



Primary Fish Cell Culture Phase 1: primary cell culture of the interior pituitary gland of the *Acipenser gueldenstaedtii*

Item Type	Report
Authors	Ghoroghi, Ahmad; Pourgholam, R.; Hashemzade, M.; Rezvani, S.; Taheri, M.; Mehrabi, M.R.; Soltani, M.; Schelkonov, Igor
Publisher	Iranian Fisheries Science Research Institute
Download date	11/12/2023 13:20:49
Link to Item	http://hdl.handle.net/1834/14077

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
 مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

عنوان :

طرح جامع کشت تیره های یاخته های آبزیان
(فاز اول: کشت سلولی قسمت قدامی هیپوفیز
ماهی چالباش (*Acipenser gueldenstaedtii*)

مجری :
احمد غرقی

شماره ثبت
۸۸/۹۳

وزارت جهاد کشاورزی □
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
 مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

- عنوان پژوهش/ طرح جامع کشت تیره‌های یاخته‌های آبزیان (فاز اول: کشت سلولی قسمت قدامی هیپوفیزماهی چالباش *(Acipenser gueldenstaedti)* شماره مصوب: ۱۹-۰۷۱۰۴۳۶۰۰۰-۸۲-
 - نام و نام خانوادگی نگارنده / نگارنده گان: احمد غرقی
 - نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پژوهه‌ها و طریقه‌ای ملی و مشترک دارد): -
 - نام و نام خانوادگی مجری / مجریان: احمد غرقی
 - نام و نام خانوادگی همکاران: رضا پورغلام- مرتضی هاشم زاده- سهراب رضوانی- محمد طاهری- محمدرضا مهرابی- مهدی سلطانی- دکتر دلیری- Igor schelkonov
 - نام و نام خانوادگی مشاور (ان): -
 - محل اجرا: استان تهران
 - تاریخ شروع: ۱۳۸۲/۷/۱
 - مدت اجرا: ۴ سال و ۲ ماه
 - ناشر: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران
 - شماره گان (تیتر اثر): ۱۵ نسخه
 - تاریخ انتشار: سال ۱۳۸۸
- حق چاپ برای مؤلف محفوظ است. نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلا مانع است.

**MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION**

Title:

**Primary Fish Cell Culture
Phase 1: primary cell culture of the interior
pituitary gland of the *Acipenser gueldenstaedtii***

Executor :

Ahmad Ghoroghi

**Registration Number
2009.93**

پایه زن



طرح / پروژه : طرح جامع کشت تیره های یاخته های آبزیان (فاز اول کشت

سلولی قسمت قدامی هیپوفیزماهی چالباش (*Acipenser gueldenaedtii*)

کد مصوب: ۱۹-۰۷۱۰۴۳۶۰۰۰-۸۲

با مسؤولیت اجرایی: احمد غرقی^۱

در تاریخ ۱۳۸۷/۱۲/۷ در کمیته علمی فنی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران مورد

معاون تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران تأیید قرار گرفت.

- آقای احمد غرقی متولد سال ۱۳۳۰ در شهرستان درود بوده و دارای مدرک تحصیلی دکترا در رشته

دامپزشکی می باشد و در زمان اجرای پروژه / طرح : طرح جامع کشت تیره های یاخته های آبزیان (فاز اول

کشت سلولی قسمت قدامی هیپوفیزماهی چالباش (*Acipenser gueldenaedtii*)

ایستگاه □

مرکز □

پژوهشکده □

در ستاد ■

با سمت رئیس بخش زیست فن آوری و فرآوری آبزیان مشغول فعالیت بوده است.



به نام خدا

عنوان	فهرست مندرجات «	صفحة
چکیده		۱
۱- مقدمه		۲
۲- مواد و روشها		۱۳
۳- نتایج		۲۲
۴- بحث و نتیجه گیری		۲۹
پیشنهادها		۷۲
منابع		۷۴
چکیده انگلیسی		۷۶

چکیده

کشت سلولی یکی از مهمترین ابزارهای بیولوژیک محسوب می‌گردد و کاربردهای بسیاری در بررسی‌های ژنتیک مولکولی ایفا می‌کند و گام اول در زمینه ایجاد بانک سلولی محسوب می‌شود، که امروزه یکی از مهمترین ابزارهای مطلوب نگهداری ذخایر ژنتیکی آبزیان است و در حفظ تنوع زیستی آنان به عنوان سرمایه‌های ملی کاربرد دارد. به این منظور در این تحقیق برای اولین بار در کشور کشت سلول بافت هیپوفیزی چالباش از ماهیان با ارزش خاویاری را مورد بررسی و تحقیق قرار دادیم. پس از استخراج غده هیپوفیز ماهی چالباش، در شرایط استریل، بافت هیپوفیزی کاملاً تکه تکه گردید و سپس به منظور کشت اولیه، آن‌ها به محیط کشت سلولی حاوی DMEM + گلوتامین (glutamine) + کربنات سدیم (sodium bicarbonate) و سرم جنین گوساله اضافه شد و به سلولهای اجازه داده شد تا سلول‌ها رشد کنند و در طول این مدت سلول‌ها را تحت نظر قرار داده و میزان و سرعت رشد آن‌ها بررسی گردید.

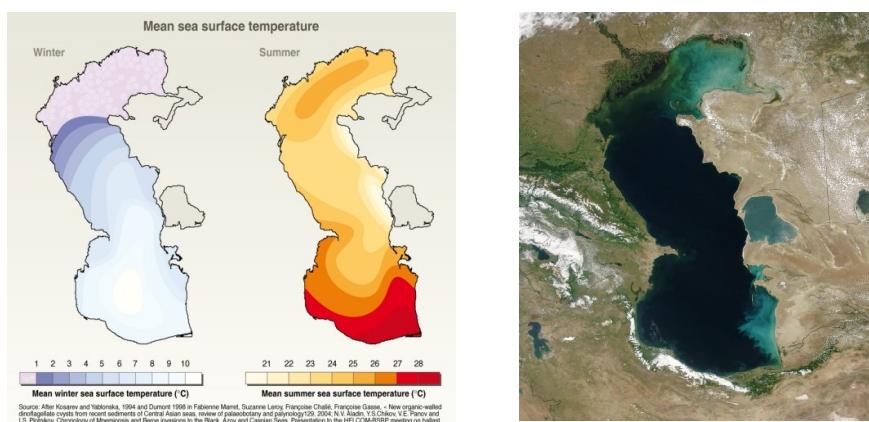
نتایج آزمایش‌ها حاکی از آن بودند که هرچند سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش در انکوباتور دی‌اکسید کربن با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بودند اما خود را با محیط سازگار نموده و از روز دهم وارد فاز رشد شدند. سلول‌های مورد نظر تا روز بیست و دوم به رشد و تکثیر خود با سرعت رشد نوسانی ادامه داده و تا روز بیست و هشتم در فاز ثابت مانده و هیچ گونه رشد و تکثیر را انجام نداده‌اند و از آن پس تا روز چهلم فاز مرگ را سپری گردند و تمام سلول‌ها از بین رفتند و موفق به تولید هورمون رشد در محیط کشت مصنوعی نشده‌است.

