

## مقاله علمی - پژوهشی:

## فعالیت کمپلمان‌ها در کشت اولیه سلول‌های طحال و رأس کلیه ماهی شانک عربی (*Acanthopagrus arabicus*) در مواجهه با دگرامتازون

فاطمه نزهت<sup>۱</sup>، محمدعلی سالاری علی‌آبادی\*<sup>۲</sup>، نگین سلامات<sup>۱</sup>، هدا مجیری فروشانی<sup>۲</sup>، حسن مروتی<sup>۳</sup>

\*salari@kmsu.ac.ir

۱- گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر،

خرمشهر، ایران

۲- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران

۳- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۳

### چکیده

داروها آلاینده‌های نوظهوری هستند که به دلیل تخلیه آنها به اکوسیستم‌های آبی از طریق فاضلاب در سراسر جهان، نگرانی‌های زیادی را به خود جلب کرده‌اند. با این حال، مطالعات محدودی در مورد اثرات این آلاینده‌ها بر حیوانات آبی وجود دارد. دگرامتازون یک گلوکوکورتیکوئید مصنوعی قوی با اثرات ضد التهابی و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی است. مطالعه حاضر به بررسی تأثیر دگرامتازون بر فعالیت اجزاء کمپلمان سلول‌های رأس کلیه و طحال ماهی شانک عربی (*Acanthopagrus arabicus*) در شرایط آزمایشگاهی پرداخت. برای این منظور، سلول‌های طحال و رأس کلیه کشت شده در مواجهه با غلظت‌های مختلف دگرامتازون (غلظت‌های آزمایشی ۳، ۳×۱۰<sup>-۱</sup>، ۳×۱۰<sup>-۲</sup> و ۳×۱۰<sup>-۳</sup> میکروگرم بر میلی‌لیتر برای طحال و غلظت‌های ۱۰×۳، ۱۰×۳<sup>-۱</sup> و ۱۰×۳<sup>-۲</sup> میکروگرم بر میلی‌لیتر برای رأس کلیه) قرار گرفتند. پس از ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، اثرات سمی دگرامتازون بر اجزاء سیستم کمپلمان بررسی شد. نتایج نشان داد که حساسیت سلول‌های طحال و رأس کلیه کشت شده به دگرامتازون به طور وابسته به دوز افزایش می‌یابد. دگرامتازون به طور معنی‌داری محتوای C3 سلول‌های کشت شده را کاهش داد در حالی که تغییر قابل توجهی در محتوای C4 و ACH50 سلول‌های کشت شده ایجاد نکرد. همچنین تأثیر دگرامتازون بر سلول‌های رأس کلیه بیش از طحال بود. بر اساس نتایج، جنبه سرکوب‌کننده سیستم ایمنی دگرامتازون عمدتاً به دلیل اثرات سرکوب‌کننده آن بر سطح جزء C3 کمپلمان‌هاست. توصیه می‌شود در آینده، تأثیرات آلاینده دارویی دگرامتازون بر آبزبان بیشتری از جمله ماهیان مدل نیز انجام شود.

**لغات کلیدی:** دگرامتازون، سیستم کمپلمان، آلاینده‌های دارویی، *Acanthopagrus arabicus*

\*نویسنده مسئول



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## مقدمه

داروها گروه بزرگی از مواد شیمیایی هستند که به دلیل به ارمغان آوردن زندگی سالم‌تر و طولانی‌تر برای بشریت تجویز می‌شوند. طبق گزارش‌ها، تنها حدود ۱۰ درصد داروها در بدن مصرف شده، مابقی دفع شده و اغلب از طریق فاضلاب‌های صنعتی، خانگی، شهری به‌ویژه بیمارستانی وارد اکوسیستم می‌شوند. غلظت آنها در سطح نانوگرم و میلی‌گرم در محیط‌های آبی تأیید شده است. حضور مواد دارویی در محیط‌های آبی، به دلیل عدم تجزیه و تخریب آسان، زمان ماندگاری طولانی و تغییرات ژنتیکی بر میکروارگانیسم‌ها در اکوسیستم‌های آبی، تهدید بالقوه برای سلامت انسان و سایر جانداران است و می‌تواند منجر به اثرات و پاسخ‌های زیست محیطی غیرقابل پیش‌بینی شود. با توجه به معرفی یا تشخیص نسبتاً جدید این آلودگی‌ها، دانش کاملی در مورد این آلودگی‌ها، رفتار و اثرات آنها در محیط زیست و روش‌های کارآمد حذف آنها وجود ندارد. شایان ذکر است، حضور مواد دارویی در کنار هم در اکوسیستم می‌تواند منجر به تشکیل پیوندها و مواد شیمیایی جدید شود که حتی از شکل اولیه خود بسیار خطرناک‌تر و سمی‌تر هستند (Anumol *et al.*, 2013). تا به امروز بیش از ۱۵۰ ترکیب فعال دارویی در اکوسیستم آبی شناسایی شده است و این فهرست همچنان در حال گسترش است. کورتیکواستروئیدهای مصنوعی (داروهای ضد التهابی استروئیدی)، به طور گسترده‌ای در پزشکی و دامپزشکی استفاده می‌شوند. این داروها به دلیل مصرف زیاد و حذف ناقص آنها طی فرآیندهای تصفیه فاضلاب، یکی از رایج‌ترین داروهای شناخته‌شده در تصفیه خانه‌ها و آبهای سطحی در سراسر جهان هستند (Bjelakovic *et al.*, 2007). کورتیکواستروئیدها در رده سرکوب‌کننده‌های سیستم ایمنی طبقه بندی می‌شوند. این ترکیبات بر سلول‌های لنفوسیت T نابالغ (تیموسیت‌ها و بلاست‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد)، تأثیر منفی می‌گذارند (Coutinho and Chapman, 2011). دگزامتازون یک گلوکوکورتیکوئید مصنوعی قوی با اثرات ضد التهابی و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی است که برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله آلرژی، آسم، کووید-۱۹،

مشکلات روماتیسمی و بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود (Sanders *et al.*, 2020). امروزه افزایش روزافزون دگزامتازون از منابعی مانند بیمارستان‌ها از نگرانی‌های جهانی است. سطوح بالایی از این دارو که از مشتقات کورتیزون است، در پساب فاضلاب شناسایی شده است (Herrero *et al.*, 2013). گزارش شده است که آب رودخانه جمع‌آوری شده در پایین دست یک کارخانه داروسازی فرانسوی حاوی مقادیر بالایی دگزامتازون (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) بوده است (Brank *et al.*, 1998). با این حال، تحقیقات محدودی در مورد اثرات نامطلوب بالقوه دگزامتازون به عنوان یک آلاینده آبی بر حیوانات آبی وجود دارد. پیامدهای سمی و مضر متفاوتی از دگزامتازون در سطوح فیزیولوژیک، مورفولوژیک و حتی مولکولی در ماهیان گزارش شده است (Chen *et al.*, 2016). ماهیانی که بیش از ۳۵ روز در معرض دگزامتازون قرار داشتند، با مصرف انرژی بیشتر، نرخ رشد آنها کمتر می‌شود (Jerez-Cepa *et al.*, 2019). کورتیکوئیدها اثرات متفاوتی بر ماهیان دارند که سمی‌ترین آنها دگزامتازون است. اگرچه دگزامتازون با غلظت پایین به اکوسیستم‌ها رها می‌شود، اما می‌تواند جمعیت ماهی‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (Guiloski *et al.*, 2015). کاهش در سطح تستوسترون، اختلال در تولید مثل، رشد جنین و تغییر شکل ماهی از عوارض وجود دگزامتازون است (Milla *et al.*, 2009).

سیستم کمپلمان به عنوان یکی از اجزاء مهم سیستم ایمنی ذاتی در مهره‌داران اکتوترمیک از جمله ماهی‌هاست که تاکنون کمتر کار شده است. ارزیابی فعالیت کمپلمان سرم به عنوان یک ابزار با ارزش برای تشخیص وضعیت سلامتی ماهی‌ها محسوب می‌شود. کمپلمان در پاسخ ایمنی غیراختصاصی به یک ترکیب می‌تواند اثر مؤثر مستقیمی مانند کشتن پاتوژن به‌وسیله لایز کردن آن داشته باشد (Ellis, 1999). سیستم کمپلمان از اجزاء پروتئینی موجود در سرم تشکیل شده است. فعالیت همولیتیک کمپلمان سرم به عنوان عملکردی از طریق مسیر فرعی در نظر گرفته می‌شود و ثابت شده است که وجود برخی تفاوت‌ها بین پستانداران و ماهیان استخوانی، نشان‌دهنده اهمیت بیشتر مسیر فرعی در پاسخ ایمنی ذاتی ماهیان استخوانی در

شرایط آزمایشگاهی بود. آلودگی آب می‌تواند منجر به سرکوب سیستم ایمنی و مشکلات تولید مثلی شود که آبریان را منقرض می‌کند و قطعاً تحقیقات بوم‌شناسی بر ماهیان تجاری که مصرف خوراکی برای انسان دارند، اهمیت به‌سزایی دارد. همچنین ورود آلاینده‌های شهری، صنعتی و کشاورزی به اکوسیستم‌های آبی در دراز مدت، خطرات بالقوه‌ای را برای سلامتی انسان به‌دنبال خواهد داشت. ماهی شانک عربی یکی از پرطرفدارترین و بازاری‌پسندترین ماهیان کشورهای حاشیه خلیج فارس است و به دلیل اهمیت اقتصادی در جنوب ایران پرورش داده می‌شود. این ماهی به دلیل اهمیت تجاری آن در منطقه راپمی انتخاب شد.

