

تغییرات کورتیزول و آنزیم‌های بیوشیمیایی در سلول‌های کبد تاسماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) تحت استرس دمایی در حضور القاکننده‌های HSP

سودا زارعی^۱، حسین غفوری^{۱*}، لیلا وحدتی‌راد^۱، تورج سهرابی^۳ و بهروز حیدری^۱



^۱ ایران، رشت، دانشگاه گیلان، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، رشت، دانشگاه گیلان، پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، گروه علوم دریایی

^۳ ایران، تهران، سازمان آموزش و تحقیقات کشاورزی (AREEO)، مؤسسه تحقیقاتی علوم شیلاتی کشور، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان

خاویاری

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷

چکیده

کورتیزول یکی از مهمترین عوامل موثر در کنترل استرس است. از طرفی، مکانیسم شناخته‌شده دیگری که از سلول‌ها در برابر استرس‌های گوناگون حفاظت می‌کند و با کورتیزول مرتبط می‌باشد، پاسخ به شوک حرارتی است که منجر به القاء سنتز پروتئین‌های شوک حرارتی یا HSP می‌شود. با تقویت سیستم دفاعی ماهیان خاویاری در برابر استرس‌های محیطی مانند تنش دمایی، می‌توان ذخایر آن‌ها را حفظ کرد. در این مطالعه، سلول‌های بافت کبد ماهی خاویاری استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) استخراج و در فلاسک کشت داده شد. از نوپال اندورانس (Pro-Tex[®])، آمیگدالین و مشتق پیرازولی (SZ) بعنوان القاکننده‌های HSP (HSPi) استفاده شد. جهت زیست‌پذیری و تعیین دوز بهینه تست MTT (۳-۴،۵-دی متیل تیازول-۲-یل)-۲،۵-دی فنیل تترازولیوم بروماید) صورت گرفت. فعالیت کورتیزول و آنزیم‌های بیوشیمیایی در سلول‌های کبد تحت تنش دمایی (۱۸، ۲۲ و ۲۶ °C) در حضور و عدم حضور ترکیبات HSPi آنالیز شد. سنجش MTT نشان داد سلول‌هایی که ترکیبات HSPi دریافت نمودند، موجب افزایش بقاء شدند. آن‌ها توانستند کورتیزول را بطور خاص بصورت جداگانه یا در ترکیب با استرس افزایش دهند. آمیگدالین فعالیت آنزیم‌های بیوشیمیایی را کاهش داد. فرار از آپوپتوز در شرایط استرس یک استراتژی اساسی برای بقای سلول می‌باشد. با توجه به نقش کورتیزول و ارتباط آن با HSP در شرایط استرس محیطی، می‌توان نتیجه گرفت که تیمار سلول‌ها با ترکیبات HSPi می‌تواند سلول‌ها را در برابر استرس مقاوم کرده و اثرات مضر ناشی از استرس را معکوس کند و در نهایت باعث افزایش بقاء شود.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، آمیگدالین، استرس سلولی، پروتئین شوک حرارتی، ماهی خاویاری

* نویسندگان مسئول، پست الکترونیکی: H.ghafoori@guilan.ac.ir و Bheidari@guilan.ac.ir

مقدمه

چالش‌های تغییرات آب و هوایی آسیب‌پذیر بوده است. در واقع، انزوای طبیعی دریای خزر شرایط گرمایش جهانی آن را منحصر به فرد می‌کند (۴۹). از سال ۱۹۸۲ تا ۲۰۱۹ میلادی دمای سطحی آب دریای خزر در ایران بین ۵°C تا ۸°C افزایش یافته است (۳۲ و ۵۰).

گرمایش جهانی و تغییرات آب و هوایی یکی از مشکلات زیست‌محیطی جدی می‌باشد. امنیت زیست‌محیطی در دریای خزر از اهمیت بسیاری برخوردار است. این دریاچه بزرگ به دلیل ابعاد ژئوپلیتیکی و ژئوآکونومیکی و ویژگی‌های منحصر به فرد خود، بطور قابل توجهی در برابر

کورتیزول شامل محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-اینترنالی (HPI: Hypothalamo-Pituitary-Interrenal) می‌باشد. بطور خلاصه، تولید و آزادسازی کورتیزول در پاسخ به استرس در سلول‌های بین کلیوی، واقع در رأس کلیه استخوانی رخ می‌دهد و عمدتاً توسط هورمون آدرنوکورتیکوتروپیک (ACTH: Adrenocorticotrophic hormone) کنترل می‌گردد (۴). در شرایط استرس کورتیزول تولید شده مکانیسم‌های فیزیولوژیکی را فعال می‌کند تا به ماهی اجازه دهد تا با عوامل استرس‌زا مقابله کند (۲۲). مشخص شده است که سطح کورتیزول در پاسخ به تغییرات حاد از جمله دما در بسیاری از عوامل زنده و غیر زنده افزایش می‌یابد (۳). همچنین هنگام مواجه ماهی با استرس دمایی و به دنبال آن تولید کورتیزول، تغییراتی در شاخص‌های بیوشیمیایی کبد از جمله آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) رخ می‌دهد (۳۸).

در ماهی‌ها، عوامل استرس‌زا انواع واکنش‌های استرس را در سطح سلولی فعال می‌کنند. یکی از شناخته‌شده‌ترین مکانیسم‌هایی که سلول‌ها را از تنش‌های مختلف محافظت می‌کند، پاسخ به شوک حرارتی است که منجر به افزایش تنظیم HSP می‌شود (۲ و ۴۵). خانواده‌ی HSP به طرق مختلف به تنش‌های زیستی و غیرزیستی پاسخ می‌دهند (۲۶). رده‌های سلولی، کشت‌های اولیه سلول‌های مختلف و بافت‌های ماهی به عنوان بیانگر HSP توصیف شده‌اند (۴۴). مطالعات در مجموع نشان می‌دهند که بیان HSP در طیف گسترده‌ای از سلول‌ها و بافت‌های ماهی، توسط عوامل استرس‌زای بیولوژیکی مانند پاتوژن‌های عفونی و هم توسط عوامل استرس‌زای غیرزنده مانند گرما، شوک سرما و آلاینده‌های محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۲۵). همچنین مطالعات بسیاری ارتباط مستقیم بین HSP و کورتیزول را در شرایط استرس دمایی تأیید نموده‌اند (۱۱) و ترکیبات بسیاری به صورت طبیعی یا سنتزی وجود

ماهیان خاویاری از ماهیان Anadromous بوده و جزء مهمترین گونه‌های دریای خزر می‌باشند و جهت تخم‌ریزی به رودخانه مهاجرت می‌کنند (۴۷)، ولی با عواملی همچون صید بی‌رویه، کاهش زیستگاه و مکان تخم‌ریزی، آلودگی محیطی و هرگونه استرس (تغییرات دمایی حین مهاجرت بین آب‌های لب‌شیرین و لب‌شور، شوری، pH، آلاینده‌های صنعتی و سموم کشاورزی) مواجه هستند و مطابق اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت (IUCN: International Union for Conservation of Nature) ۸۵٪ در خطر انقراض می‌باشند و بهترین راه مقابله، تکثیر مصنوعی می‌باشد (۳۵ و ۴۰). ماهی خاویاری استرلیاد (Sterlet)، *Acipenser ruthenus*، یک ماهی آب‌شیرین محسوب می‌شود که در رودخانه‌های بزرگ اوراسیا زندگی می‌کند و یکی از ماهیان خاویاری بومی آسیا و اروپا می‌باشد. نسبت به سایر گونه‌های ماهیان خاویاری، کوچکترین عضو این خانواده بوده و وزن آن ۲۰ کیلوگرم و طولش در نهایت بیش از یک متر نمی‌باشد (۴۸).

در ماهی‌ها، مانند سایر موجودات گرمازا، دمای آب به طور قابل توجهی بر فرآیندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی تأثیر می‌گذارد و به عنوان "عامل اصلی اکولوژیکی" در نظر گرفته می‌شود (۲۳). زیرا افزایش یا کاهش دما از حد اپتیمم می‌تواند بر مکانیسم‌های هموستازی گوناگون تأثیر گذارد. توانایی ماهی‌ها برای تحمل شرایط دمایی مختلف تحت تأثیر عواملی مانند گونه، ژنتیک، سن، مراحل رشد، آمادگی فیزیولوژیکی و سابقه قبلی قرار گرفتن در معرض آن حرارت بستگی دارد. دما موجب تخریب اجزاء سلول می‌شود. شوک دمایی را یکی از مهم‌ترین عوامل استرس‌زا در افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP: Heat shock proteins) و کورتیزول در حیوانات معرفی نمودند (۳۶).

کورتیزول کورتیکواستروئید اصلی در ماهی‌ها می‌باشد و نقش اساسی برای مقابله با چالش‌های محیطی دارد. تولید

دارند که به عنوان القاکننده‌های HSP (HSPi: HSP inducer) شناخته شده و موجب افزایش بیان HSP می‌گردند (۳۷). یکی از این ترکیبات، Pro-TEX[®] یک پیش‌ساز مقاوم است که HSPs را در موجوداتی از جمله ماهیان خاویاری ایرانی القاء می‌کند. Pro-TEX[®] شکل محلول TEX-OE می‌باشد و از *Opuntia ficus indica* یا کاکتوس Nopal به دست می‌آید (۵). آمیگدالین (Amygdalin: HSPi (AMG) دیگری هست که معمولاً استفاده می‌شود. بسیاری از گیاهان، از جمله زردآلو و آلو، حاوی این ترکیب طبیعی هستند (۱۲). علاوه بر این، چندین مطالعه نشان داده است که ترکیبات مبتنی بر پیرازول می‌تواند بیان HSP70 را با فعال کردن ژن HSF1 (Heat Shock Transcription Factor 1) تنظیم کند (۱۴).

مواد و روشها

سنتز ۴،۴- (۱،۴- فنیلن) بیس (۵-آمینو-۳-متیل-۱،۴-دی هیدروپیرانو [c-۲،۳] پیرازول-۶-کربونیتریل؛ SZ): این ترکیب از واکنش ۲ mmol پیرازولون، ۲/۱ mmol مالونیتریل و ۱ mmol ترفتالدهید در حضور محلول ۵ درصد سود (NaOH) به عنوان کاتالیزور در حلال اتانول و در شرایط رفلاکس سنتز شد (۴۱). ساختار ترکیب سنتز شده با روش‌های FT-IR و NMR تأیید گردید (داده‌های تکمیلی- بخش ۱). وزن مولکولی ترکیب سنتزی g/mol ۴۲۷ بود.