با توجه به رشد و ماندگاری سلول‌ها در این دوران می‌توان نتیجه گرفت که در شرایط مناسب و با پاساژدهی حداقل هر دوهفته یکبار می‌توان سلول‌ها را تا زمان طولانی کشت داده و از آن‌ها سلول‌های رده پیوسته را استخراج نموده و در زمینه بانک سلولی آبزیان با امکانات بیشتر قدم نهاد.

۱- مقدمه

الف) دریای خزر

دریای خزر یا دریای مازندران از شمال به روسیه، از جنوب به ایران، از غرب به جمهوری آذربایجان و از شرق به جمهوری های ترکمنستان و قزاقستان محدود می شود. وسعت دریای خزر حدود ۴۳۶۰۰۰ کیلومتر مربع، ۱۲۰۰ کیلومتر طول و ۲۲۰ تا ۵۵ کیلومتر پهنا، و حجم آب آن افرون بر ۷۷۰۰۰ کیلومتر مکعب است. عمق آن از شمال به جنوب افزایش می یابد. میانگین ژرفای این دریاچه در ناحیه شمالی کمتر از ۱۰ متر، در بخش میانی بین ۱۸۰ تا ۷۸۸ متر و در بخش جنوبی که آبهای کناره ایران را تشکیل می دهد به ۹۶۰ تا ۱۰۰۰ متر می رسد، ژرفای ۱۰۲۵ متری نیز در ناحیه جنوبی این دریاچه گزارش شده است (Van der Hemkaran, ۱۹۹۰). جهت جریان آب این دریاچه از سمت شمال غربی به جنوب شرقی است، همین ویژگی و ژرفای زیاد آب در کرانه های ایران که باعث کندی حرکت جریان می شود (Van der Hemkaran, ۱۹۹۰). این دریا، محیط زیست ایران به میزانی بیش از کرانه های دیگر کشورها می شود (Van der Hemkaran, ۱۹۹۰). این دریا، گرانبهاترین ماهی های دنیا است. در بخش جنوبی دریای مازندران و رودخانه هایی که به آن می رینند یعنی سواحل مربوط به ایران، ۷۸ گونه و زیر گونه ماهی یافت می شود. دریای مازندران یکی از بی همتاترین اکو سیستم های آبی جهان است که محیطی مناسب برای زندگی و رشد مرغوب ترین ماهی های خاویاری جهان گردیده است (حسینی، ۱۳۷۷).



شکل ۱. دریای خزر(a) و میانگین دمای سالانه(b).

ب) ماهیان خاویاری

ماهیان خاویاری یا استورژن (Sturgeon) ، از خانواده تاس‌ماهیان، از جمله گونه‌های آبزی کم نظری هستند که قدمتی چند صد میلیون ساله دارند و به عصر ژوراسیک باز می‌گردد. از این رو ماهیان خاویاری را فسیل‌های زنده جهان می‌نامند که همراه با تکامل فیلوژنی تابه امروز باز مانده‌اند (Dettlaff و همکاران، ۱۹۹۳). این ماهیان به ۲۷ گونه و زیر‌گونه در جهان تقسیم می‌شوند که از این تعداد ۵ گونه؛ فیل ماهی، قره برون یا ماهی خاویاری ایرانی، ماهی خاویاری چالباش یا روسی، ماهی شیپ و ماهی ازوون برون در دریای خزر زندگی می‌کنند (قربانی، ۱۳۷۹).

فیل ماهی با نام علمی *Huso huso* بزرگ‌ترین ماهی آب‌های داخلی ایران است که از نقطه نظر کیفیت خاویار رتبه اول را به خود اختصاص داده است. نام دیگر آن بلوگا (Bluga) است و نمونه‌هایی از آن با وزنی در حدود ۱۴۰۰ کیلوگرم و سنی بیش از ۱۰۰ سال صید شده است. هر ۲ یا ۳ سال یک بار تخم ریزی می‌کند و بین ۱۴ و ۱۷ سالگی بالغ می‌شود و به واسطه بهترین خاویار، رتبه گرانترین ماهی و خاویار جهان را دارد. قامتی معادل یک و نیم تا بیش از چهار متر دارد، رکورد صید آن در ایران ۶۲۰ کیلوگرم بوده است (Doroshov و همکاران ۱۹۸۸).



شکل ۲. فیل‌ماهی.

قره برون یا تاس‌ماهی ایران با نام علمی *Acipenser persicus* در حال حاضر گونه‌ای مستقل محسوب می‌شود، اما پیش‌تر آن را زیر‌گونه‌ای از ماهی روس می‌دانستند. «قره برون» به معنای «بنی سیاه» است که از رتبه دوم

ارزش اقتصادی بر خوردار است. در حال حاضر به دلیل تکثیر مصنوعی از نظر تعداد، از گونه‌ی روسی پیشی گرفته است. زیرا از گونه روسی بزرگ‌تر است و خاویاری آن نیز کیفیت بهتری دارد. از نظر ظاهری تا حدودی شبیه به هم می‌باشد گرچه رنگی تیره‌تر همراه با رنگ دانه‌های سفید دارد که تابینی ادامه پیدا کرده همین خصوصیت آن را از نظر ظاهری از تاس ماهی روس جدا می‌کند (آذری، ۱۳۷۶). وزنی معادل ۶۰ تا ۱۳۰ کیلوگرم دارد و طولی معادل ۱ تا بیش از ۲ متر که در فاصله ۱۲ تا ۱۶ سالگی بالغ می‌گردد (Dettlaf و همکاران، ۱۹۹۳).



شکل ۳. قره‌برون

TAS ماهی روس یا چالباش با نام علمی *Acipenser gueldenstaedti* در زمرة گونه‌هایی است که در تمام نقاط دریای خزر یافت می‌شود و خاویار آن را نیز از رتبه سوم بر خوردار است و در فاصله ۱۲ تا ۱۶ سالگی به سن تخم دهی میرسد و بالغ می‌شود. طول آن معادل ۱ تا ۲ متر و وزنش به ۶۰ تا ۱۰۰ کیلوگرم می‌رسد (قربانی، ۱۳۷۹).