## مواد و روش کار

### نمونه‌برداری از ماهیان

پانزده ماهی شانک عربی (*A. arabicus*) با میانگین وزنی ۲۰۰ گرم و میانگین طولی ۲۰ سانتی‌متر از خور بحرکان (شمال غربی خلیج فارس، ایران) جمع‌آوری شده و به طور زنده به آزمایشگاه منتقل شدند. ماهیان در آزمایشگاه، در مخازن ۱۰۰ لیتری حاوی آب دریای استریل شده، هوادهی شده، فیلتر شده با اشعه ماوراء بنفش و با ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین به مدت یک هفته نگهداری شدند (دمای  $28 \pm 0.8$  درجه سانتی‌گراد و pH: ۷/۵). ماهیان دو بار در روز با غذای ماهی تجاری Tetra Pro تغذیه می‌شدند. تغذیه ماهیان ۲۴ ساعت قبل از نمونه برداری متوقف شد. پس از هفت روز سازگاری، ماهی‌ها با استفاده از ۲- فنوکسی اتانول (۰/۳۵ میلی‌لیتر در لیتر) بیهوش شده و تمام سطح بدن به‌وسیله الکل اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شدند (Serezli *et al.*, 2012). سپس ماهی‌ها در شرایط آسپتیک، تشریح شده و طحال و رأس کلیه آنها جدا شد (Wen *et al.*, 2008). بافت‌های جدا شده سه بار با ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت Leibovitz's L-15 (L-15، گیبکو، ایالات متحده آمریکا) حاوی آنتی بیوتیک شامل ۴۰۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر پنی سیلین، ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمفوتریسین B شسته شدند.

مقایسه با پستانداران است (Whyte, 2007). کمپلمان‌ها باعث از بین رفتن دیواره سلولی باکتری‌ها می‌شوند و در تحریک فعالیت فاگوسیتوز گلبول‌های خونی نیز مؤثرند (Holland and Lambris, 2002). از آنجایی که سیستم ایمنی ماهیان اولین سیستم دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا و آلاینده‌های محیطی است، لذا پاسخ سریع آن به استرس ناشی از پاتوژن‌های عفونت‌زا یا مواد سمی موجود در محیط و مواد غذایی را می‌توان از طریق تغییر در فعالیت یا سطح برخی شاخص‌های ایمنی که ممکن است به عنوان شاخص و نشانگر هشداردهنده استرس‌های محیطی شناخته می‌شوند، مورد بررسی قرار داد (Ahmadi *et al.*, 2014).

سیستم کمپلمانی نقش حیاتی در سیستم ایمنی ذاتی دارد و با ترغیب سلول‌های B به تکثیر، بر ایمنی اکتسابی نیز تأثیر می‌گذارد (Lovoll *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013). سیستم کمپلمانی اولین جزء سیستم ایمنی ذاتی در ماهیان است که تکامل می‌یابد. فعال شدن پی در پی کمپلمان‌ها از سه مسیر که تا حدی با هم هم‌پوشانی دارند، رخ می‌دهد که در هر سه مسیر شاخص‌های C3 و C4 پروتئین‌های کلیدی محسوب می‌شوند. یافته‌های جدید سلولی و مولکولی نشان داد که پروتئین‌های کمپلمانی در محل‌های مختلفی سنتز می‌شوند. شاخص C3 یکی از پروتئین‌های عمده در سیستم کمپلمان در ماهی است و معمولاً به عنوان آغازگر برای مسیرهای کلاسیک به‌شمار می‌رود و فعال شدن آن منجر به تشکیل یک کمپلکس نفوذ کننده می‌شود که قادر است غشاء سلولی عوامل بیماری‌زا را لیز نماید و از طریق ایجاد التهاب و تولید آنافیلاتوکسین، عوامل بیماری‌زا را حذف نماید (Pushpa *et al.*, 2014). C4 یک گلیکوپروتئین است که به‌وسیله ماکروفاژها و مونوسیت‌ها ساخته می‌شود و نقش کلیدی در ایمنی و تحمل ماهی‌ها دارد و پس از شناسایی برخی عوامل عفونت‌زا با سایر عوامل پروتئینی مؤثر در سیستم ایمنی، برهم‌کنش نشان می‌دهد تا عوامل عفونت‌زا را از میان ببرند (Lovoll *et al.*, 2007). در این زمینه، با توجه به تازگی تحقیقات بر آلاینده‌های دارویی به‌ویژه در خلیج فارس، هدف این مطالعه بررسی اثرات نامطلوب دگزامتازون بر سیستم ایمنی ماهی شانک عربی خلیج فارس (*Acanthopagrus arabicus*)، در

## کشت سلول‌های طحال

کشت سلول طحال مطابق روش Huang و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. پس از شستشو، بافت‌های طحال با استفاده از اسکالپل در محیط کشت تازه حاوی آنتی‌بیوتیک خرد شده و سپس با استفاده ۲ میلی‌لیتر محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد (گیبکو، ایالات متحده آمریکا) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق هضم شدند. بافت‌های نرم شده از غربال سلولی نایلونی ۱۰۰ میکرومتری (Corning®) عبور داده شدند تا بافت‌های بزرگ هضم نشده و مایع رویی فیلتر شود. سپس، فیلتر دو بار در محیط تازه به حالت تعلیق درآمد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۶۰g سانتریفیوژ شد. سپس، محیط کشت تازه (محیط کشت L-15) حاوی ۲۰ درصد سرم آلبومین گاوی (FBS)، ۴۰۰ واحد بین‌المللی در

میلی‌لیتر پنی سیلین، ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمفوتریسین B، ۵ میلی‌مولار NaHCO<sub>3</sub> و ITS (انسولین، ترانسفرین، سلنیوم) ۰/۵ درصد به پلیت سلولی افزوده شد. میزان بقاء سلول‌ها با استفاده از آزمون تریپان بلو تعیین شد. این آزمون بر اساس توانایی رنگ تریپان بلو (Sigma-Aldrich) برای عبور از غشاء سلول‌های مرده و تغییر رنگ این سلول‌ها به آبی است. ۱۰ میکرولیتر محلول رنگی تریپان بلو (۰/۱ درصد تریپان بلو در PBS ۰/۱۵ مولار) به ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه شد. سپس تعداد سلول‌های رنگ شده (مرده) و سلول‌های رنگ نشده (سلول‌های زنده) شمارش شد. سپس میزان بقاء سلولی با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد (Kemnitzer et al., 2007):

$$\text{درصد بقای سلولی} = \text{تعداد سلول‌های مرده} / \text{تعداد کل سلول‌های شمارش شده} \times ۱۰۰$$

سلول‌های با قابلیت زنده ماندن بیش از ۹۰ درصد به فلاسک‌های کشت بافت ۲۵ سانتی‌متر مربع با تراکم  $1 \times 10^6$  سلول در میلی‌لیتر منتقل شدند. سلول‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز انکوبه شدند. آزمایش حذف تریپان بلو برای تعیین زنده ماندن سلول‌ها در طول آزمایش انجام شد.

## کشت سلول‌های رأس کلیه

کشت سلول‌های رأس کلیه مطابق روش Ribera و همکاران (۲۰۲۰) صورت گرفت. پس از شستشو، بافت رأس کلیه در محیط کشت L-15 حاوی آنتی‌بیوتیک (۵۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر فانجیزون و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین)، به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس بافت رأس کلیه خرد و با استفاده از ۱ میلی‌لیتر تریپسین ۰/۲۵ درصد به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق هضم شد. پس از آن بافت‌های هضم شده از غربال سلولی نایلونی ۲۰۰ میکرومتری (Corning®) عبور داده شدند. سوسپانسیون سلولی سپس با محلول پرکل با دور ۸۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا تعداد گلبول‌های قرمز کاهش یابد

(سانتریفیوژ در دور بالا همراه با محلول پرکل منجر به حذف گلبول‌های قرمز می‌شود). پس از شستشو با محیط کشت تازه، سوسپانسیون سلولی به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰g سانتریفیوژ شد. پس از خارج کردن مایع رویی، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت L-15 تازه (حاوی ۲۰ درصد سرم آلبومین سرم گاوی (FBS)، ۴۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمفوتریسین B، ۵ میلی‌مولار NaHCO<sub>3</sub> و ۰/۵ درصد ITS) به پلیت سلولی اضافه شد و میزان بقاء سلولی با استفاده از آزمون تریپان بلو تعیین شد. سلول‌های با قابلیت زنده ماندن بیش از ۹۰ درصد به فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی با تراکم  $1 \times 10^6$  سلول در میلی‌لیتر منتقل شده و به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. آزمایش حذف تریپان بلو برای تعیین زنده ماندن سلول در طول آزمایش انجام شد.

## تعیین غلظت‌های آزمایشی دگزامتازون

سمیت سلولی دگزامتازون با استفاده از روش MTT مطابق با Momeni و همکاران (۲۰۱۰) بررسی شد. تست MTT یک روش رنگ‌سنجی است که اساس آن بر احیای کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به‌وسیله آنزیم سوکسینات

هر چاهک) منتقل شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. میزان بقاء سلولی با استفاده از آزمون تریپان بلو ارزیابی شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت L-15 تازه حاوی غلظت‌های آزمایشی مختلف دگزامتازون به هر چاهک اضافه شده و میکروپلیت‌ها سپس در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. هر تیمار دارای سه تکرار بود. نمونه برداری از تیمارها در ساعات ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ آزمایش انجام شد. نمونه‌های جمع آوری شده برای تجزیه و تحلیل بعدی به میکروتیوب‌ها منتقل شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

#### تعیین اثرات سمی دگزامتازون بر اجزاء کمپلمان

##### سنجش C3 و C4

سطوح C3 و C4 با استفاده از روش ایمونوتوربیدیمتری به‌وسیله کیت‌های تجاری ماهی Double-antibody sandwich ELISA (شرکت Biorexfars، ایران) اندازه‌گیری شد. ابتدا هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ چاهکی به‌وسیله آنتی‌بادی مونوکلونال C3 و C4 پوشانده شدند. سپس سوسپانسیون سلولی به هر چاهک اضافه شده و میکروپلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. سپس آنتی‌بادی‌های C3 و C4 نشان‌دار شده با بیوتین به هر چاهک اضافه شد و با HRP-استرپتاویدین ترکیب شد تا یک کمپلکس ایمنی تشکیل شود. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون، میکروپلیت‌ها جهت حذف آنزیم‌های ترکیب نشده شسته شدند. با افزودن محلول کروموژن، رنگ محلول آبی شد. سپس اسید سولفوریک اضافه شد و رنگ محلول در نهایت به زرد تغییر یافت. در نهایت، تراکم نوری (OD) در ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. نتایج به صورت نانوگرم در هر میلی‌لیتر ارائه گردید (Zilva and Pannall, 1984).