مطالعات اندکی در زمینه تاثیرات و پتانسیل ترکیبات HSPi در شرایط استرس در ماهی‌ها خصوصاً ماهیان خاویاری وجود دارد. مطالعه‌ای توسط Vahdatiraad و همکاران در سال ۲۰۲۳ انجام شد که در آن اثرات القایی ترکیب TEX-OE بر روی ماهی خاویاری گونه اوزون‌برون (*Acipenser stellatus*) در مواجهه با تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت (۴۶). همچنین در پژوهش دیگری اثرات القایی ترکیب TEX-OE بر بیان ژن HSP70 و پارامترهای پاسخ ایمنی در بچه تاسماهی ایرانی، *Acipenser persicus* آلوده به *Aeromonas hydrophila* مورد مطالعه قرار گرفت (۶). رده سلولی تکنیک ارزشمندی برای مطالعه استرس، سم‌شناسی، سرطان‌زایی، تنظیم ژنتیکی و بیان می‌باشد (۳۱). به عنوان مثال، سلول‌های کبدی عمدتاً مسئول تنظیم متابولیک و سم‌زدایی هستند (۴۳). سیستم‌های کشت سلولی پتانسیل جایگزینی حیوان به عنوان سیستم‌های مدل برای اندازه‌گیری‌های استرس را دارا می‌باشند (۲۰). هدف از مطالعه حاضر، بررسی پتانسیل HSPi در کاهش استرس ناشی از تغییرات دمایی در سلول‌های کبد ماهی خاویاری استرلیاد و افزایش بقاء می‌باشد. به طور خاص، اثرات HSPi، از جمله

جداسازی سلول از بافت کبد ماهی خاویاری استرلیاد: یک تاسماهی استرلیاد پرورشی به وزن ۱۵/۲۸ گرم و طول تقریباً ۱۸ سانتی‌متر از موسسه تحقیقات بین‌المللی تاس-ماهیان خزر برای این مطالعه استفاده شد، سلول‌های بافت کبد (داده‌های تکمیلی- بخش ۲) در محیط کشت L15 (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) حاوی سرم جنین گاو (FBS: Fetal bovine serum) (تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich) با غلظت نهایی ۱۰٪، در ۲۲°C و ۵٪ CO₂ کشت داده شدند. قبل از شروع کار، محیط L15 ناقص، در داخل حمام آب گرم ۳۷°C قرار داده شد. در زیر هود لامینار و در شرایط استریل به محیط ناقص، ۱۰٪ FBS، ۱٪ محلول پنی‌سیلین / استرپتومایسین (Pen-Strep: Sigma-Aldrich) و ۱٪ آمفوتریسین B (Amphotericin B) تهیه

مطالعات اندکی در زمینه تاثیرات و پتانسیل ترکیبات HSPi در شرایط استرس در ماهی‌ها خصوصاً ماهیان خاویاری وجود دارد. مطالعه‌ای توسط Vahdatiraad و همکاران در سال ۲۰۲۳ انجام شد که در آن اثرات القایی ترکیب TEX-OE بر روی ماهی خاویاری گونه اوزون‌برون (*Acipenser stellatus*) در مواجهه با تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت (۴۶). همچنین در پژوهش دیگری اثرات القایی ترکیب TEX-OE بر بیان ژن HSP70 و پارامترهای پاسخ ایمنی در بچه تاسماهی ایرانی، *Acipenser persicus* آلوده به *Aeromonas hydrophila* مورد مطالعه قرار گرفت (۶). رده سلولی تکنیک ارزشمندی برای مطالعه استرس، سم‌شناسی، سرطان‌زایی، تنظیم ژنتیکی و بیان می‌باشد (۳۱). به عنوان مثال، سلول‌های کبدی عمدتاً مسئول تنظیم متابولیک و سم‌زدایی هستند (۴۳). سیستم‌های کشت سلولی پتانسیل جایگزینی حیوان به عنوان سیستم‌های مدل برای اندازه‌گیری‌های استرس را دارا می‌باشند (۲۰). هدف از مطالعه حاضر، بررسی پتانسیل HSPi در کاهش استرس ناشی از تغییرات دمایی در سلول‌های کبد ماهی خاویاری استرلیاد و افزایش بقاء می‌باشد. به طور خاص، اثرات HSPi، از جمله

مطالعات اندکی در زمینه تاثیرات و پتانسیل ترکیبات HSPi در شرایط استرس در ماهی‌ها خصوصاً ماهیان خاویاری وجود دارد. مطالعه‌ای توسط Vahdatiraad و همکاران در سال ۲۰۲۳ انجام شد که در آن اثرات القایی ترکیب TEX-OE بر روی ماهی خاویاری گونه اوزون‌برون (*Acipenser stellatus*) در مواجهه با تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت (۴۶). همچنین در پژوهش دیگری اثرات القایی ترکیب TEX-OE بر بیان ژن HSP70 و پارامترهای پاسخ ایمنی در بچه تاسماهی ایرانی، *Acipenser persicus* آلوده به *Aeromonas hydrophila* مورد مطالعه قرار گرفت (۶). رده سلولی تکنیک ارزشمندی برای مطالعه استرس، سم‌شناسی، سرطان‌زایی، تنظیم ژنتیکی و بیان می‌باشد (۳۱). به عنوان مثال، سلول‌های کبدی عمدتاً مسئول تنظیم متابولیک و سم‌زدایی هستند (۴۳). سیستم‌های کشت سلولی پتانسیل جایگزینی حیوان به عنوان سیستم‌های مدل برای اندازه‌گیری‌های استرس را دارا می‌باشند (۲۰). هدف از مطالعه حاضر، بررسی پتانسیل HSPi در کاهش استرس ناشی از تغییرات دمایی در سلول‌های کبد ماهی خاویاری استرلیاد و افزایش بقاء می‌باشد. به طور خاص، اثرات HSPi، از جمله

Manufactured for source naturals, INC, BOX 2118, SANTA CRUZ) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. همچنین آمیگدالین (به صورت پودر از Sigma-Aldrich خریداری شد)، یک ترکیب شیمیایی طبیعی با شناسه پابکم ۳۴۷۵۱ است، که جرم مولی آن ۴۵۷/۴۲۹ g/mol می‌باشد. غلظت‌های مختلفی از ترکیب نوپال اندورانس، آمیگدالین و ترکیب سنتز شده (SZ) جهت تست MTT انتخاب گردید (۵۱).

سنجش MTT، یک روش رنگ‌سنجی کمی است که اساس آن بر پایهٔ احیای آنزیمی کریستال‌های زرد رنگ محلول در آب و تشکیل کریستال ارغوانی رنگ و نامحلول فورمازان می‌باشد. احیای MTT، بوسیلهٔ آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی و تنها در سلول‌های زنده رخ می‌دهد. بلورهای فورمازان در حلال‌های آلی چون ایزوپروپانول و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO: Dimethyl sulfoxide) تهیه شده از شرکت Merck، قابل حل می‌باشند که با سنجش میزان جذب نوری آن با دستگاه اسپکتروفتومتر می‌توان تعداد سلول‌های زنده را تعیین نمود. در این روش، برخلاف سایر روش‌ها، مراحل شستشو و جمع‌آوری سلول که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول‌ها و افزایش خطای کار می‌شوند، حذف شده‌اند و تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا خواندن نتایج با فوتومتر، در یک میکروپلیت انجام می‌شوند. لذا تکرارپذیری، دقت و حساسیت آزمایش، بالاست. روش کار بدین صورت است که سلول‌های چسبنده پس از تریپسین کردن، تعداد 5×10^5 cell/ml شمارش نموده و در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و با محیط کشت کامل مخلوط گردید و در شرایط انکوباتور که قبلاً ذکر شد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد، پس از ۲۴ ساعت، چاهک‌ها تخلیه شدند و با غلظت‌های مختلف نوپال اندورانس (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ mM)، ترکیب آمیگدالین (صفر، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ mM) و ترکیب سنتزی SZ (صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و $160 \mu\text{M}$) به‌مراه محیط

شده از شرکت Sigma-Aldrich) اضافه شد تا محیط کامل تهیه گردد. سپس یک تکه از بافت جدا شده در شرایط کاملاً استریل به محیط کشت کامل موجود در یک فالکون اضافه و به آرامی چند بار با پیپت مخلوط و محتوا به درون فلاسک 25 cm^2 منتقل شد. روز بعد، محیط کشت درون فلاسک، با L15 کامل جدید، تعویض گردید. سلول‌ها هر روزه از لحاظ آلودگی و همچنین رشد در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ۱۵-۱۰ روز، هنگامی که سلول‌ها به اندازه ۹۰-۸۰٪ کف فلاسک را پوشش دادند و کاملاً با یکدیگر تلاقی (Confluency) داشتند آماده تریپسین شدن بودند. بدین منظور محیط کشت از فلاسک خارج و سلول‌های چسبیده به کف فلاسک، دو بار با بافر فسفات سالیین (PBS: Phosphate-buffered saline, pH= 7.4) شستشو داده شدند. سپس بعد از اضافه کردن تریپسین-EDTA (۲۵٪) تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich) به سلول‌های تک‌لایه در تمام فلاسک پنخس گردید و فلاسک به مدت ۳ دقیقه در انکوباتور 37°C قرار داده شد. در نهایت با زدن چند ضربه به دیواره فلاسک، سلول‌های چسبیده به کف فلاسک کنده شدند. البته سلول‌های چسبنده را می‌توان با سل اسکرپر (cell scraper) بطور فیزیکی نیز جدا نمود. در مرحله بعد، محیط L15 کامل به فلاسک اضافه شد. سرم موجود در محیط کامل باعث غیرفعال شدن تریپسین می‌شود. محیط کشت، با استفاده از پیپت پاستور، چندین بار مخلوط شد تا سلول‌ها کاملاً از یکدیگر جدا گردند. پس از سانتریفیوژ سلول‌ها (3000 rpm به مدت ۵ دقیقه)، سوپرناتانت خالی و محیط کشت کامل به رسوب سلولی ته فالکون اضافه شد و با پیپت پاستور به آرامی هموزن گردید. تعداد سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند. تعداد مناسبی از سلول‌ها برای آزمایش‌های بعدی به ظرف مورد نظر منتقل گردیدند (۵۱ و ۱۵).

تعیین دوز بهینه ترکیبات HSPi: ترکیب تجاری نوپال اندورانس (Nopal Endurance) تهیه شده از

گروه‌های سلولی که ابتدا ترکیبات HSPi دریافت نمودند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۲۲ انکوبه شدند و پس از آن چاهک‌ها تخلیه شد و با محیط کشت حاوی ۱٪ FBS حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها، در دمای °C ۱۸ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند: (HSPi+T18)، (۵. گروه دمایی °C ۲۶: T26).
 ۶. گروه‌های سلولی که ابتدا ترکیبات HSPi دریافت نمودند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۲۲ انکوبه شدند و پس از آن چاهک‌ها تخلیه شد و با محیط کشت حاوی ۱٪ FBS حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها، در دمای °C ۲۶ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند: (HSPi+T26). تمامی گروه‌ها با ۳ تکرار انجام شد. در نهایت، پس از انجام تیمار سلول‌ها با تریپسین از کف فلاسک جدا و سانتریفیوژ (۳۰۰۰ rpm در ۵ دقیقه) شد. رسوب سلول‌ها جهت تست‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. حجم نهایی در هر چاهک ۵۰۰ میکرولیتر بود.

سنجش پارامترهای متابولیک: سطوح کورتیزول با توجه به دستورالعمل‌های توصیه شده سازنده کیت (Enzyme-Linked Immune Sorbent Assays; Nanjing, China) اندازه‌گیری شد. تغییرات رنگ به روش اسپکتروفتومتری با دستگاه الیزاریدر (۴۵۰ نانومتر) شناسایی شد (۳۳).

فعالیت آنزیمی (EC 2.6.1.1) AST، (EC 2.6.1.2) ALT، (EC 3.1.3.1) ALP و (EC 1.1.1.27) LDH در سلول‌های کبد مطابق پروتکل ارائه شده با کیت (MyBioSource, USA) بررسی شد (۱۰).