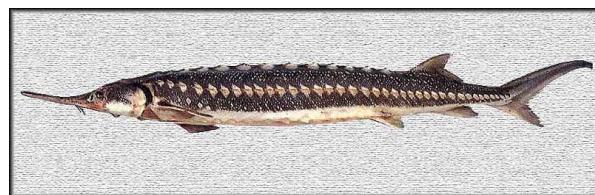
شکل ۴. چالباش

ماهی خاویار شیپ با نام علمی *Acipenser nudiventris* معمولاً ماهی مهاجری است که برای تخم‌ریزی به سواحل ایران می‌آید و در رودخانه‌های آبریز دریای خزر تخمگذاری می‌کند. طول عمر آن به ۳۰ سال می‌رسد. از نقطه ارزش اقتصادی در رتبه چهارم قرار دارد. با طولی بیش از ۱ متر و وزنی سبک، در فاصله ۱۰ تا ۱۴ سالگی بالغ می‌گردد و تخم‌ریزی می‌کند (آذری، ۱۳۷۶).



شکل ۵. شیپ

ماهی اوzon برون (دراکول) کوچک‌ترین ماهی خاویار دریای خزر می‌باشد که در ایران به اشتباہ همه ماهیان خاویاری را به نام اوzon برون می‌شناسند. از نظر کیفی در رتبه آخر قرار دارد زیرا خاویارش ریزتر و است. از نظر تکثیر مصنوعی با مشکلاتی مواجه است و تعداد آن نیز در شرایط طبیعی رو به کاهش می‌رود. در فاصله سینه ۸ تا ۱۲ سالگی بالغ می‌شود. طول آن ۱ تا ۱,۵ متر و وزنی سبک‌تر در قیاس با دیگر ماهیان این خانواده در دریای خزر دارد (آذری، ۱۳۷۶).



شکل ۶. اوzon برون

تکثیر این ماهیان با ارزش در دنیا قدمت ۱۳۰ ساله دارد. در سال ۱۹۹۶ یک گروه از دانشمندان آمریکایی از جمله دروشوف و ون اینتم روى تاسماهى آتلانتيک آزمایش‌های را انجام دادند و میزان رسیدگى آن را در قسمتهای مختلف رودخانه هادسون بررسی کردند و در کنار این مسئله روابط مورفوفیزیولوژیک بین پارامترهای مختلف از جمله طول، وزن، هم آوری و قطر اووسیت را در این گونه مورد بررسی قرار دادن و در ضمن این پژوهش فراوانی مولدین نر و ماده تاسماهى آتلانتيک را نیز مورد بررسی قرار دادند. همچنین در سال ۱۹۹۸ روی تاثیر سن و اندازه بدن روی تکامل گنادهای تاسماهى آتلانتيک تحقیقاتی انجام دادند و به نتایجی رسیدند از جمله اینکه هم آوری مطلق و قطر اووسیتها با افزایش سن و اندازه بدن افزایش می یابد البته این افزایش در مورد قطر اووسیت مطلق نیست و در سنین بالا قطر اووسیت کاهش می یابد (Dettlaf و همکاران، ۱۹۹۳).

اولین بار تکثیر این ماهیان در ایران در سال ۱۳۷۹ انجام گرفته است. حامدی در سال ۱۳۷۹ بر نقش فاکتورهای طول و وزن و شاخص قطبیت جنسی در تکثیر تاس ماهی ایران مطالعاتی را انجام داد. نتیجه این مطالعات نشان داد که عوامل طول و وزن مولدین نقشی در درصد لقادح تخمها و مدت زمان رسیدگی جنسی آنها ندارند و همچنین بالاترین درصد لقادح را در محدوده شاخص قطبیت جنسی ۶-۸ اعلام کرد (حامدی، ۱۳۷۹).

طبق نظر دتلاف و گینزبورگ در سال ۱۹۹۳ بهترین درصد لقادح تخمها در شاخص قطبیت جنسی کمتر از ۸ دیده می شود. همچنین ایشان در مطالعات خود رابطه‌ای منطقی بین شاخص قطبیت جنسی و درصد لقادح تخمها و همچنین بین شاخص قطبیت جنسی و مدت زمان رسیدگی مولدین مشاهده کردند ولی رابطه‌ای بین شاخص قطبیت جنسی با کلاسهای طولی و وزنی مشاهده نکردند.

از بین ۵ گونه موجود دریای خزر تاسماهی ایران به علت بومی بودن آن، در برنامه بازسازی ذخایر ایران جایگاه ویژه‌ای دارد و در حال حاضر حدود ۸۰ درصد تکثیر و رهاسازی ماهیان خاویاری را این گونه تشکیل می‌دهد. این مسئله اهمیت مطالعه نرماتیوهای تکثیر این گونه را روشن می‌کند با توجه به اینکه جمعیتهای مختلفی از این گونه در حوضه جنوبی خزر زندگی می‌کنند نرماتیوهای تکثیر در هر منطقه تحت تاثیر آب و هوای منطقه تخریزی آنهاست بنابراین مطالعه کشت سلول‌های قسمت قدامی هیپوفیز ماهی خاویاری و تولید هورمون رشد این نرماتیوها ضروری به نظر میرسد. همچنین تاکنون کار مدون و علمی راجع به تغییرات این پارامترها با توجه به سن مولدین صورت نگرفته است. مطمئناً با توجه به اختلافات فیزیولوژیک در سنین مختلف این گونه،

در صدھای لقاح و سایر نرماتیوهای تکثیر در آنها مختلف خواهد بود و تکثیر مولدین با درصد لقاح پایین علاوه بر اتلاف منابع ارزی کشور، ضربه به ذخایر این گونه در دریای خزر خواهد بود(حامدی، ۱۳۷۹).

فیزیولوژی هورمون رشد در ماهیان

تولید مثل در ماهیها بوسیله ای فرآیندهای درونزا کنترل می گردد. این فرآیندهای داخلی از طریق عوامل محیطی از قبیل نور، دما و عوامل غذایی تحریک می شوند. در مناطق معتدل تغییرات فصلی طول روز عامل مهم در آغاز رسیدگی غدد جنسی می باشد. در نتیجه ای این هماهنگی فصلی، تولید نوزادان در فصلی انجام می پذیرد که شرایط تغذیه ای لاروها در بهترین حالت قرار دارد. چرخه ای تولید مثلی اساساً بوسیله هورمون کنترل و تنظیم می گردد. این کنترل اصطلاحاً توسط محور مغز-هیپوفیز-غدد جنسی صورت می پذیرد(ستاری، ۱۳۸۴).