دهیدروژناز میتوکندری و تشکیل بلورهای نامحلول فرمازان آبی رنگ است. شدت رنگ آبی با تعداد سلول‌های زنده و فعال متابولیک رابطه مستقیم دارد (Momeni *et al.*, 2010). برای تهیه محلول ذخیره (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول MTT)، ۵۰ میلی‌گرم پودر MTT در ۱۰ میلی‌لیتر PBS ۰/۱۵ مولار حل شد. برای تهیه محلول کاری (۵/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول MTT)، محلول ذخیره با استفاده از PBS ۰/۱۵ مولار ده برابر رقیق شد.

به طور خلاصه، سلول‌های کشت شده از فلاسک‌ها خارج شده و به میکروپلیت‌های کشت بافت ۹۶ چاهی با تراکم  $10^6$  سلول در هر چاهک منتقل شدند و ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر ۵ درصد  $CO_2$  رطوبت انکوبه شدند. سپس بر اساس غلظت دگزامتازون در اکوسیستم آبی، محیط کشت L-15 تازه حاوی دگزامتازون در غلظت‌های مختلف (۰ [شاهد]،  $10^{-1} \times 3$  مولار،  $10^{-2} \times 3$  مولار،  $10^{-3} \times 3$  مولار،  $10^{-4} \times 3$  مولار،  $10^{-5} \times 3$  مولار،  $10^{-6} \times 3$  مولار،  $10^{-7} \times 3$  مولار،  $10^{-8} \times 3$  مولار و  $10^{-9} \times 3$  مولار معادل  $10^{-10} \times 3$ ،  $10^{-5} \times 3$ ،  $10^{-4} \times 3$ ،  $10^{-3} \times 3$ ،  $10^{-2} \times 3$ ،  $10^{-1} \times 3$ ،  $10^{-3} \times 3$  و  $10^{-2} \times 3$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد (Brank *et al.*, 1998) و میکروپلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. تخمین محدوده غلظت مؤثر دگزامتازون و تعیین مقادیر IC50 بر اساس گزارش‌های موجود و همچنین مقدار گزارش شده دگزامتازون در اکوسیستم آبی بود (Guiloski *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016; Ribas *et al.*, 2016). پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها دو بار با PBS شسته شده و ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد. سپس میکروپلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آن ۲۵ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها با دور ۴۵۰g به مدت ۱۵ دقیقه شیک شدند. در نهایت، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

#### ارزیابی اثرات سمی دگزامتازون

سلول‌های طحال و رأس کلیه کشت شده به میکروپلیت‌های ۲۴ چاهکی ( $10^5$  سلول/ میلی‌لیتر محیط کشت L-15 در

دگزامتازون با استفاده از دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. غلظت به‌دست آمده ۸۶ نانوگرم بر لیتر بود.

### کشت اولیه سلول‌های رأس کلیه و طحال

در شکل ۱ (A و B)، سلول‌های طحال (A) و رأس کلیه (B) ماهی شانک عربی (*A. arabicus*)، پیش از انکوباسیون نشان داده شده است. با استفاده از آزمایش تریپان بلو میزان زنده ماندن سلول‌های طحال و رأس کلیه ۹۵٪ تعیین شد. سپس سلول‌های مشتق از طحال و رأس کلیه در محیط کشت L-15 به مدت دو هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از ۴۸ ساعت سلول‌ها شروع به رشد کردند و تشکیل کلنی ۵ روز پس از انکوباسیون آغاز شد. سلول‌ها به‌خوبی رشد کرده و طی ۱۲ روز به طور کامل ظرف کشت را اشغال کردند (شکل ۱C,D). در تمام مدت، سلول‌ها به صورت سلول‌های گرد در محیط کشت شناور بودند و به کف ظرف کشت نمی‌چسبیدند. آزمایش تریپان بلو نشان داد که بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها در طول آزمایش زنده و سالم بودند. دوازده روز پس از انکوباسیون، سلول‌ها پاساژ داده شدند. پاساژ دوم پانزده روز پس از انکوباسیون انجام شد و سپس سلول‌ها برای سنجش سمیت سلولی مورد استفاده قرار گرفتند.

### نتایج سنجش MTT

طی آزمایش MTT، جهت تعیین IC50 و محدوده غلظت مؤثر دگزامتازون، سلول‌های کشت شده طحال و رأس کلیه در معرض غلظت‌های مختلف دگزامتازون (۰ [شاهد]،  $10^{-1}$ ،  $3 \times 10^{-2}$  مولار،  $3 \times 10^{-3}$  مولار،  $3 \times 10^{-4}$  مولار،  $3 \times 10^{-5}$  مولار،  $3 \times 10^{-6}$  مولار،  $3 \times 10^{-7}$  مولار،  $3 \times 10^{-8}$  مولار،  $3 \times 10^{-9}$  مولار و  $3 \times 10^{-10}$  مولار معادل  $3 \times 10^{-4}$ ،  $3 \times 10^{-5}$ ،  $3 \times 10^{-6}$ ،  $3 \times 10^{-7}$ ،  $3 \times 10^{-8}$ ،  $3 \times 10^{-9}$ ،  $3 \times 10^{-10}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفتند.

در شکل ۲ (A و B) نتایج آزمایش سمیت و میزان زنده ماندن سلولی سلول‌های طحال (A) و رأس کلیه (B) ماهی شانک عربی (*Acanthopagrus arabicus*) تیمار شده با غلظت‌های مختلف دگزامتازون نشان داده شده است. با افزایش غلظت دگزامتازون، سمیت آن افزایش یافته و درصد

### سنجش فعالیت جزء کمپلمان جایگزین ACH50

میزان ACH50 با استفاده از روش همولیتیک ارائه شده از Tort و Oriol Sunyer (۱۹۹۵) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، ابتدا رقت‌های مختلف (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۱/۶۱۲ و ۰/۳۰۶ درصد) از سوسپانسیون‌های سلولی در بافر ژلاتین ورونال (حاوی باربیتال ۵ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۱۴۵ میلی‌مولار)، ژلاتین (۰/۱ درصد)، کلرید منیزیم هگزا هیدرات (۰/۵ میلی‌مولار)، اتیلن گلیکول تتراسدیک اسید (۱۰ میلی‌مولار) و آب) تهیه شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از هر رقت به هر چاهک در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی افزوده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز گوسفند (به عنوان سلول هدف) به هر چاهک اضافه شد. پس از دو ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، لیز سلولی با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول توقف (بافر PBS حاوی اتیلن دی آمین تتراسدیک اسید ۱۰ میلی‌مولار) متوقف شد. سوسپانسیون سلولی سپس با دور ۱۶۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به میکروپلیت‌های ۹۶ چاهی منتقل شد. در نهایت، تراکم نوری در طول موج ۴۱۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت واحد نانوگرم در هر میلی‌لیتر ارائه گردید.

### روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی اختلاف بین آنها و مقایسه در تیمارهای مختلف از روش تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه one-way ANOVA در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. در تمام بررسی‌ها، اختلاف در سطح اطمینان بالای ۹۵٪ ( $P < 0.05$ ) مورد پذیرش قرار گرفت.