از جمله روش‌های تعیین غلظت پروتئین، روش بردفورد است که اساس آن تفاوت در جذب نور در طول موج nm ۶۳۰ است (۱۳). با افزایش غلظت پروتئین محلول، رنگ آبی حاصل بیشتر شده و میزان جذب نوری آن نیز افزایش می‌یابد.

تجزیه و تحلیل‌های آماری: نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8 ترسیم گردیده است. تجزیه و تحلیل‌های آماری به کمک نرم‌افزار SPSS 23 انجام شد. ابتدا با

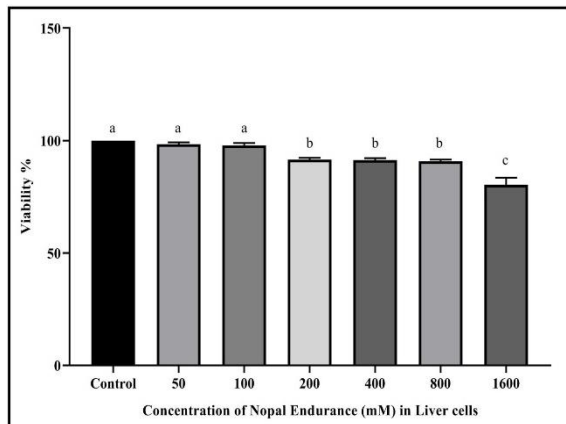
کشت DMEM حاوی ۱٪ FBS و آنتی‌بیوتیک‌ها تیمار و در انکوباتور °C ۲۲ و ۵ درصد CO₂ نگهداری شدند. حجم نهایی در هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر و هر غلظت سه بار تکرار شد. بعد از ۲۴ ساعت، محتوای چاهک‌ها خالی شدند و محیط کشت بدون FBS با ۱۰ μl از محلول MTT (۵ mg/ml) به درون هر چاهک اضافه گردید (حجم نهایی در هر چاهک ۱۰۰ μl که ۱۰٪ آن شامل محلول MTT و ۹۰٪ محیط کشت بود). در گام بعد پس از ۲/۴۰ الی ۴ ساعت انکوباسیون در دمای °C ۲۲ محتوای چاهک‌ها خالی شد. محصول فورمازان تولید شده به دلیل نامحلول بودن، با افزودن ماده حلالی مانند DMSO (۱۰۰ μl)، به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت تا به حالت محلول درآید. در نهایت جذب نوری محلول، در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزاریدر قرائت و میزان زنده-مانی (طبق فرمول ۱) محاسبه شد (۲۷ و ۲۴).

فرمول (۱):

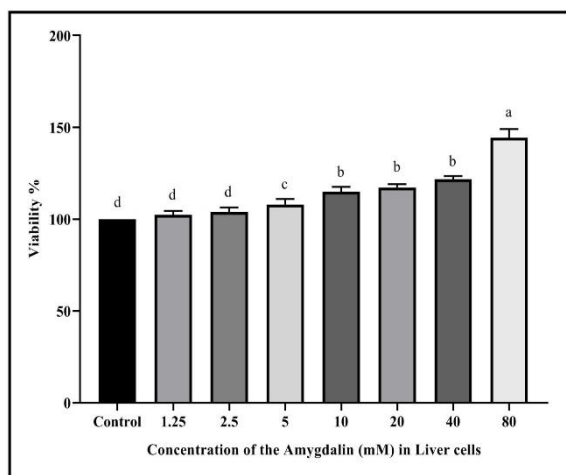
$$\text{Cell viability} = \left[\frac{\text{OD (treatment)}}{\text{OD (control)}} \right] \times 100\%$$

تیمار بندی در استرس دمایی: برای انجام استرس دمایی ابتدا تعداد cell/ml 5×10^5 در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای ریخته شد و پس از ۲۴ ساعت، پس از تعویض محیط کشت (حاوی DMEM، ۱٪ FBS، آمفوتریسین B ۱٪ و Pen-Strep ۱٪)، در یکسری از چاهک‌ها سلول‌ها تنها با ترکیبات HSPi با دوزهای بهینه تعیین شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۲۲ تیمار شدند. سپس، پس از تعویض محیط کشت تمام چاهک‌ها (حاوی DMEM، ۱٪ FBS، آمفوتریسین B ۱٪ و Pen-Strep ۱٪)، یکسری در دمای °C ۱۸، یکسری در دمای °C ۲۲ و یکسری در دمای °C ۲۶، ۵ درصد CO₂ و ۹۵٪ رطوبت به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. گروه بندی بدین صورت بود: (۱. شاهد (دمای °C ۲۲: T22)، ۲. گروه‌های سلولی که ترکیبات HSPi دریافت نمودند و در دمای °C ۲۲ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند: (HSPi+T22)، (۳. گروه دمایی °C ۱۸: T18، ۴.

شاهد (T22) و دماهای 18°C (T18) و 26°C (T26) گروه استرس در نظر گرفته شدند و در حضور و غیاب ترکیبات HSPi با دوزهای بهینه آن‌ها تیمار شدند (شکل ۴: $P < 0.0001$).



شکل ۱- بررسی زنده‌مانی ترکیب نوپال اندورانس (Tex-OE) در سلول‌های کبد استرلیاد. در غلظت 800 mM ، 90% سلول‌ها زنده بودند. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها \pm خطای استاندارد میانگین می‌باشد. ستون‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح کمتر از ($P < 0.0001$) تفاوت معنی‌دار داشتند.



شکل ۲- ارزیابی زنده‌مانی ترکیب آمیگدالین در سلول‌های کبد استرلیاد. با افزایش دوز مقدار زنده‌مانی افزایش چشمگیری داشت. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها \pm خطای استاندارد میانگین می‌باشد. ستون‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح کمتر از ($P < 0.0001$) تفاوت معنی‌دار نشان دادند.

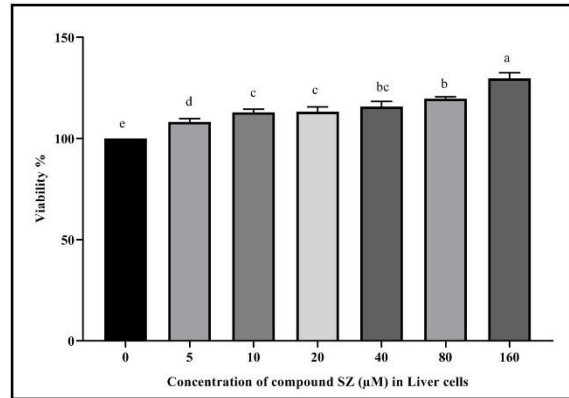
استفاده از آزمون Kolmogorov - Smirnov نرمال بودن داده‌ها تأیید گردید ($\text{sig} > 0.05$). سپس تجزیه و تحلیل‌ها با آزمون یک‌طرفه‌ی واریانس (One-way ANOVA) و تست کمکی دانکن انجام شدند. تمامی گروه‌های تیماری با سه تکرار انجام شدند و داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (Mean \pm standard error of the mean; SEM) ارائه شدند ($P < 0.0001$). در نهایت تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی (PCA: principal component analysis) برای ارزیابی اجزای اصلی بین پارامترهای مورد مطالعه و تیمارهای مختلف برای استرس دمایی انجام شد. همچنین با همبستگی پیرسون ارتباط بین پارامترها بررسی گردید.

نتایج

بررسی زنده‌مانی سلول‌های کبد تحت تیمار با ترکیبات HSPi: سلول‌های کبد با غلظت‌های مختلفی از نوپال اندورانس (شکل ۱)، آمیگدالین (شکل ۲) و ترکیب سنتزی SZ (شکل ۳) تیمار شدند ($P < 0.0001$). مقدار زنده‌مانی در ترکیب نوپال اندورانس در دوزهای 50 mM و 100 mM مشابه گروه شاهد (100%) بود ولی در دوز 1600 mM ($80\%/33$)، 20% مرگ سلولی مشاهده شد ($P < 0.0001$). آمیگدالین و ترکیب سنتزی SZ با افزایش دوز، مقدار زنده‌مانی را در مقایسه با گروه شاهد افزایش دادند و سمیتی روی سلول‌های تیماری نداشتند ($P < 0.0001$). طبق نتایج به دست آمده از تست MTT، غلظت 800 mM ($90\%/67$) بقاء از ترکیب نوپال اندورانس (N800)، غلظت 80 mM ($144\%/33$) از ترکیب آمیگدالین (A80) و غلظت $80\text{ }\mu\text{M}$ ($129\%/66$) از ترکیب SZ (SZ80) به عنوان دوزهای بهینه HSPi انتخاب شدند و جهت انجام آزمایش‌های بعدی این دوزها استفاده گردیدند.

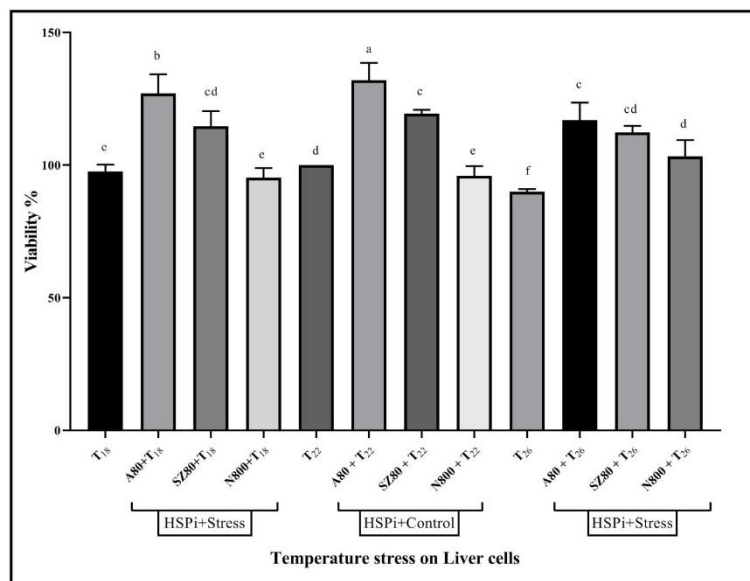
ارزیابی زیست‌پذیری سلول‌های کبد در تنش دمایی در حضور و عدم حضور دوزهای بهینه ترکیبات HSPi: سلول‌های کبد تحت تیمار در دمای 22°C به عنوان گروه

بقای سلولی در دمای 18°C ($97/66$) نزدیک به گروه شاهد (100%) بود ولی در دمای 26°C (90%)، 10% مرگ سلولی مشاهده شد. سلول‌هایی که ابتدا HSPi را دریافت نمودند و سپس در معرض استرس دمایی قرار گرفتند افزایش چشم‌گیری در زنده‌مانی سلول‌ها داشتند. بیشترین بقاء مربوط به گروه‌هایی بود که آمیگدالین دریافت کرده بودند (127% : A80+T18، 132% : A80+T22 و 117% : A80+T26).



شکل ۳- مقایسه زیست‌پذیری ترکیب سنتزی SZ در سلول‌های کبد با افزایش دوز زنده‌مانی نیز افزایش پیدا کرد. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها \pm خطای استاندارد میانگین می‌باشد. ستون‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح کمتر از ($P < 0.0001$) تفاوت معنی‌دار دارند.