نور از طریق چشم ها و غده ای پینه آل یا غده ای صنوبری که در بالاترین قسمت مغز جلویی قرار دارد، بر فرآیندهای داخلی ماهی تاثیر می گذارد. غده ای صنوبری ملاتونین را ترشح می کند. سطح ترشحی ملاتونین به سطح نور موجود در محیط بستگی دارد. بطوريکه بيشترین تولید ملاتونین در تاریکی انجام می گيرد. ماهیهايی که در مناطق معتدل به سر می برنند، معمولاً به تغییرات طول روز (و ماهیهاي گرمسيري به سيكل گردش ماه) حساس می باشند. در نتیجه ای تغییرات فصلی در تولید ملاتونین به همراه ریتم های درونزای ماهی، تولید هورمون آزاد کننده ای گنادوتروپین (GnRH) در هیپوتالاموس تحریک می گردد(Pavlov و همکاران، ۲۰۰۷). تاکنون هفت نوع هورمون آزاد کننده ای گنادوتروپین در مهره داران شناسایی گردیده که تا به امروز دو نوع از اين هورمون در ماهیان استخوانی عالي مورد شناسایی قرار گرفته است GnRH-II. جوجه (cGnRH-II) و GnRH آزاد ماهیان (sGnRH) در مغز تعدادی از ماهیان استخوانی از قبیل ماهی طلايی، قزل آلای رنگين کمان، آزاد ماهیان و سوف ماهیان دریایي وجود دارد(Kah و همکاران، ۱۹۹۳). هورمون آزاد کننده ای گنادوتروپین به غده هیپوفیز (که متصل به هیپوتالاموس می باشد) منتقل شده و سبب القای رسیدگی جنسی از طریق تحریک سلول های عصبی-ترشحی ویژه در هیپوفیز برای تولید و ترشح دو نوع هورمون گنادوتروپین :

- ۱- هورمون محرک فولیکول (GTH-I=FSH)
- ۲- هورمون محرک جسم زرد (GTH-II=LH) می گردد.

گنادوتروپین های سنتز شده در گنادوتروپ های غده‌ی هیپوفیز، به داخل چرخه‌ی خونی محیطی ترشح شده و از طریق اتصال به گیرنده‌های واقع در غدد جنسی سبب القای فرآیند استروئیدوژنر و گامتوژنر در ماهیها می‌شود.

کنترل هورمونی رشد و رسیدگی نهایی تخمک

تخمدان در ماهیان استخوانی از اووگونیا، اووسیت، سلول‌های فولیکولی محاط کننده‌ی تخمک، بافت‌های حمایتی یا استرومما و بافت عروقی و عصبی تشکیل شده است (ابراهیم زاده، ۱۳۸۲). با رشد اووسیت‌ها، سلول‌های فولیکول چند لایه می‌گردند. این لایه‌ها عبارتند از لایه سلولی دانه دار یا گرانولوزا و لایه‌ی تک. بنابراین اووسیت در مرحله‌ی زرده سازی مانند سایر مهره‌داران، دارای دو لایه‌ی سلولی اصلی—یک لایه سلولی در بیرون (لایه‌ی تک) و یک لایه سلولی داخلی (لایه‌ی گرانولوزا)—می‌باشد که بوسیله‌ی یک غشای پایه از همدیگر جدا می‌گردند. لایه‌ی تک از سلول زاینده‌ی بافت پیوندی (فیربلاست)، فیبرهای کلاژن و مویرگ و در برخی از گونه‌ها سلول‌های ویژه تشکیل شده است (Nagahama 1994)، در مرحله‌ی ابتدایی رشد تخمک‌ها در مرحله‌ی پروفاز، تقسیم میوز متوقف می‌شوند. با وجود این تخمک‌ها به رشد خود ادامه داده و در مرحله‌ی زرده سازی یا ویتلوژنر به حداقل رشد خود میرسند (ابراهیم زاده، ۱۳۸۲). مواد تشکیل دهنده‌ی زرده‌ی تخم (ویتلوژنین) در این مرحله از کبد از طریق جریان خونی وارد اووسیت می‌گردد. با توجه به اینکه گنادوتروپین باعث تحریک سنتز ۱۷-بتا-استرادیول (E) می‌شود که در حقیقت محرک سنتز ویتلوژنین کبدی است، حذب ویتلوژنین بوسیله‌ی اووسیت توسط گنادوتروپین نوع اول و احتمالاً دیگر فاکتورهای رشدی تحریک و کنترل می‌گردد (Tyler و همکاران، ۱۹۹۱) در طول رشد تخمک، پوسته‌ی تخم یا پوسته‌ی ویتلین، بین سلول‌های لایه‌ی گرانولوزا و غشاء اووسیت تشکیل می‌شود. پوسته‌ی تخم حاوی یک لایه‌ی نازک بیرونی و لایه‌ی ضخیم درونی می‌باشد (Swanson, 1994)، پروتئین‌های زنورادیاتا (Zr) از جنس گلیکوپروتئین بوده که در کبد در پاسخ به ترشح ۱۷-بتا-استرادیول (E) تولید می‌گردد (Oppen-Berntsen و همکاران، ۱۹۹۲).

در تعداد زیادی از ماهیان استخوانی عالی، مشخص گردیده که در طول رشد تخمک، سطح پلاسمایی ۱۷-بتا-استرادیول (E) افزایش یافته و در ادامه، قبل از رسیدگی نهایی تخمک، مقدار آن کاهش می‌یابد.