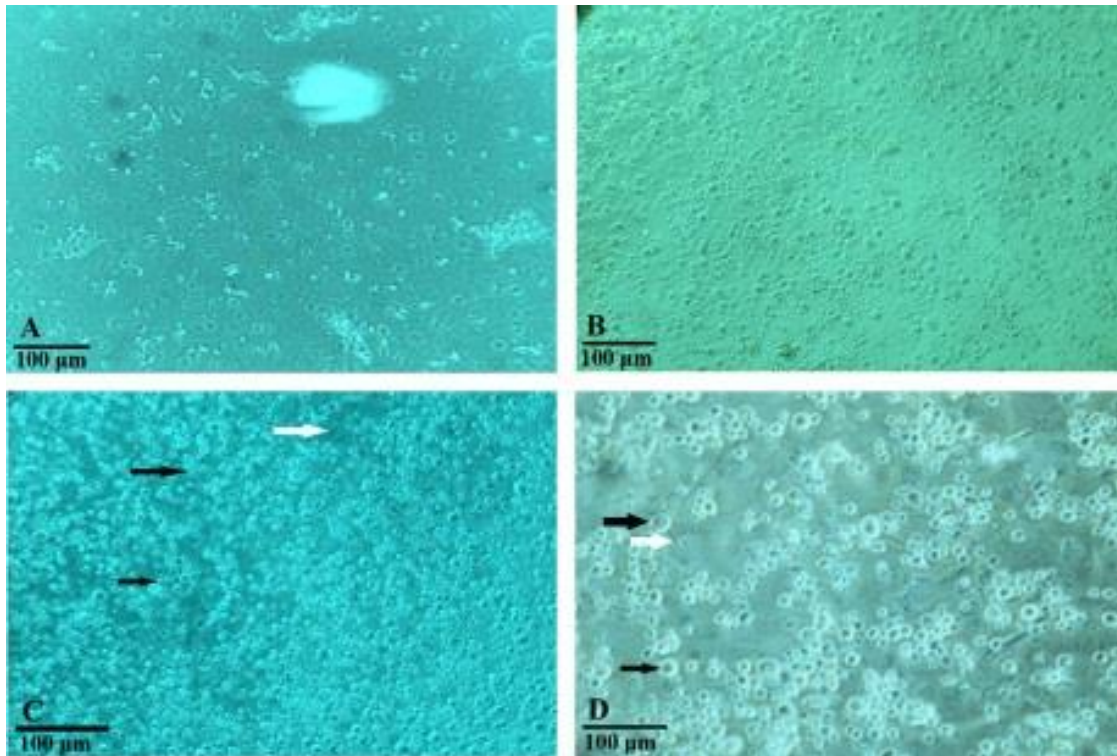
### نتایج

#### سنجش دگزامتازون در فاضلاب‌های بیمارستانی

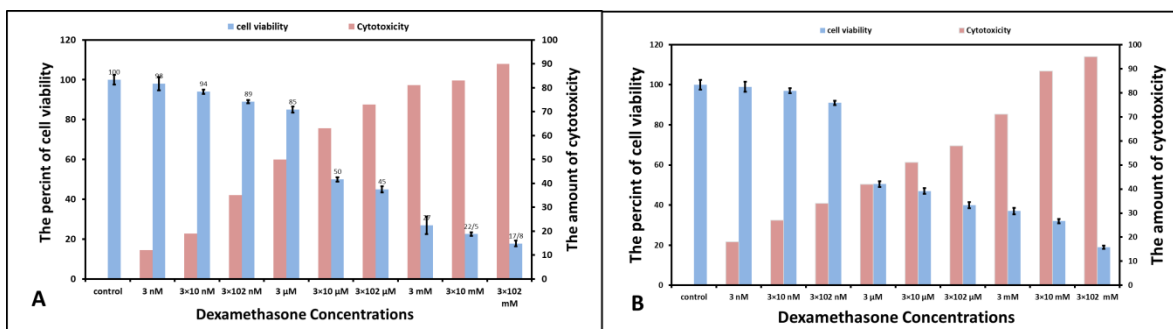
برای سنجش دگزامتازون در فاضلاب‌های بیمارستانی، از فاضلاب بیمارستان طالقانی آبادان نمونه‌برداری شده و پس از اسکن نمونه‌های دگزامتازون و مشخص شدن طول موج حداکثر جذب در طول موج ۲۱۳ نانومتر برای آن، غلظت

سلول‌های زنده هر دو بافت کاهش یافت. بر اساس نتایج آزمون MTT، غلظت‌های آزمایشی ۳،  $3 \times 10^{-1}$ ،  $3 \times 10^{-2}$ ،  $3 \times 10^{-3}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر برای رأس کلیه به منظور بررسی میزان سمیت سلولی و اثرات سرکوب کننده ایمنی دگزامتازون، تعیین شده و استفاده شد.

سلول‌های زنده هر دو بافت کاهش یافت. بر اساس نتایج آزمون MTT، غلظت‌های آزمایشی ۳،  $3 \times 10^{-1}$ ،  $3 \times 10^{-2}$ ،  $3 \times 10^{-3}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر برای طحال و غلظت‌های



شکل ۱: سلول‌های طحال (A) و رأس کلیه (B) ماهی شانگ عربی (*Acanthopagrus arabicus*) پیش از انکوباسیون. سلول‌های طحال (C) و رأس کلیه (D)، ۱۲ روز پس از انکوباسیون. سلول‌های زنده گرد (پیکان‌های سیاه)، سلول‌های فیبروبلاست (پیکان‌های سفید)  
 Figure 1: The preincubated spleen (A) and haed kidney (B) cells from *Acanthopagrus arabicus*. cultivated spleen (C) and haed kidney (D) cell after 12d of incubation. Round living cells (black arrows), fibroblast cells (white arrows)

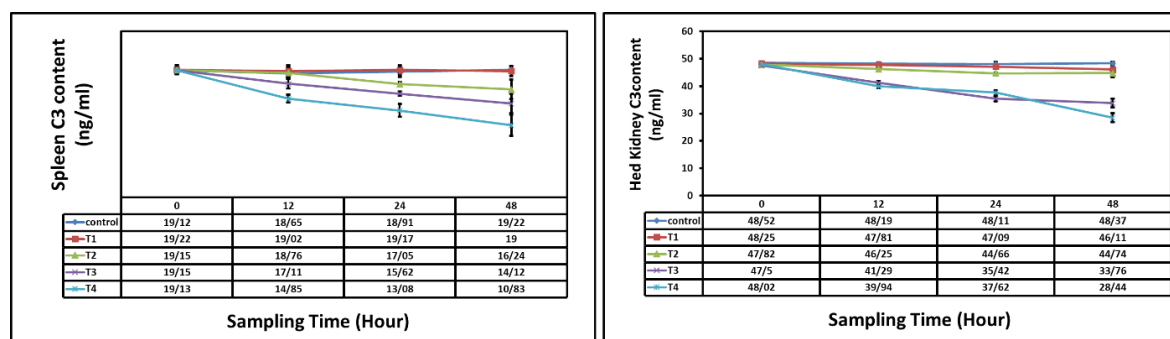


شکل ۲: میزان سمیت دگزامتازون و درصد زنده ماندن سلول‌های طحال (A) و رأس کلیه (B) ماهی شانگ عربی (*Acanthopagrus arabicus*) در معرض غلظت‌های مختلف دگزامتازون

Figure 2: The amount of dexamethasone toxicity and the percentage of viability of the spleen (A) and head kidney (B) cells from Arabian Sea bream *Acanthopagrus arabicus* exposed to dexamethasone

سلول‌های طحال شدند ( $P < 0.05$ ). کمترین مقدار C3 سلول‌های طحال به میزان ۴۴ درصد سطح C3 شاهد، در تیمار ۴ (با بیشترین غلظت دگزامتازون (۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر)) و پس از ۴۸ ساعت مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). همچنین غلظت‌های پایین‌تر دگزامتازون ( $3 \times 10^{-2}$  و  $3 \times 10^{-1}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) تأثیر قابل توجهی بر محتوای C3 سلول‌های رأس کلیه نداشت ( $P > 0.05$ ). اما غلظت‌های بالای دگزامتازون (۳ و  $3 \times 10$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) محتوای C3 سلول‌های رأس کلیه را به طور معنی‌داری کاهش داد ( $P < 0.05$ ). میزان C3 در سلول‌های رأس کلیه در مواجهه با دو غلظت بالای دگزامتازون (۳ و  $3 \times 10$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) در ۲۴ ساعت ابتدای آزمایش اختلاف معنی‌داری با هم نداشت ( $P > 0.05$ ), ولی پس از ۴۸ ساعت، سطح C3 در سلول‌های رأس کلیه در مواجهه با غلظت‌های ۳ و  $3 \times 10$  میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون به ترتیب به میزان ۳۱ و ۴۲ درصد سطح C3 شاهد کاهش یافت که در مقایسه با هم تفاوت معنی‌داری داشتند ( $P < 0.05$ ) (شکل ۳).

**سنجش سطح اجزای کمپلمان**  
**سطح C3 در سلول‌های کشت شده طحال و رأس کلیه**  
 در شکل ۳ اثرات دگزامتازون بر محتوای C3 سلول‌های طحال و رأس کلیه ماهی شانک عربی نشان داده شده است که در آن T1 بیانگر سلول‌های طحال و (رأس کلیه) تیمار شده با غلظت‌های  $3 \times 10^{-2}$  و  $3 \times 10^{-3}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون؛ T2 بیانگر سلول‌های طحال و (رأس کلیه) تیمار شده با غلظت‌های  $3 \times 10^{-1}$  و  $3 \times 10^{-2}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون؛ T3 بیانگر سلول‌های طحال و (رأس کلیه) تیمار شده با غلظت‌های  $3 \times 10^{-1}$  و  $3 \times 10^{-2}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون و T4 بیانگر سلول‌های طحال و (رأس کلیه) تیمار شده با غلظت‌های ۳ و  $3 \times 10$  میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون است. با توجه به شکل ۳، کمترین غلظت دگزامتازون ( $3 \times 10^{-3}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) تغییر معنی‌داری در محتوای سلول‌های طحال ایجاد نکرد ( $P > 0.05$ ). همچنین سایر غلظت‌های دگزامتازون به طور قابل توجهی منجر به کاهش سطح C3 در



شکل ۳: اثرات دگزامتازون بر محتوای C3 سلول‌های طحال و رأس کلیه ماهی شانک عربی (*Acanthopagrus arabicus*).

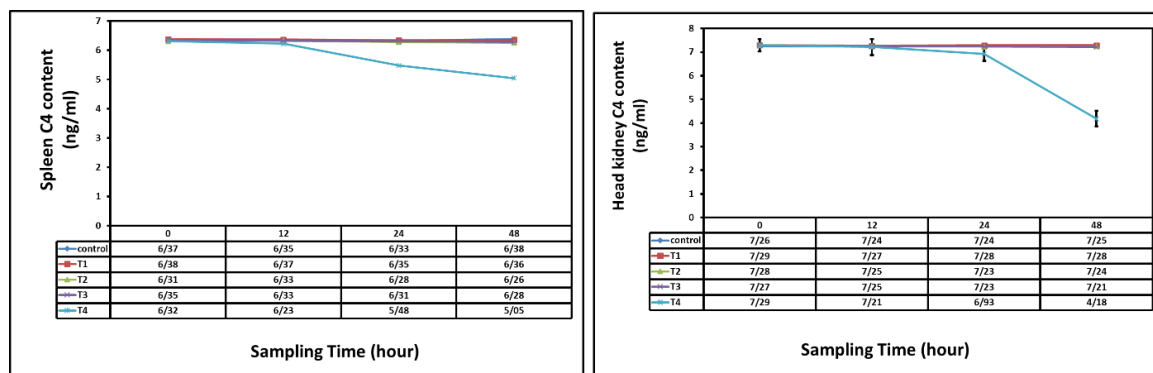
Figure 3: Effects of dexamethasone on the C3 content of spleen and head kidney from *Acanthopagrus arabicus*

(۳) میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون و T4 بیانگر سلول‌های طحال و (رأس کلیه) تیمار شده با غلظت‌های ۳ و  $3 \times 10$  میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون است. با توجه به شکل ۴، جزء C4 کمپلمان در سلول‌های طحال و رأس کلیه در مواجهه با تمام غلظت‌های دگزامتازون به جز بالاترین غلظت، تغییر معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نداشت ( $P > 0.05$ ). محتوای C4 در سلول‌های طحال پس از ۲۴ ساعت مواجهه با بالاترین غلظت دگزامتازون (۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به طور معنی‌داری کاهش یافت و به ۸۳ درصد

**سطح C4 در سلول‌های کشت شده طحال و رأس کلیه**  
 در شکل ۴ اثرات دگزامتازون بر محتوای C4 سلول‌های طحال و رأس کلیه ماهی شانک عربی نشان داده شده است که در آن T1 بیانگر سلول‌های طحال و (رأس کلیه) تیمار شده با غلظت‌های  $3 \times 10^{-2}$  و  $3 \times 10^{-3}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون؛ T2 بیانگر سلول‌های طحال و (رأس کلیه) تیمار شده با غلظت‌های  $3 \times 10^{-1}$  و  $3 \times 10^{-2}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون؛ T3 بیانگر سلول‌های طحال و (رأس کلیه) تیمار شده با غلظت‌های  $3 \times 10^{-1}$  و

بالاترین غلظت آزمایشی دگزامتازون ( $3 \times 10^{-1}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) پس از ۲۴ ساعت مواجهه آغاز شد و تا ساعت ۴۸ آزمایش به ۴۳ درصد سطح C4 شاهد رسید ( $P < 0.05$ ).