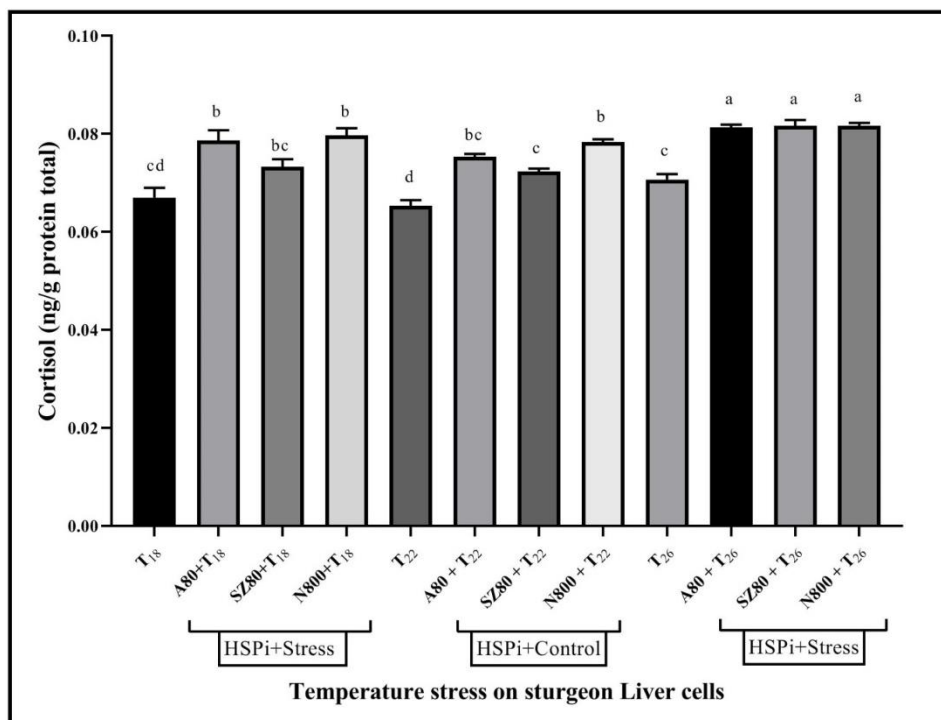
تغییرات کورتیزول: سطوح کورتیزول در سلول‌های کبد تیماری با دوزهای بهینه HSPi در سه دمای 18°C و 22°C ۲۶ نوساناتی داشت (شکل ۵).



شکل ۴- مقایسه زنده‌مانی سلول‌های کبد در حضور ترکیبات HSPi تحت استرس دمایی. دوازده گروه در نظر گرفته شد: ۱. گروه شاهد بدون تیمار در دمای 22°C (T22)، گروه‌های حاوی HSPi در دمای 22°C شامل: ۲. 80 mM آمیگدالین (A80+T22)، ۳. $80\text{ }\mu\text{M}$ SZ (SZ80+T22)، ۴. 800 mM نوپال اندورانس (N800+T22)، ۵. سلول‌های بدون تیمار HSPi در دمای 18°C (T18)، گروه‌های حاوی HSPi ابتدا در دمای 22°C انکوبه شدند پس از ۲۴ ساعت، به دمای 18°C منتقل شدند شامل: ۶. 80 mM آمیگدالین (A80+T18)، ۷. $80\text{ }\mu\text{M}$ SZ (SZ80+T18)، ۸. 800 mM نوپال اندورانس (N800+T18)، ۹. سلول‌های بدون تیمار HSPi در دمای 26°C (T26)، گروه‌های حاوی HSPi در دمای 22°C انکوبه شدند، پس از ۲۴ ساعت، آنها به دمای 26°C منتقل شدند شامل: ۱۰. 80 mM آمیگدالین (A80+T26)، ۱۱. $80\text{ }\mu\text{M}$ SZ (SZ80+T26)، ۱۲. 800 mM نوپال اندورانس (N800+T26). حضور القاکننده‌های HSP موجب کاهش استرس و افزایش زنده‌مانی در سلول‌های کبد گردید. بهترین عملکرد در حضور آمیگدالین مشاهده شد ($P < 0.0001$). هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها \pm خطای استاندارد میانگین می‌باشد. ستون‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح کمتر از ($P < 0.0001$) تفاوت معنی‌دار داشتند.

دمای دیگر فعالیت کورتیزول بیشتری داشتند. تغییرات در گروه‌های دمای ۱۸ °C اندکی بالاتر از گروه‌های دمای ۲۲ °C بود ($P < 0.0001$). تغییرات آمیگدالین (A80+T18) و نوپال اندورانس (N800+T18) در دمای ۱۸ °C مشابه بود ولی ترکیب سنتزی (SZ80+T18) فعالیت کمتری نشان داد. الگوی تغییرات گروه‌های دریافت کننده HSPi در دمای ۲۲ °C نیز مشابه دمای ۱۸ °C بود. گروه‌های دریافت کننده HSPi در دمای ۲۶ °C تغییرات مشابهی نسبت به هم داشتند ($P < 0.0001$).

در مقایسه با گروه شاهد (گروه T22) سطح فعالیت در گروه‌های T18 و T26 (بدون ترکیبات HSPi) بالا بود. سطوح تغییرات کورتیزول در گروه‌های دریافت‌کننده ترکیبات HSPi در هر سه دمای مورد مطالعه متفاوت بود. به طور کلی سلول‌هایی که ابتدا ترکیبات HSPi دریافت کردند و سپس در معرض تنش‌های دمایی قرار گرفتند افزایش چشمگیری در فعالیت کورتیزول نسبت به گروه‌هایی که بدون ترکیبات HSPi بودند، نشان دادند ($P < 0.0001$). گروه‌های تیماری در دمای ۲۶ °C نسبت به دو



شکل ۵- فعالیت ویژه تغییرات هورمون کورتیزول در سلول‌های کبدی تیمار شده با القاکننده‌ها در استرس دمایی. SZ80، A80 و N800 به عنوان ترکیبات HSPi در نظر گرفته شدند. در حضور القاکننده‌ها فعالیت کورتیزول در دمای ۲۶ °C بیشترین مقدار بود. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها \pm خطای استاندارد میانگین می‌باشد. ستون‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح کمتر از ($P < 0.0001$) تفاوت معنی‌دار نشان دادند.

۲۲ °C تیمار شدند (دمای شاهد) مشاهده شد. گروه‌هایی که در دماهای ۱۸ °C و ۲۶ °C (در حضور و عدم حضور ترکیبات HSPi) تیمار شدند در مقایسه با گروه‌های قرار گرفته در دمای ۲۲ °C سطوح فعالیت آنزیمی بالاتری داشتند. در مقایسه با گروه شاهد (T22)، بیشترین سطح

بررسی آنزیم‌های بیوشیمیایی: فعالیت آنزیم‌های AST، ALT، ALP و LDH در سلول‌های تحت تیمار تغییرات دمایی در حضور و عدم حضور ترکیبات HSPi ارزیابی شد (جدول ۱: $P < 0.0001$). الگوی تغییرات هر چهار آنزیم مشابه بود. کمترین سطح فعالیت در گروه‌هایی که در دمای

نشان داد ولی اندکی از آن بالاتر بود ($P < 0.0001$). تغییرات پروتئین تام نیز در گروه‌های تیماری بررسی شد (شکل ۶: $P < 0.0001$). بیشترین مقدار پروتئین در گروه‌های N800+T18 و N800+T22 مشاهده گردید. الگوی تغییرات بین گروه‌های تیماری در دماهای ۱۸ °C و ۲۲ °C مشابه بود. سطح پروتئین در گروه‌های ۲۶ °C مشابه یکدیگر و بالاتر از گروه‌های تیماری در دمای ۱۸ °C و ۲۲ °C قرار داشت ($P < 0.0001$).

فعالیت آنزیمی در گروه T26 مشاهده شد (AST: ۲/۲۰۹، ALP: ۲/۷۹۱، ALT: ۱/۵۶۵، LDH: ۱۱/۳۵ U/g). در بین گروه‌های دریافت‌کننده ترکیبات HSPi (در هر سه دمای مورد مطالعه)، بیشترین سطح فعالیت در گروه‌های دریافت‌کننده ترکیب SZ80 مشاهده شد. بطور کلی سلول‌هایی که ابتدا آمیگدالین (A80) دریافت نمودند و سپس در معرض استرس دمایی قرار گرفتند سطوح فعالیت آنزیمی کمتری نسبت به سایر ترکیبات HSPi داشتند. ترکیب نوپال اندورانس (N800) تغییراتی نزدیک به آمیگدالین (A80)

جدول ۱- فعالیت ویژه آنزیم‌های بیوشیمیایی در سلول‌های کبد گونه استرلیاد تحت تیمار دمایی. بیشترین سطح فعالیت آنزیم در دمای ۲۶ °C مشاهده شد. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها \pm خطای استاندارد میانگین می‌باشد. ستون‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح کمتر از ($P < 0.0001$) تفاوت معنی‌دار نشان دادند.

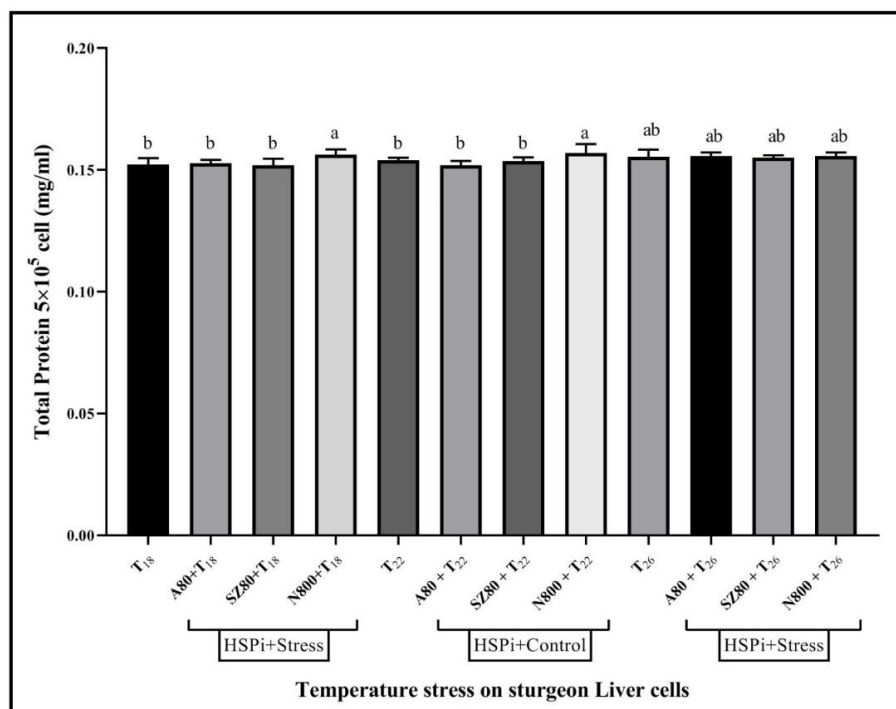
Groups*	Analysis of Biochemical parameters (Unit per g total protein)			
	AST (U/g)	ALT (U/g)	ALP (U/g)	LDH (U/g)
T18 (stress)	1.717 \pm 0.082 ^c	1.140 \pm 0.099 ^c	2.083 \pm 0.048 ^b	8.155 \pm 0.504 ^d
A80 + T18	1.126 \pm 0.071 ^g	0.852 \pm 0.040 ^e	1.814 \pm 0.083 ^{cd}	7.223 \pm 0.364 ^{ef}
SZ80 + T18	1.535 \pm 0.063 ^d	1.266 \pm 0.085 ^b	2.034 \pm 0.100 ^b	8.874 \pm 0.402 ^c
N800 + T18	1.340 \pm 0.066 ^{ef}	1.042 \pm 0.046 ^d	1.997 \pm 0.076 ^b	7.690 \pm 0.234 ^e
T22 (Control)	0.995 \pm 0.059 ^h	0.617 \pm 0.071 ^g	1.283 \pm 0.054 ^g	5.524 \pm 0.405 ^g
A80 + T22	1.037 \pm 0.055 ^h	0.733 \pm 0.096 ^f	1.339 \pm 0.054 ^f	6.865 \pm 0.345 ^f
SZ80 + T22	1.597 \pm 0.092 ^d	1.232 \pm 0.080 ^b	2.055 \pm 0.078 ^b	7.920 \pm 0.200 ^e
N800 + T22	0.983 \pm 0.071 ^h	0.846 \pm 0.053 ^e	1.870 \pm 0.086 ^{cd}	7.230 \pm 0.349 ^{ef}
T26 (stress)	2.209 \pm 0.123 ^a	1.565 \pm 0.051 ^a	2.791 \pm 0.079 ^a	11.35 \pm 0.529 ^a
A80 + T26	1.299 \pm 0.066 ^f	0.737 \pm 0.079 ^f	1.614 \pm 0.053 ^c	7.400 \pm 0.665 ^e
SZ80 + T26	2.048 \pm 0.092 ^b	1.281 \pm 0.081 ^b	1.988 \pm 0.075 ^c	9.950 \pm 0.196 ^b
N800 + T26	1.424 \pm 0.097 ^e	0.855 \pm 0.049 ^e	1.652 \pm 0.096 ^d	8.357 \pm 0.494 ^{cd}