تولید ۱۷- بتا- استرادیول (E) توسط سلول های فولیکولی تخدمان آزاد ماهیان به سلول های ویژه ای از هر دو لایه ای سلولی تک و گرانولوزا نیازمند می باشد. تستوسترون (T) توسط سلول های لایه ای تک تولید شده و به وسیله آنزیم آروماتاز در سلول های لایه ای گرانولوزا به ۱۷- بتا- استرادیول (E) تبدیل می گردد. در گونه های دیگر سلول ویژه لایه ای تک وجود نداشته و سلول های لایه ای گرانولوزا مکان اصلی تولید استروئیدها می باشند (Swanson, 1994) در آزاد ماهیان مشاهده گردیده که سطح هورمون گنادوتروپین نوع اول ارتباط معنی داری با سطح هورمون ۱۷- بتا- استرادیول و پروتئین های لایه ای زونارادیاتا دارد (Oppen-Berntsen و همکاران، 1992). بنابراین تولید ویتلوزین و پروتئین های پوسته ای تخم در آزاد ماهیان احتمالاً بطور غیر مستقیم توسط گنادوتروپین نوع اول از طریق تاثیر آن بر روی تولید استرادیول، انجام می گیرد (Swanson, 1994). در ادامه ای رشد تخمک، شاهد فرایند های رسیدگی نهایی (FOM) (شروع دوباره ای تقسیم میوز) و تخمک گذاری (اوولاسیون) در تخدمان ماهیها هستیم. حقیقات انجام شده بر روی ماهیهای مختلف نشان می دهند که گنادوتروپین ها از طریق تولید هورمون های القاء کننده ای رسیدگی جنسی (MIH) در آغاز رسیدگی نهایی تخمک توسط سلول های فولیکولی مؤثرند (Thomas, 2003) در شرایط آزمایشگاهی هورمون های استروئیدی مختلفی در القاء رسیدگی تخمک مؤثر بوده اند که برخی از آنها عبارتند از ۱۷- آلفا- هیدروکسی پروژسترون - ۲۱- آلفا- ۲۰- بتا- دی هیدروکسی - ۴- پریژن - ۳- وان ۱۷ (a,20B-DP) - ۱۷ آلفا- ۲۰- بتا- ۲۱- آلفا- ۲۰- OHP) (Thomas, 2003) در تری هیدروکسی - ۴- پریژن - ۳- وان ۲۰ (a,20B-DP) - ۱۷ آلفا- ۲۰- بتا- دی هیدروکسی کورتیکواسترون (Swanson, 1994). در آزاد ماهیان گنادوتروپین سبب تحریک سلول های لایه ای تک برای تولید ۱۷- آلفا- هیدروکسی پروژسترون می گردد. این هورمون در سلول های لایه ای گرانولوزا در اثر فعالیت آنزیم ۲۰- بتا- هیدروکسی استروئید دی هیدروژنانز ۲۰ (B-HSD) به ۱۷- آلفا- ۲۰- بتا- دی هیدروکسی - ۴- پریژن - ۳- وان ۱۷ (a,20B-DP) تبدیل می شود (Nagahama, 1994) هورمون های القاء کننده ای رسیدگی جنسی سبب تولید فاکتور پیش برنده ای رسیدگی جنسی (MPF) در سیتوپلاسم اووسیت می گردد. این ماده باعث تغییرات زیر در اووسیت می شود:

-۱ مهاجرت هسته به قطب حیوانی اووسیت در جهت میکروپیل؛

-۲ شکست هسته : (GVB) غشاء هسته از بین رفته و ترکیبات آن با سیتوپلاسم مخلوط می گردد؛

-۳ تقسیم دوم میوزی آغاز شده و این فرآیند در مرحله‌ی متافاز متوقف می‌گردد (Thomas, 2003) در فولیکول آزاد ماهیان قبل از تخمک گذاری (اوولاسیون) هر دو نوع گنادوتروپین در تحریک سلول‌های لایه‌ی تک برای تولید ۱۷-آلfa-هیدروکسی پروژسترون نقش دارند ولی گنادوتروپین نوع دوم در تبدیل ۱۷-آلfa-هیدروکسی پروژسترون به ۱۷-آلfa- بتا- دی هیدروکسی -۴ پریژن -۳-وان ۱ مؤثرتر می‌باشد. افزایش توانایی گنادوتروپین نوع دوم در طول این مرحله با ظهور گیرنده‌های ویژه‌ی GTH-II بروی لایه‌ی گرانولوزا همراه می‌باشد. بعد از مرحله‌ی زرده سازی، توانایی فولیکول برای تولید ۱۷-بتا- استرادیول کاهش یافته و از فعالیت آنزیم آروماتاز در سلول‌های گرانولوزا بطور چشمگیر کاسته می‌شود و در عوض فعالیت آنزیم ۲۰- بتا-هیدروکسی استروئید دی هیدروژنانز ۲۰ (B-HSD) افزایش می‌یابد. در این زمان توانایی سلول‌های تک در پاسخ به افزایش گنادوتروپین برای تولید تستوسترون افزایش یافته و درست قبل از رسیدگی نهایی تخمک تولید ۱۷-آلfa-هیدروکسی پروژسترون ۱۷ (OHP-) توسط سلول‌های تک گسترش می‌یابد (Swanson, ۱۹۹۴)، بنابراین، GTH-II پلاسمای درست قبل از رسیدگی نهایی اووسیت افزایش یافته و باعث تعویض تولیدات استروئیدوژنیک (۱۷-بتا استرادیول و استرون در ماهیان ماده) با تولیدات پروژستونیک (مانند ۱۷-آلfa- ۲۰- بتا- دی هیدروکسی -۴ پریژن -۳-وان و ۱۷-هیدروکسی پروژسترون) در سلول‌های لایه‌ی تک تخمک می‌گردد (ابراهیم زاده، ۱۳۸۶). تولید ۲۰- بتا-هیدروکسی استروئید دی هیدروژنانز ۲۰ (B-HSD) نیز توسط گنادوتروپین نوع دوم کنترل می‌گردد چون سطح پلاسمایی این ماده در این دوره افزایش یافته و گیرنده‌های GTH-II واقع در لایه‌ی گرانولوزا نیز در این زمان گسترش می‌یابند (Swanson, ۱۹۹۴)،

کشت سلولی ماهیان

روشهای کشت یاخته علم سابقه داری است که از آغاز قرن اخیر تا کنون با سرعت قابل توجهی راه توسعه و ترویج را پیموده است، طوری که امروزه به ابزاری ضروری در تحقیقات زیست‌شناسی مولکولی، ویروس شناسی، ایمنی شناسی، مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی تبدیل شده است، نیاز به علم و دانش کشت یاخته در آینده نزدیک محسوس‌تر خواهد شد زیرا اقتصاد کشور ما مشابه کشورهای در حال توسعه وابسته به پیشرفت دانش فن آوری زیستی و به کاربرد فرآورده‌های بیولوژیک می‌گردد، با افزایش دانش یاخته شناسی و

بکارگیری یافته های پژوهشگرانی که در زمینه کشت یاخته های اختصاصی (تیره سلولی) گام برداشته اند، تولید فرآورده های بیولوژیک در راکتورهای کشت یاخته ای در حد انبوه واقعیت پیدا کرده است، در کشورمان بجز کشت بافت و یاخته آبزیان، سایر رده های حیوانی (موس، هامستر، جوجه، ...) و بافت‌های انسانی کشت می‌گردد و این نقیصه با کشت انبوه یاخته های تیره ای آبزیان اقتصادی کشور تکمیل می‌گردد و این فرآیند ضمن خود کفایی مملکت و بالا بردن درآمد ملی باعث رفع نیازهای تحقیقاتی بیوتکنولوژی، و کشت سلولهای دودمانی تولید فرآورده های بیوتکنولوژی اختصاصی نظیر تولید هورمون رشد ماهی، شناسایی ژن رشد آبزیان و انتقال آن به ماهیان کم رشد، شناسایی، جداسازی عوامل ویروسی بیماریهای آبزیان می‌گردد، بجز چند استثناء، ویروسهای آبزیان فقط می‌توانند در بدن ماهی یا در کشت های سلولی آبزیان تکثیر پیدا نمایند. تاکنون کشورهای پیشرفته تنها هفت نوع تیره سلولی آبزیان تولید نموده اند که تنها بافت‌های محدود دو نوع آبزی پرورشی آنها با آبزیان پرورشی ما مشابه است (بافت اپی تیال کپور معمولی و بافت گوناد ماهی قزل آلای رنگین - کمان) لذا تولید یاخته های اختصاصی آبزیان با اهداف ذیل باعث اطمینان از سرمایه گذاری و بالا بردن ارزش افزوده آبزیان و ایجاد امنیت غذایی کشور می‌گردد.