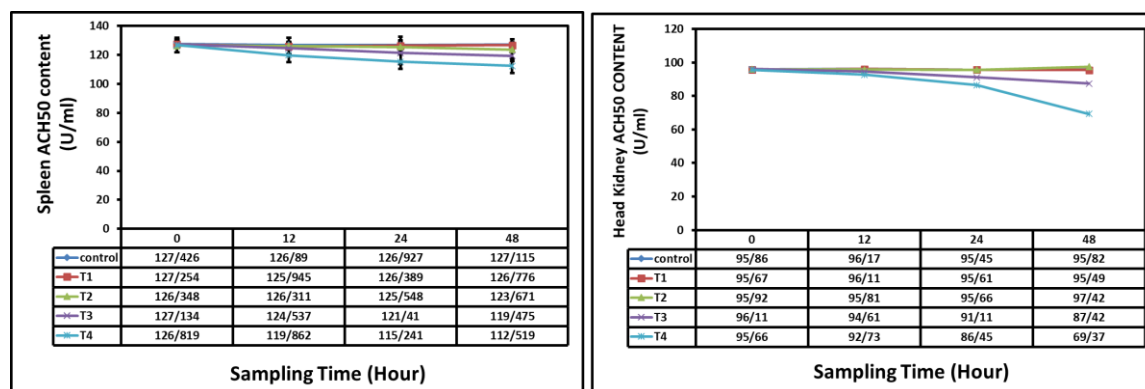
سطح C4 شاهد رسید ( $P < 0.05$ )، ولی پس از آن تا ساعت ۴۸ آزمایش تغییر معنی‌داری نداشت ( $P > 0.05$ ). کاهش محتوای C4 در سلول‌های رأس کلیه قرار گرفته در معرض



شکل ۴: اثرات دگزامتازون بر محتوای C4 سلول‌های طحال و رأس کلیه ماهی شانک عربی (*Acanthopagrus arabicus*)  
 Figure 4: Effects of dexamethasone on the C4 content of spleen and head kidney from *Acanthopagrus arabicus*

کلیه) تیمار شده با غلظت‌های  $3 \times 10^{-2}$  و  $3 \times 10^{-1}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون؛ T3 بیانگر سلول‌های طحال و (رأس کلیه) تیمار شده با غلظت‌های  $3 \times 10^{-1}$  و (۳) میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون و T4 بیانگر سلول‌های طحال و (رأس کلیه) تیمار شده با غلظت‌های ۳ و  $3 \times 10^{-1}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون است.

سنجش فعالیت جزء کمپلمان جایگزین ACH50 در شکل ۵ اثرات دگزامتازون بر محتوای ACH50 سلول‌های طحال و رأس کلیه ماهی شانک عربی نشان داده شده است که در آن T1 بیانگر سلول‌های طحال و (رأس کلیه) تیمار شده با غلظت‌های  $3 \times 10^{-3}$  و  $3 \times 10^{-2}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون؛ T2 بیانگر سلول‌های طحال و (رأس



شکل ۵: اثرات دگزامتازون بر فعالیت جزء کمپلمان جایگزین ACH50 سلول‌های طحال و رأس کلیه ماهی شانک عربی (*Acanthopagrus arabicus*)  
 Figure 5: Effects of dexamethasone on ACH50 content of spleen and head kidney from *Acanthopagrus arabicus*

(P کاهش معنی‌دار میزان ACH50 سلول‌های طحال در معرض ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون پس از ۲۴ ساعت از شروع آزمایش آغاز و تا انتهای دوره آزمایش

با توجه به شکل ۵، هیچ‌یک از غلظت‌های دگزامتازون به‌جز بالاترین غلظت، تغییر قابل‌توجهی در محتوای ACH50 سلول‌های طحال در طول دوره آزمایش ایجاد نکرد ( $P > 0.05$ )

گلوکوکور تیکوئیدهای آدرنال استفاده می‌شود (Burton and Kehrli, 1995). در تحقیق حاضر، از طیفی از غلظت‌های سرکوب‌کننده ایمنی (غلظت محیطی آن نیز در این محدوده بود)، برای القاء اثرات این دارو در ارگان‌سیم‌های غیرهدف استفاده شد. این مطالعه اولین مطالعه‌ای است که اثرات سرکوب‌کننده دگزامتازون را بر فعالیت اجزاء کمپلمان سلول‌های رأس کلیه و طحال ماهی شانک عربی در محیط کشت سلولی گزارش می‌نماید. دگزامتازون معمولاً به عنوان یک داروی سرکوب‌کننده سیستم ایمنی شناخته می‌شود که برای سلول‌های ایمنی سمی است و عملکرد سیستم ایمنی را مهار می‌کند (Ribas et al., 2016). Limbourg و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند، گلوکوکور تیکوئیدها به طور قابل توجهی رونویسی بسیاری از ژن‌های کدکننده سیتوکین‌ها را سرکوب می‌کنند که می‌تواند نقش مهمی در سرکوب سیستم ایمنی داشته باشد. گلوکوکور تیکوئیدها علاوه بر تأثیر عمیق بر عملکرد سلول‌های ایمنی، روند تمایز سلول‌های پیش‌ساز را نیز تغییر می‌دهند (McEwen et al., 1997). همچنین Qi و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که قرار گرفتن مزمن در معرض دگزامتازون منجر به افزایش وابسته به دوز حساسیت ماهی طلائی (Carassius auratus) به عوامل بیماری‌زا باکتریایی می‌شود. سلول‌های طحال و رأس کلیه ماهی از جمله مهم‌ترین سلول‌های ایمنی هستند که نقش کلیدی در شناسایی و فاگوسیتوز پاتوژن‌ها، پردازش و ارائه آنتی ژن‌ها، فعال کردن لنفوسیت‌ها و ترشح شاخص‌های ایمنی دارند (Nie, 1997). به همین دلیل، فعالیت این سلول‌ها می‌تواند به عنوان یک شاخص مهم برای ارزیابی قدرت ایمنی ماهی مورد استفاده قرار گیرد (Haaparanta et al., 1996).

سیستم کمپلمان با تسهیل عملکرد سلول‌های فاگوسیتوز کننده و لیز سلولی، نقش مهمی در ایمنی ذاتی و اکتسابی دارد. اجزاء این سیستم که به صورت آبشاری فعال شده است، با هدف قرار دادن اجزاء غشاء عوامل مهاجم، منجر به تخریب پاتوژن‌ها می‌شوند (Boshra et al., 2006). C3 جزء مهمی از سیستم کمپلمان است که تحریک آن سایر اجزاء را فعال می‌کند. این جزء متعلق به پروتئین‌های سلولی فاز حاد است و اولین جزء سیستم مکمل است که فعال

(ساعت ۴۸) ادامه داشت. قرار گرفتن سلول‌های طحال در معرض ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون منجر به کاهش ۱۱ درصدی میزان جزء کمپلمان جایگزین ACH50 پس از ۴۸ ساعت مواجهه شد ( $P < 0.05$ ). هرچند میان میزان ACH50 سلول‌های طحال در ساعات ۲۴ و ۴۸ تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ).

سطح ACH50 در سلول‌های رأس کلیه تیمار شده با غلظت‌های پایین دگزامتازون ( $3 \times 10^{-2}$  و  $3 \times 10^{-1}$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) در طول آزمایش تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداد ( $P > 0.05$ ). میزان این شاخص در سلول‌های رأس کلیه در مواجهه با غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر دگزامتازون نیز تا ساعت ۲۴ آزمایش تغییر معنی‌داری نداشت ( $P > 0.05$ ). اما میزان آن در انتهای دوره آزمایش (پس از ۴۸ ساعت) به میزان ۸ درصد کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). سطح ACH50 در سلول‌های رأس کلیه تیمار شده با بالاترین غلظت دگزامتازون ( $3 \times 10^0$  میکروگرم بر میلی‌لیتر) پس از ۲۴ ساعت از شروع آزمایش کاهش یافت و تا انتهای آزمایش به ۷۲ درصد سطح ACH50 شاهد رسید ( $P < 0.05$ ).

