioxidant enzymes among weight groups ( $P < 0.05$ ). Taken together, according to the results, despite the significant differences between them it was concluded that the *in vivo* and *in vitro* models are so similar; therefore, cell culture can be utilized in biological studies of antioxidant enzymes in liver as an alternative method to *in vivo* model.

**Key words:** Catalase, Superoxide Dismutase, Primary Hepatocyte Cell Culture.

\*Corresponding Author: amovahedinia@yahoo.com