اهداف و دلایل انتخاب پروژه

۱. کسب دانش فنی تولید رده های سلولی آبزیان و تعیین شرایط نگهداری آنها.
۲. ایجاد نخستین بانک سلولی آبزیان کشور.
۳. کشت بافت هیپوفیزی ماهی چالباش برای جداسازی mRNA هورمون رشد جهت تولید cDNA.
۴. پیشگیری از عواقب قانونی انجام آزمایش in vivo بر روی ماهیان.

پیشینه تحقیقات انجام شده در زمینه کشت بافت و کشت سلولی

در سال ۱۹۰۷ برای اولین بار به منظور بررسی و نحوه رشد طناب عصبی قورباغه در محیط لنفاوی خون استفاده نموده، که در نتایج خود رشد اکسون‌ها را گزارش نموده است.

در سال ۱۹۱۳ Carrel نشان داد که سلول‌ها در محیط‌های مغذی و استریل می‌توانند به مدت طولانی زنده بمانند.

در سال ۱۹۴۳ Earl موفق به جداسازی سلول‌های رده، L Cell، گردید و توانست کلونی از آن‌ها را ایجاد نماید.

در سلال ۱۹۵۲ Gey توانست سلول‌های رده پیوسته را از سلول‌های کارسینومای گردن ایجاد نماید.

در سال ۱۹۵۵ Eagle برای اولین بار به بررسی مواد مورد نیاز در محیط کشت بافت پرداخت.

در سال ۱۹۶۱ Hayflich در آزمایش‌های خود نشان داد که؛ سلول‌های فیروblast انسانی پس از تعدادی تقسیم

در محیط کشت مرده و توانایی حیاتی محدودی دارند.

در سال ۱۹۷۵ Koehler و Milstein توانست از سلول‌های رده هیریدی آنتی‌بادی استخراج نماید.

در سال ۱۹۷۶ Sato مشخص نمود که سلول‌های مختلف برای ادامه حیات در محیط کشت به هورمون‌ها و

فاکتورهای رشد مختلفی نیازمند می‌باشند.

در سال ۱۹۷۷ Axel و Wiggler موفق شدند ژن پستانداران را از سلول‌های کشت داده شده نسخه برداری نمایند.

۲- مواد و روش‌ها

۱- وسایل و تجهیزات

- هود بیولوژیک
- متنه دستی
- انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد دی اکسید کربن دار
- سانتریفیوژ
- بن ماری
- پیپت الکتریکی
- میکروسکوپ اینورت
- فیلتر هود با غشاء فیلتر ۰,۲
- همزن مغناطیسی
- ترازوی حساس
- فلاسک کشت سلولی یکبار مصرف ۲۵ Cm^۲
- پیپت ۵ و ۱۰ میلی لیتری
- لوله سانتریفیوژ ۱۵ سی سی
- پمپ خلاء