## بحث

آلاینده‌های دارویی که عمدتاً از طریق فاضلاب شهری، صنعتی و بیمارستانی وارد آنها می‌شوند، به عنوان آلاینده‌های نوظهور در محیط‌های آبی شناخته می‌شوند (Parolini et al., 2009). با این وجود، سطوح بالای آلودگی دارویی، مطالعات کمی برای ارزیابی خطرات زیست‌محیطی قرار گرفتن در معرض آلاینده‌های دارویی در آب انجام شده است. در دهه‌های اخیر، با توجه به مصرف گسترده طیف وسیعی از این ترکیبات و تخلیه آنها به فاضلاب در سراسر جهان، سرنوشت آنها در محیط‌های آبی به موضوع تحقیقاتی مهمی تبدیل شده است. سالانه صدها تا هزاران تن ترکیبات فعال دارویی مصرف شده که بخش بزرگی از آن در فاضلاب تخلیه می‌شود (Ryu et al., 2014).

دگزامتازون یک داروی گلوکوکور تیکوئید مصنوعی است که اغلب در پزشکی و دامپزشکی برای تقلید از اثرات

جمله سیتوکین‌ها را مهار می‌کنند. مطالعات آزمایشگاهی بر کشت اولیه سلولی رأس کلیه نشان داد، اثر کورتیکواستروئیدها بر شاخص‌های ایمنی عمدتاً سرکوب‌کننده است و این ترکیبات بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی که مسئول تشخیص آنتی‌ژن‌ها، فعالیت‌های ضد ویروسی و پاسخ‌های التهابی هستند، تعدیل می‌کنند (Cortes et al., 2013). Pagnello و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که هورمون‌های کورتیکواستروئیدی می‌توانند تکثیر ماکروفاژها را تعدیل کنند و به نظر می‌رسد، مهار سنتز سیتوکینین‌ها می‌تواند به این مسئله مرتبط باشد.

ثابت شده است که لیپوپلی ساکارید باکتریایی قادر به تحریک ایمنی ذاتی و افزایش سطح کمپلمان‌هاست. با این حال، Mathieu و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که لیپوپلی ساکارید قادر به القاء افزایش فعالیت کمپلمان‌ها یا بیان ژن‌های مرتبط با سنتز و فعالیت C3 در ماهیانی که به طور همزمان لیپوپلی ساکارید و کورتیکواستروئید (۱۱-دئوکسی کورتیکوسترون) دریافت کرده بودند، نبود. آنها پیشنهاد کردند که کورتیکواستروئیدها می‌توانند بیان mRNA C3 را کنترل کنند (Mathieu et al., 2014).

در مطالعه Zach و همکاران (۱۹۹۳) کورتیکواستروئیدها می‌توانند سطح بیان ژن‌های مرتبط با سنتز و فعالیت C3 را از طریق گیرنده گلوکوکورتیکوئید (GR) و مینرالوکورتیکوئید (MR) سرکوب کنند. بیشتر ماهیان استخوانی دارای سه گیرنده کورتیکواستروئیدی شامل دو گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی (GR1 و GR2) و یک گیرنده مینرالوکورتیکوئیدی (MR) هستند که به وسیله سه ژن مختلف کدگذاری می‌شوند (Zach et al., 1993). این امر می‌تواند توضیح دهنده کاهش سطوح کمپلمان‌ها تحت تأثیر دگزامتازون (کورتیکوستروئید) در مطالعه حاضر باشد.

در مطالعه حاضر، دگزامتازون بر فعالیت جزء کمپلمان جایگزین (ACH50) سلول‌های طحال و رأس کلیه تأثیری نداشت و تنها بالاترین غلظت آن باعث کاهش سطوح ACH50 پس از ۴۸ ساعت شد. Milla و همکاران (۲۰۱۸) هیچ تغییری در بیان ژن، کمیت پروتئین یا فعالیت پروتئین‌های مرتبط با ایمنی ذاتی (مانند سطح ACH50) تا دو هفته پس از قرارگرفتن ماهی سوف اوراسیا (Perca

می‌شود (Bayne et al., 2001). در مطالعه حاضر، دگزامتازون منجر به کاهش قابل توجهی در سطح C3 در سلول‌های طحال و رأس کلیه شد. از سوی دیگر، سطح C4 در سلول‌های طحال و رأس کلیه تنها با بالاترین غلظت دگزامتازون سرکوب شد. Whaley و Lappin (۱۹۹۱) بیان کردند که گلوکوکورتیکوئیدها با سرکوب رونویسی ژن‌های مرتبط با فعال سازی کمپلمان‌ها، بر سنتز C3 در پستانداران تأثیر منفی می‌گذارند و در نتیجه از فعال شدن سایر اجزاء سیستم کمپلمان نیز جلوگیری می‌کنند. Zanuzzo و همکاران (۲۰۱۹) به مدت یک هفته ماهی پوکا (*Piaractus mesopotamicus*) را با رژیم غذایی حاوی دگزامتازون (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) یا هیدروکورتیزون (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تغذیه کردند. تغذیه ماهیان با رژیم غذایی حاوی هر دو کورتیکواستروئید منجر به کاهش فعالیت سیستم کمپلمان و غلظت لیزوزیم سرم شد ماهیان شد. Howe و همکاران (۱۹۹۰) گزارش کردند که تجویز ۰/۵ میلی‌گرم دگزامتازون هیچ تأثیری بر ترشح C3 در موش‌های تحت درمان با استرادیول، به صورت استفاده تنها یا همراه با استرادیول نداشت. Bigsby (۱۹۹۳) نیز گزارش داد که دگزامتازون، تولید اجزاء کمپلمان که در نتیجه تجویز استرادیول فعال شده بودند، مهار می‌کند. گزارش‌های متعددی مبنی بر سرکوب فعال شدن یا تولید اجزاء کمپلمان تحت تأثیر کورتیکواستروئیدها وجود دارد.

در مطالعه Cortes و همکاران (۲۰۱۳) کاشت آهسته‌رهش کورتیزول در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به طور قابل توجهی بیان ژن مرتبط با تولید یا فعالیت جزء مکمل C3 را از روز اول آزمایش کاهش داد. در این مطالعه، کورتیکواستروئیدها (کورتیزول) قادر به تأثیر بر بیان ژن‌های مرتبط با مسیر کمپلمان بودند. این قابلیت کورتیکوستروئیدها می‌تواند حساسیت بالاتر به عوامل بیماری‌زا را در ماهی‌های تحت درمان با کورتیکواستروئیدها توضیح دهد، زیرا فعالیت سیستم کمپلمان تحت تأثیر این ترکیبات سرکوب می‌شود. در مطالعه Cortes و همکاران (۲۰۱۳) کورتیزول بیان لیزوزیم و شاخص‌های مکمل (کمپلمان‌ها) را در کبد تنظیم می‌کند. گلوکوکورتیکوئیدها اثرات ضد التهابی قدرتمندی دارند و واسطه‌های التهابی از

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های معنوی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر تشکر و قدردانی می‌نمایند. این پژوهش مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی آبادان با شناسه IR.ABADANUMS.REC.1402.021 قرار گرفت.

### منابع

- Ahmadi, K., Mirvaghefi, A.R., Banaee, M. and Vosoghei, A.R., 2014. Effects of long-term diazinon exposure on some immunological and haematological parameters in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 6(1):1-7. DOI: 10.1007/s13530-014-0181-1
- Anumol, T., Merel, S., Clarke, B. and Snyder, S., 2013. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for rapid analysis of trace organic contaminants in water. *Chemistry Central Journal*, 7:1-14. DOI:10.1186/1752-153X-7-104
- Bayne, C.J., Gerwick, L., Fujikia, K., Nakaoa, M. and Yano, T., 2001. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Developmental & Comparative Immunology*, 25:205-217. DOI:10.1016/S0145-305X(00)00057-4
- Bigby, R.M., 1993. Progesterone and dexamethasone inhibition of estrogen-induced synthesis of DNA and complement in rat uterine epithelium: effects of anti-progesterone compounds. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 45(4):295-301. DOI:10.1016/0960-0760(93)90345-w

*fluviatilis* در معرض ۱۱- دئوکسی کورتیکوسترون (کورتیکواستروئید) مشاهده نکردند درحالی که پس از دو هفته، افزایش قابل توجهی در سطح ACH50 طحال مشاهده شد. آنها اظهار داشتند، به نظر می‌رسد که مواجهه حاد با کورتیکواستروئیدها (به عنوان سرکوب کننده‌های سیستم ایمنی)، تأثیر قابل توجهی بر برخی از پروتئین‌های ایمنی ذاتی ندارد (Milla et al., 2018).

Carrizo و همکاران (۲۰۲۱) اثرات کورتیزول اگزوزن بر پاسخ شبه ایمنی سلول‌های ماهیچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه با باکتری *Piscirickettsia salmonis* را ارزیابی کردند. آنها گزارش کردند که در ماهیانی که پیش از مواجهه با باکتری *P. salmonis* کورتیزول دریافت کرده بودند، برخی از شاخص‌های ایمنی (ACH50) و فعالیت لیزوزیم به دنبال مواجهه با *P. salmonis* افزایش نیافت. این محققین تأیید کردند که کورتیزول اجازه افزایش برخی شاخص‌های ایمنی در مواجهه با پاتوژن‌ها را نمی‌دهد (Carrizo et al., 2021). Teles و همکاران (۲۰۱۳) اثر کورتیکواستروئیدهای اگزوزن را بر برخی از پاسخ‌های ایمنی ذاتی (فعالیت‌های لیزوزیم و مکمل (ACH50) و سطوح mRNA آنها ارزیابی نمودند. آنها گزارش دادند که افزایش سطح کورتیکواستروئید در ابتدای آزمایش، تغییر قابل توجهی در میزان این شاخص‌های ایمنی ایجاد نکرد درحالی که پس از دوازده روز قرارگرفتن در معرض کورتیکواستروئید، فعالیت لیزوزیم و ACH50 و سطح mRNA آنها به طور قابل توجهی کاهش یافت. بنابراین، این نتایج همچنین تأیید می‌کند که قرار گرفتن طولانی‌مدت در معرض کورتیکواستروئیدها می‌تواند بیان ژن‌های مرتبط با عوامل لیزوزیم و کمپلمان‌ها را کنترل نماید (Teles et al., 2013).