*دوازده گروه در نظر گرفته شدند: ۱. گروه شاهد بدون تیمار در دمای ۲۲ °C (T22)، گروه‌های حاوی HSPi در دمای ۲۲ °C شامل: (۲. ۸۰ mM، آمیگدالین (A80+T22)، (۳. ۸۰ μM SZ (SZ80+T22)، (۴. ۸۰۰ نوپال اندورانس (N800+T22)، (۵. سلول‌های بدون تیمار در دمای ۱۸ °C (T18)، گروه‌های حاوی HSPi ابتدا در دمای ۲۲ °C انکوبه شدند پس از ۲۴ ساعت، به دمای ۱۸ °C منتقل شدند شامل: (۶. ۸۰ mM، آمیگدالین (A80+T18)، (۷. ۸۰ μM SZ (SZ80+T18)، (۸. ۸۰۰ نوپال اندورانس (N800+T18)، (۹. سلول‌ها بدون تیمار در دمای ۲۶ °C (T26)، گروه‌های حاوی HSPi در دمای ۲۲ °C انکوبه شدند، پس از ۲۴ ساعت، آن‌ها به دمای ۲۶ °C منتقل شدند شامل: (۱۰. ۸۰ mM، آمیگدالین (A80+T26)، (۱۱. ۸۰ μM SZ (SZ80+T26)، (۱۲. ۸۰۰ نوپال اندورانس (N800+T26)).

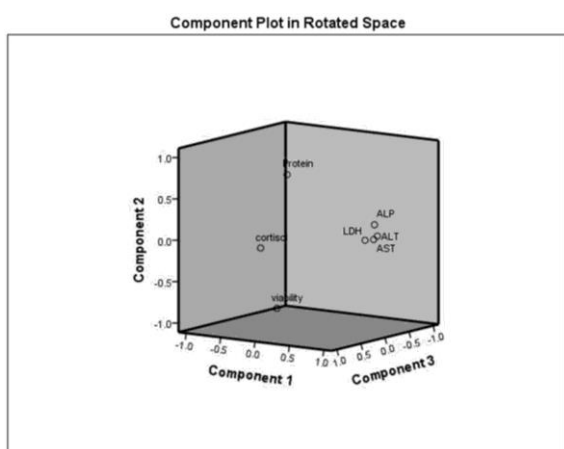
جدول ۲- ارزیابی همبستگی پیرسون بین پارامترهای سنجش شده در استرس دمایی. آنزیم‌های بیوشیمیایی با هم دارای همبستگی مثبت بودند.

	Viability	Cortisol	AST	ALT	ALP	LDH	Total protein
Viability	1						
Cortisol	0.236	1					
AST	-0.258	-0.064	1				
ALT	-0.291	-0.129	0.827**	1			
ALP	-0.387*	-0.116	0.758**	0.824**	1		
LDH	-0.273	0.118	0.846**	0.773**	0.749**	1	
Total protein	-0.427**	0.359*	0.076	0.057	0.138	0.098	1

* در سطح کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار است (2-tailed). ** در سطح کمتر از ۰/۰۱ معنی‌دار است (2-tailed).



شکل ۶- سطح تغییرات پروتئین تام در سلول‌های کبد تحت تیمار دمایی. گروه‌های N800+ T22 و N800+ T18 بیشترین مقدار پروتئین تام را داشتند. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها \pm خطای استاندارد میانگین می‌باشد. ستون‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح کمتر از ($P < 0.0001$) تفاوت معنی‌دار نشان دادند.



شکل ۷- تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی در استرس دمایی. مولفه‌های اصلی اول، دوم و سوم در مجموع ۸۷/۶۷٪ از تغییرات را بیان نمودند. تمامی متغیرهای اندازه‌گیری شده در استرس دمایی در مولفه اول نقش مهمی در تعیین ارتباط بین تیمارها و متغیرهای مورد آزمون داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از بهترین مکانیسم‌های شناخته‌شده که از سلول‌ها در برابر استرس‌های گوناگون حفاظت می‌کند پاسخ به شوک حرارتی است که منجر به القای سنتز پروتئین‌های شوک

تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) در استرس دمایی: تجزیه مولفه‌های اصلی بر مبنای ۷ متغیر و ۳۶ تیمار انجام شد. مولفه‌های اصلی اول، دوم و سوم به ترتیب ۵۰/۹۸، ۲۰/۰۸ و ۱۶/۶۰ درصد از تغییرات را بیان نمودند. متغیرهایی با امتیاز بالاتر از ۰/۶ در مولفه‌های اول، دوم و سوم برای تفسیر مورد استفاده قرار گرفت. تمامی متغیرهای اندازه‌گیری شده در استرس دمایی در مولفه اول نقش مهمی در تعیین ارتباط بین تیمارها و متغیرهای مورد آزمون داشتند (شکل ۷). ارتباط و همبستگی متغیرها با آزمون همبستگی پیرسون بررسی شد (جدول ۲). آنزیم‌های بیوشیمیایی (ALP، ALT، AST و LDH) با همدیگر دارای همبستگی مثبتی بودند ($P < 0.01$). از طرفی زنده‌مانی با آنزیم ALP ($P < 0.05$) و پروتئین تام ($P < 0.01$) همبستگی مثبت نشان داد. کورتیزول با پروتئین تام دارای همبستگی مثبت بود ($P < 0.05$).

مطالعات گذشته با این‌که ترکیبات آمیگدالین (۱) و مشتقات پیرازولی (۴۱) خاصیت ضدسرطانی دارند با این حال، هیچ مطالعه‌ای در رابطه با اثر آمیگدالین و ترکیبات مشتق شده از پیرانوپیرانازول بر بیان HSP در ماهیان خاویاری وجود ندارد.

یکی از راهکارهای حفظ جمعیت ماهیان در حال انقراض، تکثیر و پرورش آن‌ها در مراکز پرورشگاهی و رهاسازی آن‌ها به آب شیرین است (۱۹). چالشی که در این رویکرد وجود دارد این است که ماهی‌ها در شرایط بهینه در مراکز تکثیر می‌یابند اما پس از رهاسازی در معرض مختلف شرایط فیزیکی و شیمیایی آب قرار می‌گیرند (۲۱). بنابراین، اولین جنبه استفاده از HSPi ممکن است بتواند به غلبه بر این چالش کمک کند. با این حال، جنبه دوم که در آن استرس‌ها با HSPi‌ها در آزمایش‌ها ترکیب شود و تیمار صورت گیرد، در از بین بردن سمیت‌ها و کاهش استرس بسیار مهم می‌باشد. با توجه به نقش HSP‌ها در شرایط استرس، ترکیبات HSPi در رده‌ی سلولی جدا شده از کبد استرلیاد توانست اثرات محافظتی در برابر تغییرات دمایی (۱۸، ۲۲ و ۲۶ °C) داشته باشد. سنجش MTT نشان داد که A80 و SZ80 می‌توانند زنده‌مانی سلول را افزایش دهند، اما N800 اندکی آن را کاهش داد. همچنین سلول‌هایی که ابتدا ترکیبات HSPi دریافت نمودند و سپس در معرض تغییرات دمایی (۱۸، ۲۲ و ۲۶ °C) قرار گرفتند، موجب افزایش زنده‌مانی شدند.

تغییر در دمای آب بر فیزیولوژی ماهی بی‌تأثیر نیست و دمای بالا و پایین برای ماهی می‌تواند استرس تلقی شده و بطور جدی بر عملکرد و فعالیت کورتیزول اثر گذاشته و بر سلامت ماهی تأثیر منفی بگذارد (۲۸ و ۴۲). تغییرات سریع حرارتی باعث ایجاد یکسری پاسخ‌های فیزیولوژیکی از جمله فعال شدن محور استرس و تولید کورتیزول در ماهی می‌گردد (۴). همچنین در مطالعه‌ای که بر روی ماهی‌های آمازون تحت تنش دمایی صورت گرفت، مشاهده شد که

حرارتی یا HSP می‌شود (۳۴ و ۳۹). سلول‌های سالم وقتی با استرسی به چالش کشیده می‌شوند، فعالیت فاکتور شوک حرارتی ۱ (HSF1) را تنظیم می‌کنند تا از ساختار و عملکرد پروتئین طبیعی آن محافظت کنند. HSF1 بیان گروهی از شوک حرارتی القایی (HSPs) مانند HSP70 و HSP90 را تحریک می‌کند تا پروتئین‌های آسیب‌دیده را به ساختار اصلی خود بازگرداند یا حذف پروتئین‌ها را تحریک می‌نماید (۲۹). همچنین مطالعات گذشته ارتباط بین HSP70 و فاکتور ۲ مربوط به فاکتور هسته‌ای اریتروئید ۲ (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2: Nrf2)، را که وظیفه‌ی آن کمک به تنظیم کار پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی است و می‌تواند به محافظت در برابر استرس خصوصاً آسیب اکسیداتیو کمک کند، تأیید کرده‌اند (۳۰). در مطالعه حاضر، تأثیر Tex-OE، آمیگدالین و SZ مبتنی بر پیرانو- پیرانازول جدید سنتز شده به عنوان القاکننده‌های HSP در کاهش اثرات منفی دما و زنده‌مانی سلول‌های کبد تاسماهی استرلیاد ارزیابی شد. با استفاده از روش MTT، مشخص شد که دمای ۲۶ °C در مقایسه با دماهای ۲۲ و ۱۸ °C می‌تواند بر زنده‌مانی سلول‌های استرلیاد تا حدودی تأثیر منفی بگذارد و منجر به مرگ سلولی گردد. در یک پژوهشی، گونه *pikeperch* (Sander *lucioperca*) تحت تنش دمایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج کلی نشان داد که آبشش‌های *pikeperch* به تنش گرمایی حساس بوده و *pikeperch* از طریق تنظیم سیستم آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن‌های HSP و ژن‌های دخیل در متابولیسم انرژی به استرس گرمایی پاسخ داده و اثرات تنش دمایی را بهبود می‌بخشند (۱۶). ترکیبات طبیعی یا مصنوعی به عنوان ترکیبات HSPi وجود دارند که می‌توانند بیان HSP را افزایش دهند. آن‌ها فاکتورهای رونویسی شوک حرارتی (HSFs) را فعال می‌کنند و موجب القاء و افزایش بیان HSP می‌شوند (۳۷). چندین مطالعه گزارش کرده‌اند که Tex-OE بیان HSP70 و HSP90 را در ماهی و صدف افزایش می‌دهد (۶، ۹ و ۴۶). همچنین طبق