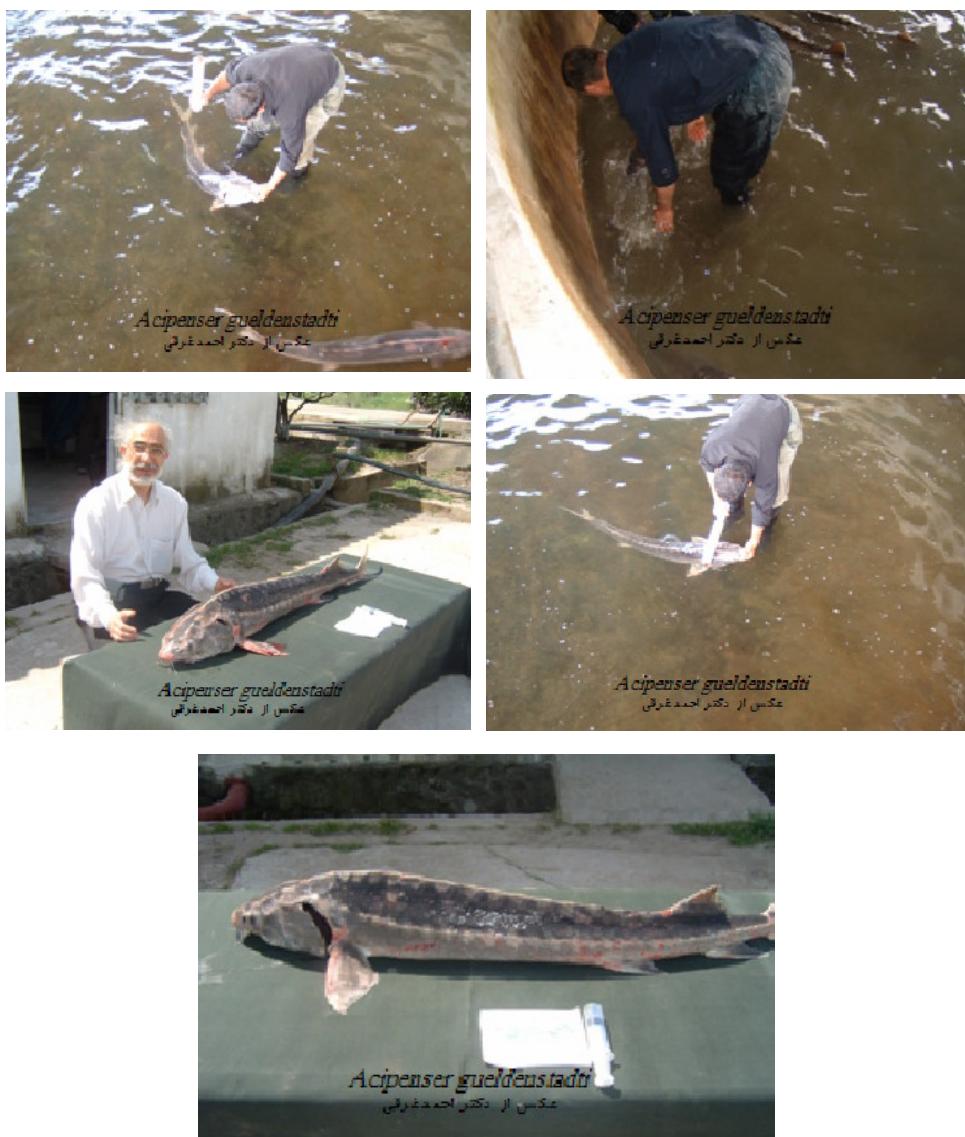
۲- مواد و محلول ها

- محیط کشت DMEM(Dulbicp Modified Egle Medium)
- سرم جنین گوساله
- آنتی بیوتیک ها- پنی سیلین و استرپтомایسین
- بیکربنات سدیم
- آب مقطر استریل
- محلول PBS (phosphat bulkered saline)
- آنزیم تریپسین
- گلوتامین
- محلول ورسن
- و هیپوفیز ماهی چالباش (*Acipenser gueldenstadii*)

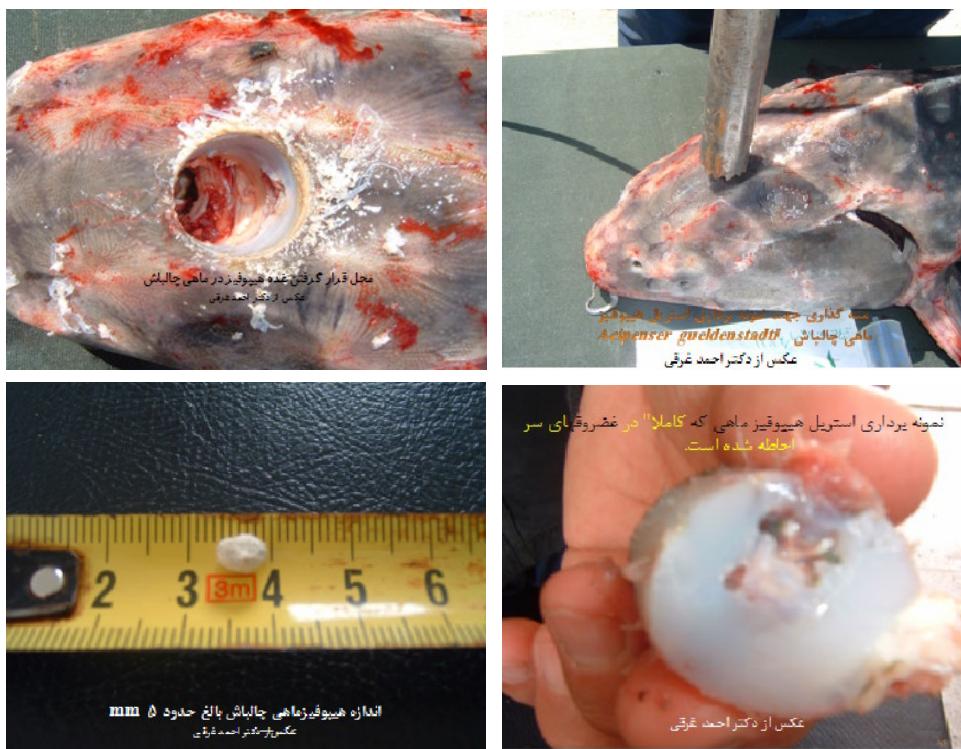
۲-۳- شرح عملیات (برنامه کاری)

۱- تهیه هیپوفیز ماهی چالباش

غده هیپوفیز ماهی چالباش بلافاصله پس از صید و ضد عفونی با استفاده از یک متنه دستی از زیر استخوانهای سر خارج شد، سپس غده هیپوفیز را در حداکثر شرایط استریل با وسایل استریل از سایر بافت‌های مغز جدا گردید سپس غده هیپوفیز در کنار یخ مایع قرار گرفت و به آزمایشگاه منتقل شد و در دمای ۸۰-درجه سانتیگراد نگهداری شد.



شکل ۷. تهیه ماهی چالباش



شکل ۸. استخراج غده هیپوفیز از ماهی چالباش



شکل ۹. غده هیپوفیز استخراج شده از ماهی چالباش به منظور کشت.

۲- تهیه کشت اولیه غدد هیپوفیز ماهی خاویاری

کشت اولیه از طریق انتقال یاخته‌ها از قطعات بافت‌های نمونه برداری شده یا از طریق جداسازی مکانیکی و یا آنزیمی انجام شد لازم به ذکر است که کلیه کارهای انجام شده در زیر هود میکروبیولوژی به منظور ایجاد شرایطی برای رشد و تکثیر سلول‌ها در شرایط استریل و عاری از میکروب‌ها انجام گردید. وجود فیلترهای شرایطی (High Efficiency Particle) HEPA در هود میکروبیولوژی باعث حذف ذرات بزرگ‌تر از $\frac{1}{3}$ میکرومتر گردیده و شرایط مناسب کار را فراهم نمود.

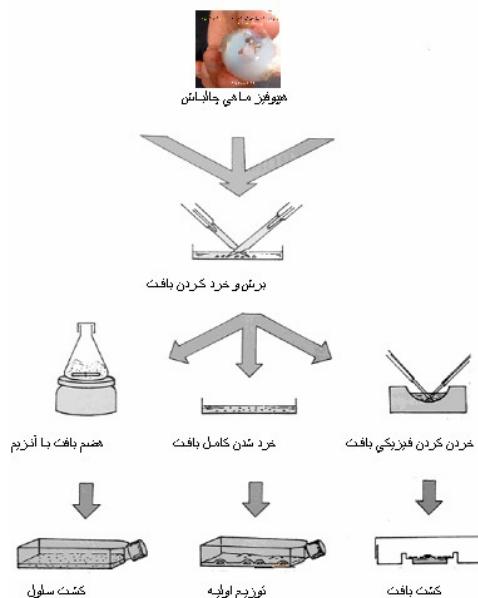
برای تهیه محیط کشت ابتدا DMEM از شرکت Gibco را در یک لیتر آب مقطر دوبار تقطیر شده حل گشت، به این محیط کشت ۲ گرم بیکربنات سدیم 50 میلی گرم در لیتر استریپتومایسین 50 میلی گرم در لیتر پنی سیلین اضافه شد، محلول کشت به وسیله فیلتر هولدر و غشای فیلتر و پمپ خلاء استریل شد، غدد هیپوفیز و مقداری از بافت جانبی که در محیط کشت جمع آوری و به آزمایشگاه کشت سلولی آورده شده بود، در شرایط آزمایشگاه هر یک از نمونه‌ها 3 بار با محیط کشت شست و شو داده شد، سپس هرنمونه را جداگانه در پتری 90 میلی متری استریل یکبار مصرف به وسیله قیچی ریز استریل جراحی تکه تکه کرده و برای بهتر خرد شدن بوسیله تیغ بیستوری شماره 20 بافت‌های تکه شده خیلی ریز تر شده و هر نمونه با 5 میلی لیتر محیط کشت به لوله سانتریفیوژ 15 سی سی انتقال داده شد و بر روی هر نمونه به میزان 5 میلی لیتر آنزیم تریپسین 25% اضافه گردید.