در مجموع، نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که دگزامتازون اثرات عمده‌ای بر سیستم کمپلمان ماهی شانک عربی (*A.arabicus*) دارد. شاخص‌های ایمنی مورد مطالعه در سلول‌های طحال و رأس کلیه تیمار شده با دگزامتازون نسبت به سلول‌های شاهد کاهش یافتند.

- Bjelaković, G., Beninati, S., Pavlović, D., Kocić, G., Jevtović, T., Kamenov, B., Saranac, L.J., Bjelaković, B., Stojanović, I. and Basić, J., 2007.** Glucocorticoids and oxidative stress. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 18(2):115-128.  
DOI:10.1515/jbcpp.2007.18.2.115
- Boshra, H., Li, J. and Sunyer, J.O., 2006.** Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 20:239–262.  
DOI:10.1016/j.fsi.2005.04.004
- Brank, M., Zajc-Kreft, K., Kreft, S., Komel, R. and Grubič, Z., 1998.** Biogenesis of acetylcholinesterase is impaired, although its mRNA level remains normal, in the glucocorticoid-treated rat skeletal muscle. *European Journal of Biochemistry*, 251:374–381. DOI:10.1046/J.1432-1327.1998.2510374. X
- Burton, J.L. and Kehrli, M.E., 1995.** Regulation of neutrophil adhesion molecules and shedding of *Staphylococcus aureus* in milk of cortisol- and dexamethasone-treated cows. *American Journal of Veterinary Research*, 56:997-1006.  
DOI:10.2460/ajvr.1995.56.08.997
- Carrizo, C., Valenzuela, C.A., Zuloaga, R., Aros, C., Altamirano, C., Valdés, J.A. and Molina, A., 2021.** Effect of cortisol on the immune-like response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myotubes challenged with *Piscirickettsia salmonis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 237:110-240.  
DOI:10.1016/j.vetimm.2021.110240
- Chen, Q., Jia, A., Snyder, S.A., Gong, Z. and Lam, S.H., 2016.** Glucocorticoid Activity Detected by In Vivo Zebrafish Assay and In Vitro Glucocorticoid Receptor Bioassay at Environmental Relevant Concentrations. *Chemosphere*, 144:1162–1169.  
DOI:10.1016/j.chemosphere.2015.09.089
- Cortés, R., Teles, M., Trídico, R., Acerete, L. and Tort, L., 2013.** Effects of cortisol administered through slow-release implants on innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Genomics*, 2013:619-714.  
DOI:10.1155/2013/619714
- Coutinho, A.E. and Chapman, K.E., 2011.** The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335(1):2–13.  
DOI:10.1016/j.mce.2010.04.005
- Ellis, A.E., 1999.** Immunity to bacteria in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 9: 291-308.  
DOI:10.1006/fsim.1998.0192
- Guiloski, I.C., Ribas, J.L., Pereira, L.S., Neves, A.P. and de Assis, H.C., 2015.** Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114:204-211.  
DOI:10.1016/j.ecoenv.2014.11.020
- Haaparanta, A., Valtonen, E.T., Hoffmann, R. and Holmes, J., 1996.** Do macrophage centers in freshwater fishes reflect the differences in water quality? *Aquatic Toxicology*, 34:253-272. DOI:10.1016/0166-445X(95)00042-3
- Herrero, P., Borrull, F., Marcé, R. and Pocurull, E., 2013.** Pressurised liquid extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine endogenous and synthetic glucocorticoids in sewage sludge. *Talanta*, 103:186–193.  
DOI:10.1016/j.talanta.2012.10.030

- Holland, M.C.H. and Lambris, J.D., 2002.** The complement system in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*, 12:399-420. DOI:10.1006/fsim.2001.0408
- Howe, R.S., Lee, Y.H., Fischkoff, S.A., Teuscher, C. and Lyttle, C.R., 1990.** Glucocorticoid and progestin regulation of eosinophil chemotactic factor and complement C3 in the estrogen-treated rat uterus. *Endocrinology*, 126:3193-3199. DOI:10.1210/endo-126-6-3193
- Huang, X., Huang, Y., Sun, J., Han, X. and Qin, Q., 2009.** Characterization of two grouper *Epinephelus akaara* cell lines: Application to studies of Singapore grouper iridovirus (SGIV) propagation and virus-host interaction. *Aquaculture*, 292:172-179. DOI:10.1016/j.aquaculture.2009.04.019
- Jerez-Cepa, I., Gorissen, M., Mancera, J.M. and Ruiz-Jarabo, I., 2019.** What Can We Learn from Glucocorticoid Administration in Fish? Effects of Cortisol and Dexamethasone on Intermediary Metabolism of Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology- Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 231:1-10. DOI:10.1016/J.cbpa.2019.01.010
- Kemnitzer, W., Drewe, J., Jiang, S., Zhang, H., Zhao, J. and Crogan-Grundy, C., 2007.** Discovery of 4-Aryl-4 H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase- based high- throughput screening assay. 3. structure- activity relationships of fused rings at the 7. 8- positions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(12):2858-2864. DOI:10.1016/j.bmcl.2005.07.066
- Kumar, R., Joy, K.P. and Singh, S.M., 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. DOI:10.1007/s10695-016-0218-2
- Lappin, D.F. and Whaley, K., 1991.** Modulation of complement gene expression by glucocorticoids. *Biochemical Journal*, 280:117-123. DOI:10.1042/bj2800117
- Li, X., Liu, L., Zhang, Y., fang, Q., Li, Y. and Li, Y., 2013.** Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Chemosphere*, 93(2):428-433. DOI:10.1016/j.chemosphere.2013.05.023
- Limbourg, F.P., Huang Z., Plumier, J.C., Simoncini, T., Fujioka, M., Tuckermann, J., Schutz, G., Moskowitz, M.A. and Liao, J.K., 2002.** Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. *The Journal of Clinical Investigation*, 110:1729-1738. DOI:10.1172/JCI15481
- Løvoll, M., Johnsen, H., Boshra, H., Bøgwald, J., Sunyer, J.O. and Dalmo, R.A., 2007.** The ontogeny and extrahepatic expression of complement factor C3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish and Shellfish Immunology*, 23:542-552. DOI:10.1016/j.fsi.2007.01.002
- Mathieu, C., Milla, S., Mandiki, S.N.M., Douxfils, J. and Kestemont, P., 2014.** *In vivo* response of some immune and endocrine variables to LPS in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) and modulation of this response by two corticosteroids, cortisol and 11-deoxycorticosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part A:*

- Molecular & Integrative Physiology*, 167:25–34. DOI:10.1016/j.cbpa.2013.09.006
- McEwen, B.S., Biron, C.A., Brunson, K.W., Bulloch, K., Chambers, W.H., Dhabhar, F.S., Goldfarb, R.H., Kitson, R.P., Miller, A.H., Spencer, R.L. and Weiss, J.M., 1997.** The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Research Reviews*, 23:79-133. DOI:10.1016/s0165-0173(96)00012-4.
- Milla, S., Wang, N., Mandiki, S.N.M. and Kestemont, P., 2009.** Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology- Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153:242–251. DOI:10.1016/j.cbpa.2009.02.027
- Milla, S., Massart, S., Mathieu, C., Wang, N., Douny, C., Douxfils, J., Scippo, M., De Pauw, E., Dieu, M., Silvestre, F. and Kestemont, P., 2018.** Physiological and proteomic responses to corticosteroid treatments in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*: Investigation of immune-related parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part D: Genomics and Proteomics*, 25:86-98. DOI:10.1016/j.cbd.2017.11.005
- Momeni, H.R., Soliemani Mehranjani, M., Abnosi, M.H. and Nasimi, P., 2010.** Evaluation of viability in adult mouse spinal cord slices by MTT. *Iranian Journal of Biology*, 23(2): 267-274. (In Persian)
- Nie, P., 1997.** Recent advances of non-specific immunity in fish. *Journal of Fishery sciences of China*, 3:69-73.
- Oriol Sunyer, J. and Tort, L., 1995.** Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 45:333-345. DOI:10.1016/0165-2427(94)05430-Z
- Pagniello, K.B., Bols, NC. and Lee, L.E., 2002.** Effect of corticosteroids on viability and proliferation of the rainbow trout monocyte/macrophage cell line, RTS11. *Fish & Shellfish Immunology*, 13:199–214. DOI:10.1006/fsim.2001.0395
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Riva, C. and Provini, A., 2009.** An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicology In Vitro*, 23:935–942. DOI:10.1016/j.tiv.2009.04.014
- Pushpa, K., Gireesh-Babu, P., Rajendran, K.V., Purushothaman, C.S., Dasgupta, S. and Makesh, M., 2014.** Molecular cloning, sequencing and tissue-level expression of complement C3 of *Labeo Rohita* (Hamilton, 1822). *Fish and Shellfish Immunology*, 40(1):319-330. DOI:10.1016/j.fsi.2014.07.008
- Qi, X., Li, D., Tu, X., Song, Ch., Ling, F. and Wang, G., 2016.** Preliminary study on the relationship between dexamethasone and pathogen susceptibility on crucian carp (*Carassius auratus*). *Fish & Shell fish Immunology*, 59: 18-24. DOI:10.1016/j.fsi.2016.10.017
- Ribas, J., Zampronio, A.R. and de Assis, H., 2016.** Effects of trophic exposure to diclofenac and dexamethasone on hematological parameters and immune response in freshwater fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4):975-982. DOI:10.1002/etc.3240
- Ribera, J.M., Nipkow, M., Viergutz, T., Brunner, R.M., Bochert, R., Koll, R., Goldammer, T., Gimsa, U. and Rebl, A., 2020.** Early response of salmonid head-