سپس تحت استرس دمایی قرار گرفتند، منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های مذکور شده و شرایط استرسی را تا حدودی به شاهد نزدیک کردند. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل همبستگی و مولفه‌های اصلی یک رابطه نسبتاً قوی بین آنزیم‌های بیوشیمیایی در سلول‌های کبد را نشان داد، که بیشتر نشان‌دهنده اهمیت این آنزیم‌ها در شرایط استرس می‌باشد. با توجه به آنالیز PCA که برای شناسایی موثرترین درمان تنش دمایی استفاده گردید، ترکیبات *Tex-OE* و خصوصاً آمیگدالین در شرایط تغییرات دمایی (بویژه $^{\circ}\text{C}$ ۲۶)، تنش گرمایی را کنترل نموده و توانستند شرایط سلول را به سطوح طبیعی بازگردانند.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ترکیبات *HSPi* می‌توانند به طور مثبت فعالیت کورتیزول را در سلول تحت تنش دمایی ماهی استرلیاد تعدیل کنند. علاوه بر این، آن‌ها توانستند فعالیت آنزیم‌های بیوشیمیایی را بهبود ببخشند، در نهایت میزان بقای سلول‌ها را در شرایط آزمایشگاهی افزایش دهند. در نتیجه، القاکننده‌های *HSP* ممکن است یک راه قدرتمند و قابل اعتماد برای افزایش مقاومت سلول‌های استرلیاد قبل از قرار گرفتن در تنش دما و معکوس کردن اثرات مضر آن باشند. با این حال، به منظور اعمال کافی این رویکرد و توصیف اثرات آن‌ها بر وضعیت سلامت گونه‌ها و همچنین در ترکیب با سایر استرس‌ها نیاز به بررسی و مطالعه بیشتر دارند.

سپاسگزاری

تأمین مالی این مطالعه توسط پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر (شماره گرنت ۹۶۱۱۳۱۰۰۰۱) صورت گرفت. همچنین نویسندگان از حمایت‌های دانشگاه گیلان در انجام این پژوهش کمال تشکر را دارند.

دماهای بالا هموستاز را مختل می‌کنند و ماهی را در معرض استرس اکسیداتیو قرار می‌دهند (۷). همچنین ارتباط مثبت بین بیان *HSP* و کورتیزول در شرایط استرس سلولی اثبات شده است (۱۱، ۲۵ و ۵۱). نتایج مطالعه کنونی بر روی سلول‌های کبدی ماهی استرلیاد نشان داد هر سه ترکیب *HSPi* مورد مطالعه در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۲۶ در سلول‌های کبد، موجب افزایش سطوح کورتیزول می‌شوند.

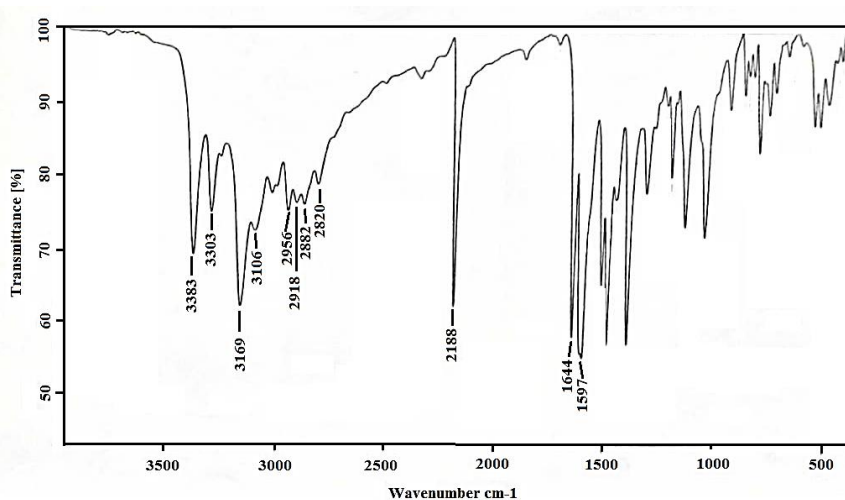
سطوح تنش ماهی را می‌توان با فعالیت آنزیم‌های بیوشیمیایی (*LDH*، *ALP*، *ALT*، *AST*) نشان داد (۸). مطالعه‌ای بر روی گربه‌ماهی زرد هیبرید (*Pelteobagrus fulvidraco* × *P. vachelli*) تحت تنش دمایی انجام شد. نتایج مطالعه نشان داد که تعداد گلبول‌های قرمز، تعداد گلبول‌های سفید، سطوح هموگلوبین و مقادیر هماتوکریت پس از قرار گرفتن در معرض استرس گرمایی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده افزایش متابولیسم سلولی است. همچنین فعالیت‌های آنزیمی *ALT*، *AST*، *ALP* و *LDH* نیز افزایش یافت که نشان‌دهنده نیاز به مقابله با استرس و آسیب سلولی بود (۱۸). در مطالعه دیگری که روی ماهی *pufferfish* (*Takifugu obscurus*) تحت استرس دمایی صورت گرفت. تنش حرارتی توانست به طور قابل توجهی سطوح *LDH*، *ALT*، *AST*، گلوکز و تری‌گلیسیرید را افزایش دهد، در حالی که سطح *ALP* بطور قابل توجهی کاهش داد. علاوه بر این، استرس حرارتی همچنین تعداد کل سلول‌های خونی را کاهش داد، زنده‌مانی سلول را مهار کرد و متعاقباً منجر به آسیب *DNA* و آپوپتوز شد (۱۷). نتایج مطالعه حاضر حاکی از این بود که دمای $^{\circ}\text{C}$ ۲۶ فعالیت آنزیم‌های *ALP*، *ALT*، *AST* و *LDH* را در سلول‌های کبد تحت تاثیر قرار می‌دهد و موجب افزایش فعالیت آن‌ها می‌شود. بالعکس، سلول‌هایی که ابتدا با ترکیبات آمیگدالین و *Tex-OE* تیمار شدند و

اطلاعات تکمیلی

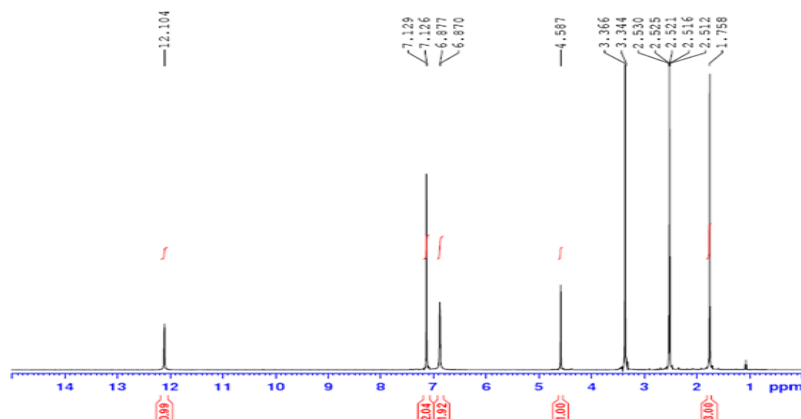
۱- سنتز ۴،۴- (۱،۴- فنیلین) بیس (۵-آمینو-۳-متیل-۱،۴-دی هیدروپیرانو [۲،۳-c] پیرازول-۶-کربونیتریل)

(trimethylsilane) به عنوان استاندارد داخلی، تأیید شد. وزن مولکولی آن ۴۲۷ gr/mol می‌باشد. مراحل آماده سازی نمونه جهت NMR به طور خلاصه بدین صورت است: نمونه‌ی جامد (کریستال) و لوله‌ی ۵ mm، حدود ۲۰ mg از نمونه در ۰/۶ ml حلال (اینجا DMSO) حل می‌شود. حدود ۰/۱٪ از TMS (ترا متیل سیلان) به عنوان استاندارد داخلی به نمونه اضافه می‌شود. نمونه از طریق سیستم پاستور که کاملاً خشک و تمیز است به لوله منتقل می‌شود. حدود ۰/۲ ml حلال دتره به نمونه اضافه شود به طوری که در نهایت عمق نمونه در داخل تیوپ ۳-۴ cm باشد. درب نمونه را گذاشته آن را با پارافیلیم سیلد می‌کنیم. باید درب، پارافیلیم و برچسب متقارن بر روی لوله باشند در غیر این صورت بر روی طیف تأثیر می‌گذارند سپس مرحله Shim کردن نمونه جهت بهبود پارامترها را داریم و محل جدید برای جمع-آوری نمونه ایجاد می‌کنیم.

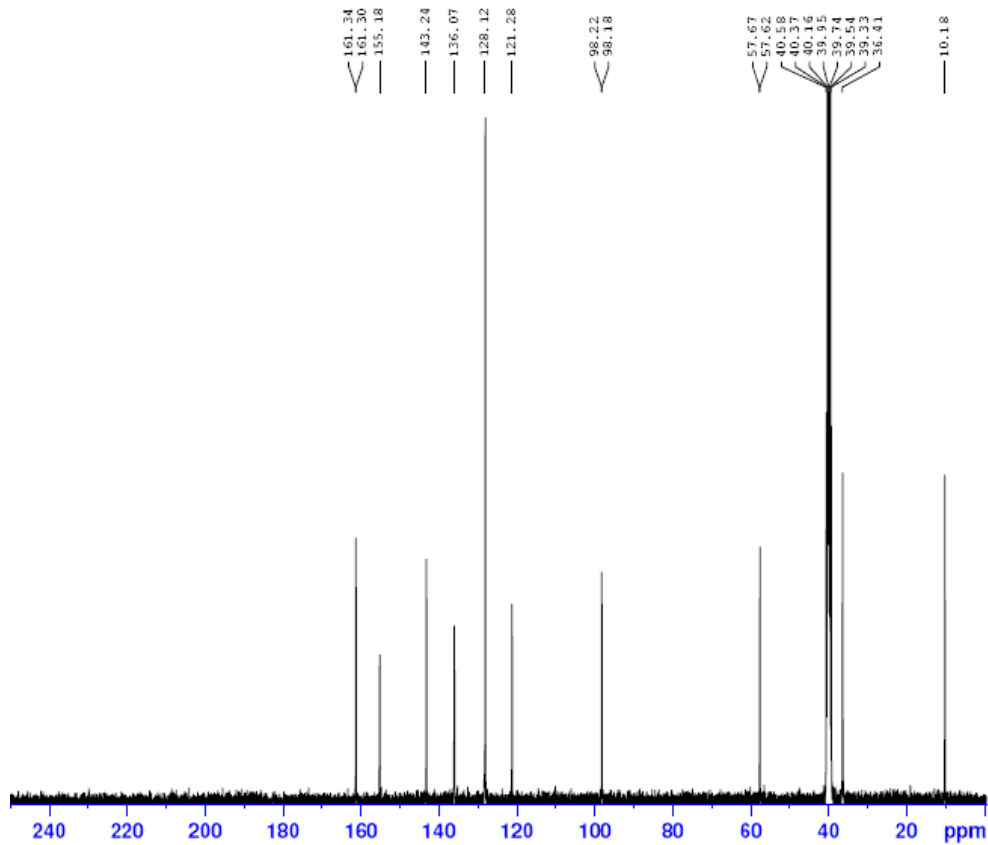
این ترکیب از واکنش ۲ میلی‌مول پیرازولون، ۲/۱ میلی‌مول مالونیتریل و ۱ میلی‌مول ترفنالدئید در حضور محلول ۵ درصد سود (NaOH) به عنوان کاتالیزور در حلال اتانول و در شرایط رفلکس سنتز شد. جهت کامل شدن واکنش بالن را در حمام آب سرد قرار داده و آب مقطر سرد به داخل آن اضافه شد، سپس رسوب به دست آمده توسط کاغذ صافی، صاف و سپس در آون خشک گردید. ترکیب شیمیایی جهت خلص سازی بیش تر در حلال اتانول تبلور مجدد یافت. ساختار این ترکیب توسط طیف‌های FT-IR (Fourier transform infrared؛ نمودار ۱)، ¹H-NMR (نمودار ۲) و ¹³C-NMR (نمودار ۳) با استفاده از TMS:



نمودار ۱- طیف FT-IR ترکیب (SZ). FT-IR (KBr, Cm-1) v max: 3390 (NH); 3302 (NH₂); 3168 (ArCH); 2923-2956 (Alkyl CH); 2186 (CN); 1645, 1597 (Ar C=C).

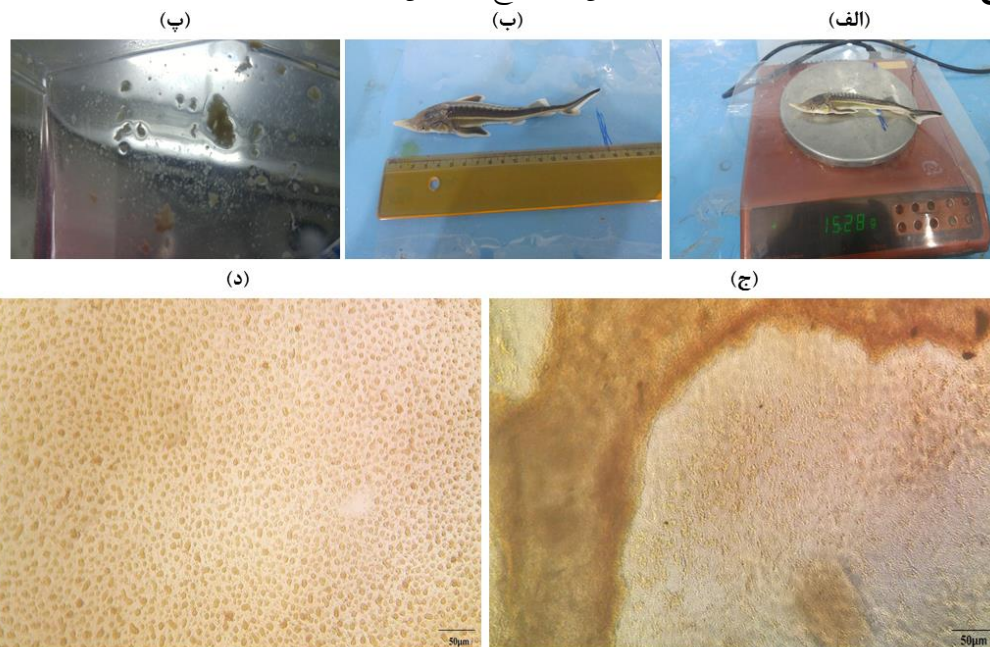


نمودار ۳- طیف ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): d (ppm) 10.18, 36.42, 57.67, 98.18, 121.28, 128.12, 136.07, 143.24, (SZ). 155.18, 129.01, 161.30.



نمودار ۲- طیف H-NMR ترکیب ۲.SZ. δ (PPM): 1.75 (s, 6H, CH₃), 4.58 (s, 2H, CH), 6.87 (s, 4H, NH₂), 7.12 (s, 4H, ArH), 12.1 (s, NH).

۲- استخراج سلول‌های کبد از گونه استرلیاد: مراحل استخراج در شکل ۸ نشان داده شده است.



شکل ۸- الف و ب) یک قطعه تاس ماهی ایرانی گونه استرلیاد پرورشی به وزن ۱۵/۲۸ گرم و اندازه تقریباً ۱۸ سانتی‌متر برای این مطالعه استفاده شد. پ) بافت کبد تکه تکه شده در فلاسک کشت سلولی T25 حاوی ۲۰٪ FBS. ج) سلول‌های کبد در حال جدا شدن از بافت کبد روز پنجم. د) سلول‌های کاملاً یک‌دست با مورفولوژی گرد و چسبیده به کف فلاسک روز پانزدهم. تصاویر با میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی ۲۰× تهیه شده است.

منابع

- 1- Adam, A. M. A. (2019). An *in vitro* study of amygdalin alone and complexed with Se (IV), Au (III), Ru (III), and V (III) ions: Structure, morphology, and pharmacology. *Journal of Molecular Structure*, 1195, 43-57. doi: 10.1016/j.molstruc.2019.05.097.
- 2- Akbary Moghaddam, V., Kasmaeifar, V., Mahmoodi, Z., Ghafouri, H., Saberi, O., & Mohammadi, A. (2021). A Novel Sulfamethoxazole Derivative as an Inhibitory Agent against HSP70: A Combination of Computational with *in vitro* Studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 194-205. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.128.
- 3- Alfonso, S., Gesto, M., & Sadoul, B. (2021). Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. *Journal of Fish Biology*, 98 (6), 1496-1508. doi: 10.1111/jfb.14599.
- 4- Alfonso, S., Houdelet, C., Bessa, E., Geffroy, B., & Sadoul, B. (2023). Water temperature explains part of the variation in basal plasma cortisol level within and between fish species. *Journal of Fish Biology*. doi: 10.1111/jfb.15342.
- 5- Baharloei, M., Heidari, B., Zamani, H., Ghafouri, H., & Hadavi, M. (2021). Effects of heat shock protein inducer on Hsp70 gene expression and immune parameters during *Streptococcus iniae* infection in a Persian sturgeon fry. In *Veterinary Research Forum*, 12 (4):473-79. doi: 10.30466/vrf.2019.115181.2740.
- 6- Baharloei, M., Heidari, B., Zamani, H., & Hadavi, M. (2020). Effects of Pro-TeX[®] on the expression of Hsp70 gene and immune response parameters in the Persian sturgeon fingerlings, *Acipenser persicus*, infected with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Ichthyology*, 36 (4), 393-401. doi: 10.1111/jai.14045.
- 7- Baldissera, M. D., Souza, C. F., Barroso, D. C., Falk, R. B., Wagner, R., Baldisserotto, B., & Val, A. L. (2020). Disturbance of oxidant/antioxidant status and impairment on fillet fatty acid profiles in *Brycon amazonicus* subjected to acute heat stress. *Fish physiology and biochemistry*, 46, 1857-1866. doi: 10.1007/s10695-020-00835-3.
- 8- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A. R., & Ahmadi, K. (2013). Biochemical and histological changes in the liver tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sub-lethal concentrations of diazinon. *Fish physiology and biochemistry*, 39, 489-501. doi: 10.1007/s10695-012-9714-1.
- 9- Baruah, K., Norouzitallab, P., Linayati, L., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2014). Reactive oxygen species generated by a heat shock protein (Hsp) inducing product contributes to Hsp70 production and Hsp70-mediated protective immunity in *Artemia franciscana* against pathogenic vibrios. *Developmental & Comparative Immunology*, 46 (2), 470-479. doi: 10.1016/j.dci.2014.06.004.
- 10- Barulin, N. V. (2015). Serum enzyme response of captive sturgeon brookstock *Acipenser baerii* Brandt 1869 females and two hybrids (bester=female *Huso huso* Linnaeus, 1758 × male *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758, and RsSs=A. *gueldenstaedtii* Brandt 1833 × A. *baerii* Brandt 1869) to hormonal stimulation for spawning induction. *Journal of applied ichthyology*, 31, 2-6. doi: 10.1111/jai.12898.
- 11- Basu, N., Nakano, T., Grau, E. G., & Iwama, G. K. (2001). The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *General and comparative endocrinology*, 124 (1), 97-105. doi: 10.1006/gcen.2001.7688.
- 12- Bolarinwa, I. F., Orfila, C., & Morgan, M. R. (2014). Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK. *Food chemistry*, 152, 133-139. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.002.
- 13- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72 (1-2), 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- 14- Brough, P. A., Barril, X., Beswick, M., Dymock, B. W., Drysdale, M. J., Wright, L., & Workman, P. (2005). 3-(5-Chloro-2, 4-dihydroxyphenyl)-pyrazole-4-carboxamides as inhibitors of the Hsp90 molecular chaperone. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 15 (23), 5197-5201. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.08.091.
- 15- Butler, M. (2004). *Animal cell culture and technology*. Taylor & Francis.
- 16- Chen, Y., Liu, E., Li, C., Pan, C., Zhao, X., Wang, Y., & Ling, Q. (2021). Effects of heat stress on histopathology, antioxidant enzymes, and transcriptomic profiles in gills of pikeperch

- Sander lucioperca*. *Aquaculture*, 534, 736277. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736277.
- 17- Cheng, C. H., Guo, Z. X., Luo, S. W., & Wang, A. L. (2018). Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 150, 190-198. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.045.
- 18- Dagoudo, M., Mutebi, E. T., Qiang, J., Tao, Y. F., Zhu, H. J., Ngoepe, T. K., & Xu, P. (2023). Effects of acute heat stress on haemato-biochemical parameters, oxidative resistance ability, and immune responses of hybrid yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* × *P. vachelli*) juveniles. *Veterinary Research Communications*, 1-13. doi: 10.1007/s11259-022-10062-1.
- 19- Damania, R., & Bulte, E. H. (2001). The Economics of Captive Breeding and Endangered Species Conservation. doi: 10.1016/j.ecolecon.2006.07.007.
- 20- Fischer, M., Belanger, S. E., Berckmans, P., Bernhard, M. J., Bláha, L., Coman Schmid, D. E., ... & Schirmer, K. (2019). Repeatability and reproducibility of the RTgill-W1 cell line assay for predicting fish acute toxicity. *Toxicological Sciences*, 169 (2), 353-364. doi: 10.1093/toxsci/kfz057.
- 21- Føre, M., Frank, K., Norton, T., Svendsen, E., Alfredsen, J. A., Dempster, T., ... & Berckmans, D. (2018). Precision fish farming: A new framework to improve production in aquaculture. *biosystems engineering*, 173, 176-193. doi: 10.1016/j.biosystemseng.2017.10.014.
- 22- Goikoetxea, A., Sadoul, B., Blondeau-Bidet, E., Aerts, J., Blanc, M. O., Parrinello, H., ... & Geffroy, B. (2021). Genetic pathways underpinning hormonal stress responses in fish exposed to short-and long-term warm ocean temperatures. *Ecological Indicators*, 120, 106937. doi: 10.1016/j.ecolind.2020.106937.
- 23- Grecu, I., Docan, A., Dediu, L., Antache, A., Crețu, M., & Maereanu, M. (2019). Haematological response of *Acipenser stellatus* juveniles in cold shock stress. *stress*, 27, 1-718.
- 24- Hasanzadeh, F., Ghafouri, H., Ahmadi, S., Zarei, S., Aghamaali, M. R., & Mohammadi, A. (2021). Inhibition of NF-κB Expression in LPS-Induced RAW264. 7 Macrophage Cells by a Thiazolidinone Derivative (TZD-OCH2 CH3). *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*, 9 (2), 48-53. doi: 10.34172/ajmb.2021.09.
- 25- Iwama, G. K., Thomas, P. T., Forsyth, R. B., & Vijayan, M. M. (1998). Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8, 35-56. doi: 10.1023/A:1008812500650.
- 26- Jahangirzadeh, Z., Ghafouri, H., Sajedi, R. H., Sarikhani, S., Taghdir, M., & Sariri, R. (2018). Molecular cloning, prokaryotic expression, purification, structural studies and functional implications of Heat Shock Protein 70 (Hsp70) from *Rutilus frisii kutum*. *International journal of biological macromolecules*, 108, 798-807. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.174.
- 27- Jamalzadeh, L., GHAFoori, H., Sariri, R., Rabuti, H., Nasirzade, J., Hasani, H., & Aghamaali, M. R. (2016). Cytotoxic effects of some common organic solvents on MCF-7, RAW-264.7 and human umbilical vein endothelial cells. doi: 10.17795/ajmb-33453.
- 28- Kim, J. H., Jeong, E. H., Jeon, Y. H., Kim, S. K., & Hur, Y. B. (2021). Salinity-mediated changes in hematological parameters, stress, antioxidant responses, and acetylcholinesterase of juvenile olive flounders (*Paralichthys olivaceus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 83, 103597. doi: 10.1016/j.etap.2021.103597.
- 29- Kim, J. H., Kim, S. K., & Hur, Y. B. (2019). Temperature-mediated changes in stress responses, acetylcholinesterase, and immune responses of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* in a bio-floc environment. *Aquaculture*, 506, 453-458. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.03.045.
- 30- Kumar, S., Moniruzzaman, M., Chakraborty, A., Sarbajna, A., & Chakraborty, S. B. (2021). Crosstalk between heat shock proteins, NRF2, NF-κB and different endogenous antioxidants during lead-induced hepatotoxicity in *Puntius ticto*. *Aquatic Toxicology*, 233, 105771. doi: 10.1016/j.aquatox.2021.105771.
- 31- Lakra, W. S., Swaminathan, T. R., & Joy, K. P. (2011). Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review. *Fish physiology and biochemistry*, 37, 1-20. doi: 10.1007/s10695-010-9411-x.
- 32- Leroy, S. A., Lahijani, H. A., Crétaux, J. F., Aladin, N. V., & Plotnikov, I. S. (2020). Past and current changes in the largest lake of the world: The Caspian Sea. *Large asian lakes in a changing world: Natural state and human impact*, 65-107. doi: 10.1007/978-3-030-42254-7_3.
- 33- Long, L., Zhang, H., Ni, Q., Liu, H., Wu, F., &

- Wang, X. (2019). Effects of stocking density on growth, stress, and immune responses of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in a recirculating aquaculture system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 219, 25-34. doi: 10.1016/j.cbpc.2019.02.002.
- 34- Mahanty, A., Mohanty, S., & Mohanty, B. P. (2017). Dietary supplementation of curcumin augments heat stress tolerance through upregulation of nrf-2-mediated antioxidative enzymes and hsp in *Puntius sophore*. *Fish physiology and biochemistry*, 43, 1131-1141. doi: 10.1007/s10695-017-0358-z.
- 35- Mandal, P., Cai, L., Tu, Z., Johnson, D., & Huang, Y. (2016). Effects of acute temperature change on the metabolism and swimming ability of juvenile sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*, Linnaeus 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 32 (2), 267-271. doi: 10.1111/jai.13033.
- 36- Mohanty, B. P., Mahanty, A., Mitra, T., Parija, S. C., & Mohanty, S. (2018). Heat shock proteins in stress in teleosts. Regulation of heat shock protein responses, 71-94. doi: 10.1007/978-3-319-74715-6_4.
- 37- Otaka, M., Yamamoto, S., Ogasawara, K., Takaoka, Y., Noguchi, S., Miyazaki, T., ... & Itoh, H. (2007). The induction mechanism of the molecular chaperone HSP70 in the gastric mucosa by Geranylgeranylacetone (HSP-inducer). *Biochemical and biophysical research communications*, 353 (2), 399-404. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.031.
- 38- Pelusio, N. F., Scicchitano, D., Parma, L., Dondi, F., Brini, E., D'Amico, F., ... & Bonaldo, A. (2021). Interaction between dietary lipid level and seasonal temperature changes in gilthead sea bream *Sparus aurata*: effects on growth, fat deposition, plasma biochemistry, digestive enzyme activity, and gut bacterial community. *Frontiers in Marine Science*, 8, 664701. doi: 10.3389/fmars.2021.664701.
- 39- Pirali, M., Taheri, M., Zarei, S., Majidi, M., & Ghafouri, H. (2020). Artesunate, as a HSP70 ATPase activity inhibitor, induces apoptosis in breast cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3369-3375. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.198.
- 40- Prokopchuk, G., Dzyuba, B., Rodina, M., & Cosson, J. (2016). Control of sturgeon sperm motility: Antagonism between K⁺ ions concentration and osmolality. *Animal reproduction science*, 164, 82-89. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.11.015.
- 41- Shahriyari-Nejad, H., Pourmohsen, N., Ghafouri, H., Zareie, S., Sharifi, R., & Mahmoodi, N. (2020). Synthesis of Pirano-Based Piranazole-based Compounds to Induce Apoptosis by Reducing the Expression of Anti-Apoptotic Protein B2 Cell Lymphoma Protein in the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Category. *Armaghane Danesh*, 25(1), 40-54. doi: 10.52547/armaghanj.25.1.40.
- 42- Singh, S. P., Ahmad, T., Sharma, J., & Chakrabarti, R. (2021). Effect of temperature on food consumption, immune system, antioxidant enzymes, and heat shock protein 70 of *Channa punctata*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 47, 79-91. doi: 10.1007/s10695-020-00896-4.
- 43- Stapp, L. S., Kreiss, C. M., Pörtner, H. O., & Lannig, G. (2015). Differential impacts of elevated CO₂ and acidosis on the energy budget of gill and liver cells from Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 187, 160-167. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.05.009.
- 44- Tarazi, S., Ahmadi, S., Ostvar, N., Ghafouri, H., Sarikhan, S., Mahmoodi, Z., & Sariri, R. (2021). Enhanced soluble expression of glutathione S-transferase Mu from *Rutilus kutum* by co-expression with Hsp70 and introducing a novel inhibitor for its activity. *Process Biochemistry*, 111, 261-266. doi: 10.1016/j.procbio.2021.10.003.
- 45- Vahdani, F., Ghafouri, H., Sarikhan, S., & Khodarahmi, R. (2019). Molecular cloning, expression, and functional characterization of 70-kDa heat shock protein, DnaK, from *Bacillus halodurans*. *International journal of biological macromolecules*, 137, 151-159. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.217.
- 46- Vahdatiraad, L., Heidari, B., Zarei, S., Sohrabi, T., & Ghafouri, H. (2023). Biological responses of stellate sturgeon fingerlings (*Acipenser stellatus*) immersed in HSP inducer to salinity changes. *Marine Environmental Research*, 191, 106145. doi: 10.1016/j.marenvres.2023.106145.
- 47- Vavrek, M. J., Murray, A. M., & Bell, P. R. (2014). An early Late Cretaceous (Cenomanian) sturgeon (Acipenseriformes) from the Dunvegan Formation, northwestern Alberta, Canada. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 51 (7), 677-681. doi: 10.1139/cjes-2014-0052.
- 48- Wegner, A., Ostaszewska, T., & Rożek, W. (2009). The ontogenetic development of the digestive tract and accessory glands of sterlet

- (*Acipenser ruthenus* L.) larvae during endogenous feeding. *Reviews in fish biology and fisheries*, 19, 431-444. doi: 10.1007/s11160-009-9111-8.
- 49- Yazdanpanah Dero, Q., Yari, E., & Charrahy, Z. (2020). Global warming, environmental security and its geo-economic dimensions case study: Caspian Sea level changes on the balance of transit channels. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18, 541-557. doi: 10.1007/s40201-020-00481-0.
- 50- Zakerinejad, R., Movahedi, S., & Jahanian, E. (2022). Investigation of Sea Surface Temperature Changes in the Oman Sea and the Persian Gulf Using Satellite Images and Its Comparison with the Caspian Sea Spatial Planning Trend. *Trend.*, 12 (4), 65-80. doi: 10.22108/sppl.2023.134287.1665.
- 51- Zarei, S., Ghafouri, H., Vahdatiraad, L., Moghaddam, V. A., Sohrabi, T., & Heidari, B. (2023). Using Heat Shock Protein (HSP) Inducers as an Approach to Increase the Viability of Sterlet (*Pisces; Acipenseridae; Acipenser ruthenus*) Cells against Environmental Diazinon Toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, 133194. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.133194.

Changes in Cortisol and Biochemical Enzymes in Liver Cells of Sterlet Sturgeon (*Acipenser ruthenus*) under Temperature Stress in the Presence of HSP Inducers

Zarei S.¹, Ghafouri H.^{1,2*}, Vahdatiraad L.², Sohrabi T.³ and Heidari B.^{1,2*}

¹ Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

² Dept. of Marine Sciences, the Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

³ International Sturgeon Research Institute, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Organization (AREEO), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Cortisol is one of the most significant factors contributing to controlling stress. Additionally, another well-known mechanism for protecting cells against various stresses and linked to cortisol is the reaction to heat shock, which triggers the production of heat shock proteins (HSP). By strengthening sturgeon fish's defense system against environmental stress, such as temperature stress, their stocks can be preserved. In this study, sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*) liver tissue cells were extracted and cultured in flasks. Nopal Endurance (Pro-TEX[®]), amygdalin, and pyrazole derivatives (SZ) were used as HSP inducers (HSPi). In order to determine the viability and optimal dose, MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay was performed. The activity of cortisol and biochemical enzymes was analyzed in liver cells under temperature stress (18, 22, and 26 °C) in the presence and absence of HSPi compounds. MTT assay showed that cells receiving HSPi compounds increased survival. They could increase cortisol levels alone or in combination with stress. Amygdalin reduced biochemical enzyme activity. Escape from apoptosis under stress conditions is a basic strategy for cell survival. Considering the role of cortisol and its relationship with HSP in environmental stress conditions, it can be concluded that treating cells with HSPi compounds can make cells resistant to stress and the harmful effects caused by stress reverse and ultimately increase survival.

Key words: Apoptosis, Amygdalin, Cell Stress, Heat Shock Protein, Sturgeon