- kidney cells to stress hormones and toll-like receptor ligands. *Fish & Shellfish Immunology*, 98:950–961. DOI:10.1016/j.fsi.2019.11.058
- Ryu, J., Oh, J., Snyder, S. and Yoon, Y., 2014.** Determination of micropollutants in combined sewer overflows and their removal in a wastewater treatment plant (Seoul, South Korea). *Environmental Monitoring and Assessment*, 186:3239–3251. DOI:10.1007/s10661-013-3613-5
- Sanders, J.M., Monogue, M.L., Jodlowski, T.Z. and Cutrell, J.B., 2020.** Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A review. *Jama*, 323:1824–1836. DOI:10.1001/jama.2020.6019
- Serezli, R., Basaran, F., Gungor Muhtaroglu, C. and Kaymakci Basaran, A., 2012.** Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). *Journal of Applied Ichthyology*, 28:87–90. DOI:10.1111/J.1439-0426.2011.01771.x
- Teles, M., Trídico, R., Cortés, R., Acerete, L., Callol, A., Fierro-Castro, C. and Tort, L., 2013.** Effects of cortisol on innate immune responses and on mRNA levels of corticosteroid receptors in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(6):17–41. DOI:10.1016/j.fsi.2013.03.324
- 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. DOI:10.1016/J.aquaculture.2008.03.020
- Whyte, S.K., 2007.** The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*, 23:1127–1151. DOI:10.1016/j.fsi.2007.06.00
- Zach, T.L., Herrman, V.A., Hill, L.D. and Leuschen, M.P., 1993.** Effect of steroids on the synthesis of complement C3 in a human alveolar epithelial cell line. *Experimental Lung Research*, 19:603–616. DOI:10.3109/01902149309031731
- Zanuzzo, F.S., Sabioni, R.E., Marzocchi-Machado, C.M. and Urbinati, E.C., 2019.** Modulation of stress and innate immune response by corticosteroids in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology- Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 231:39–48. DOI:10.1016/j.cbpa.2019.01.019
- Zilva, J.F.P. and Pannall, P.R., 1984.** Clinical chemistry in diagnosis and treatment, Distributed by Year Book Medical Publishers (Chicago).

## Activity of complements in the primary culture of spleen and head kidney cells of Arabian yellow fin sea bream (*Acanthopagrus arabicus*) exposed to dexamethasone

Nozhat F.<sup>1</sup>; Salari Ali Abadi M.A.<sup>1\*</sup>; Salamat N.<sup>1</sup>; Mojiri Forushani H.<sup>2</sup>; Morovvati H.<sup>3</sup>

\*salari@kmsu.ac.ir

1-Department of marine biology, Faculty of marine science, Khorramshahr University of marine science and technology, Khorramshahr, Iran

2-Department of Pharmacology, School of Medicine, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran

3-Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran

### Introduction

Emerging anthropogenic pollutants in wastewater treatment plant (WWTP) effluents have been shown to pose a particular risk to aquatics and potentially affect the aquatic environment from the molecular to the ecosystem level (Santos *et al.*, 2010). Micropollutants are emerging pollutants that include pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). Due to the widespread consumption of a wide range of micropollutants and their discharge into wastewater worldwide, their occurrence and fate in aquatic environments has become a research topic in recent decades (Ryu *et al.*, 2014). The common wastewater treatment process is not able to completely remove these compounds from the wastewater, and as a result, a significant amount of these compounds enters the aquatic water environment (Rehman *et al.*, 2015). Dexamethasone is a potent synthetic glucocorticoid with anti-inflammatory and immunosuppressive effects that is used to treat many diseases including allergies, asthma, covid-19, rheumatic problems, and skin diseases (Sanders *et al.*, 2020). Today, the increasing use of dexamethasone from sources such as hospitals is a global concern. High levels of this drug, which is a cortisone derivative, have been detected in wastewater (Herrero *et al.*, 2013). As one of the important components of the innate immune system in ectothermic vertebrates, including fishes, the complement system has been less studied. Evaluation of serum complement activity is considered as a valuable tool to diagnose the health status of fish. Complement in the non-specific immune response to a compound can have a direct effect such as killing the pathogen by lysing it (Ellis, 1999).

### Methodology

Fifteen mature Arabian sea bream, *A. arabicus* were collected from the Bahrakan Port in Abadan. Fish were transported to the 300 L tanks. After seven days of adaptation, the fish were anesthetized using 2-phenoxy ethanol (0.35 ml/L). Then, the fish were dissected under aseptic conditions and their spleens and kidney heads were separated (Wen *et al.*, 2008). The separated tissues were immediately washed three times with 100 ml antibiotic medium (Leibovitz's L-15 (L-15) with 400 IU/ml penicillin, 400 µg/ml streptomycin and 200 µg/ml amphotericin B) each time for 30 minutes. The spleen cell culture was performed according to Huang *et al.* (2009). The head kidney cell culture followed the protocols described

by Ribera *et al.* (2020). Dexamethasone cytotoxicity was assessed by MTT method according to Momeni *et al.* (2010). Cultivated spleen and head kidney cells were plated in 24-well microplates ( $10^5$  cells / ml L-15 medium / well) and incubated at 28°C for 24h. The cell viability was assessed using trypan blue exclusion test. Then, 200  $\mu$ L of fresh L-15 culture medium with different experimental concentrations of dexamethasone was added to each well and microplates were then incubated at 28°C for 48 h. Each treatment runs in five replicates. For this purpose, the cell suspensions were collected at 0, 12, 24 and 48 hours of experiment and transferred to microtubes for further analysis. The level of C3 and C4 was measured using immunoturbidimetry method by a double-antibody sandwich ELISA kits. ACH50 was measured by hemolytic method according to Sunyer and Tort (1995).

### Results

**Measurement of dexamethasone in hospital wastewater:** To measure dexamethasone in hospital wastewater, samples were taken from the wastewater of Taleghani Hospital in Abadan, and after scanning the dexamethasone samples and determining the maximum absorption wavelength at 213 nm for it, the concentration of dexamethasone was measured using an HPLC device. The obtained concentration was 86 ng/l. **Primary culture of head kidney and spleen cells:** Using the trypan blue test, the survival rate of spleen and head kidney cells was determined to be 95%. Then, cells derived from the spleen and head kidney were incubated in L-15 culture medium for two weeks at 28°C. After 48 hours, cells started to grow and colony formation started 5 days after incubation. The cells grew well and completely occupied the culture dish within 12 days. All the time, the cells were floating in the culture medium as round cells and did not stick to the bottom of the culture container. The trypan blue test showed that more than 90% of the cells were alive and healthy during the test. Twelve days after incubation, the cells were passaged. The second passage was performed fifteen days after incubation and then the cells were used for cytotoxicity assay. The C3 contents notably decreased in spleen cells exposed to all concentrations of dexamethasone except for the lowest concentration (3  $\mu$ M;  $P < 0.05$ ). In the head kidney, the C3 contents only notably decreased in cells treated with the higher concentrations of dexamethasone ( $3 \times 10$  and  $3 \times 10^2$   $\mu$ M;  $P < 0.05$ ). The complement C4 has no obvious change following exposure of spleen and head kidney cells to all concentrations of dexamethasone except for the highest concentration. The C4 content of spleen and head kidney cells significantly decreased after 24 h exposure to highest concentration of dexamethasone ( $P < 0.05$ ). The concentrations of dexamethasone (except the highest concentration of dexamethasone) caused a significant change in the ACH50 content of spleen cells compared to the controls ( $P > 0.05$ ). The exposure of spleen cells to 3 mM dexamethasone led to an 11% decrease in alternative complement activity after 48 hours of exposure ( $P < 0.05$ ). ACH50 activity in head kidney cells treated with  $3 \times 10^2$  nM and 3  $\mu$ M of dexamethasone showed no difference compared to control ( $P > 0.05$ ). A significant decrease in ACH50 was observed after exposure of head kidney cells to  $3 \times 10$  and  $3 \times 10^2$   $\mu$ M of dexamethasone ( $P < 0.05$ ). The amount of ACH50 activity in head kidney cells treated with 3 mM dexamethasone decreased by 27% after 48 hours of exposure ( $P < 0.05$ ).

### Discussion and Conclusion

This study is the first study that reports the suppressive effects of dexamethasone on the activity of complement components of head kidney cells and spleen of Arabian yellow fin sea bream (*Acanthopagrus arabicus*) in cell culture medium. Dexamethasone is commonly known as an immunosuppressant drug that is toxic to immune cells and inhibits the function of the immune system (Ribas *et al.*, 2016). The

complement system plays an important role in innate and acquired immunity by facilitating the function of phagocytizing cells and cell lysis. The components of this system, which are activated in a cascade manner, lead to the destruction of pathogens by targeting the membrane components of invading agents (Boshra *et al.*, 2006). C3 is an important component of the complement system, whose stimulation activates other components. This component belongs to the acute phase cellular proteins and is the first component of the complement system to be activated (Bayne *et al.*, 2001). In the present study, dexamethasone led to a significant decrease in C3 levels in spleen and head kidney cells. On the other hand, the level of C4 in spleen and head kidney cells was suppressed only by the highest concentration of dexamethasone. In the study of Zach *et al.* (1993), corticosteroids can suppress the expression level of genes related to the synthesis and activity of C3 through the glucocorticoid (GR) and mineralocorticoid (MR) receptors. Most Osteichthyes have three corticosteroid receptors, including two glucocorticoid receptors (GR1 and GR2) and one mineralocorticoid receptor (MR), which are encoded by three different genes (Zach *et al.*, 1993). This can explain the decrease in complement levels under the influence of dexamethasone (corticosteroid) in the present study. In the present study, dexamethasone did not affect the activity of alternative complement component (ACH50) of spleen and head kidney cells, and only its highest concentration decreased ACH50 levels after 48 hours. Milla *et al.* (2018) did not observe any changes in gene expression, protein quantity or activity of proteins related to innate immunity (such as ACH50 level) up to two weeks after exposure of *Perca fluviatilis* to 11-deoxycorticosterone (corticosteroid). While after two weeks, a significant increase in the ACH50 level of the spleen was observed. They stated that acute exposure to corticosteroids (as immunosuppressants) does not seem to have a significant effect on some innate immune proteins (Milla *et al.*, 2018).

#### **Acknowledgment**

This work was supported by the Khorramshahr University of Marine Science and Technology.

---

\*Corresponding author