شکل ۱۰. آماده سازی محیط کشت بافت هیپوفیز ماهی چالباش.



شکل ۱۱. محیط کشت مورد استفاده در کشت بافت هیپوفیز ماهی چالباش.



شکل ۱۲. کشت سلول های اولیه هیپوفیز ماهی چالباش

کشت بافت هیپوفیز

در این روش قسمتی از بافت های نمونه برداری شده به قطعاتی که بزرگتر از 2 mm نیستند خرد شده و جهت شست و شوی فیزیولوژیک و به منظور هموزن نمودن بافت هیپوفیز ماهی چالباش از محلول فیزیولوژیک (نمکی) نرمال (NaCl / ۹g / ۱۰۰g) و یا محلول نمکی ایزوتونیک تجاری که در بیمارستان ها و داروخانه ها موجود و همچنین اقتصادی، استریل و عاری از جرم تبزا است استفاده نموده. سپس سلول های هیپوفیز ماهی چالباش

در مخلوط عصاره جنین مرغ و سرم کامل جنین گاو به همراه محیط کشت در فلاسکهای مخصوص کشت داده شد . البته قبل از این مرحله به منظور دست یافتن به pH ایده‌آل از محیط کشت EMEM به همراه Earle's BSS در ظروف بسته شده استفاده شد . تقریباً pH ایده‌آل ابتدایی که ۷/۶ - ۷/۸ می‌باشد ایجاد نموده سپس به منظور ادامه کار با استفاده از CO_2 , pH به مقدار کمتری در حدود ۷/۲ رسانده شد، قبل از اینکه به محیط ، بذر سلول اضافه شوند، محیط کشت را صاف نموده . سپس محیط کشت‌های حاوی بذر سلول‌های هیپوفیز ماهی چالباش جهت رشد و تکثیر به انکوباتور CO_2 به منظور ایجاد محیط مناسب از جهت دما، رطوبت و CO_2 منتقل گشت .
جداسازی یاخته‌ها به روش مکانیکی : در این روش یاخته‌ها هنگام ریزکردن بافت-ها و یا عبور دادن بافت‌ها از توریها ، و یا گذرانیدن آنها با سرنگ و یا کشیدن با پی پت به طور مکرر به دست آمد (Ranga and Shammi, 2002).



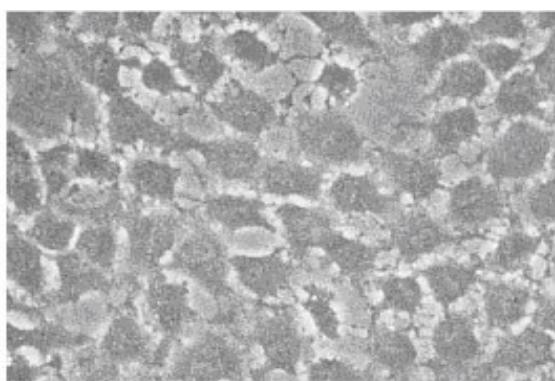
شکل ۱۳ . برش بافت هیپوفیزی ماهی چالباش.



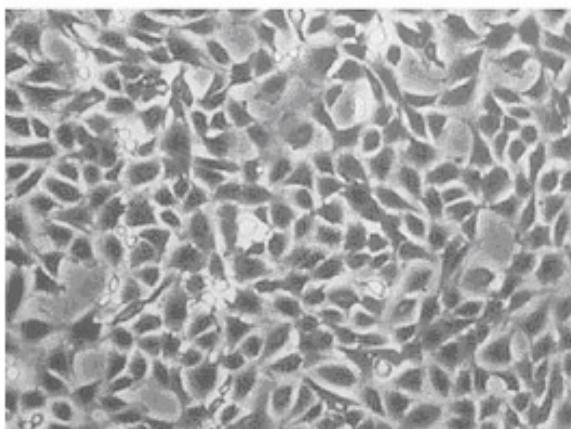
شکل ۱۴ . بافت هیپوفیز ماهی چالباش در انکوباتور دی اکسید کربن.

جداسازی یاخته ها به روش آنزیمی : بافت های هیپوفیز له و مخلوط شده در انکوباتور دی اکسید کربن با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت و برای اینکه آنزیم تریپسین بر روی بافت ها اثر کند، هر ۱۵ دقیقه لوله ها را تکان دادند. بعد از پایان انکوباسیون اجازه داده شد بافت های معلق در دمای اتاق ته نشین شوند. محلول بالایی (سوپر نیتنت super nitent) در لوله دیگر ریخته شد و به محلول ته نشین شده با بافت ها ۵ میلی لیتر محیط کشت اضافه گشت و هر دو لوله را با دور ۲۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گشت تا آنزیم تریپسین حذف شود. بعد از سانتریفیوژ محلول بالایی دور ریخته شد و پلت ته نشین شده در لوله ها هر کدام با ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مخلوط گشت، به آن سرم ۱۰٪ جنین گوساله اضافه گشت و در هر کدام جداگانه در فلاسک کشت سلول ریخته شد، و در انکوباتور دی اکسید کربن به مدت ۱۰ الی ۳۴ روز کشت داده شد. نمونه ها هر روز زیر میکروسکوپ اینورت مشاهده گشت، در مرحله پاساژ دادن محلول سوپر نیتنت بعد از سانتریفیوژ کردن سلول ها که به صورت سوسپانسیون بودند در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شده است.

در این روش یاخته ها با استفاده از آنزیمهای تریپسین ، کلاژنаз (kolagenaz)، الاستاز (elastaz)، هیالورونیداز (hialuronidaz)، دی آن آز (di an az)، پروناز (prunaz) و یا مخلوطی از آنها بدست آمده . جdasازی یاخته های زنده از غیر زنده : یاخته های مرده را در کشت اولیه از طریق سانتریفیوژ کردن در مخلوطی از فیکول (ficoll) و متزیزوآت سدیم (sodium metrizoate) نظیر Hypaque و یا Triosil خارج گردید.(Ranga and Shammi, 2002).



شکل ۱۵. مشاهده سلول ها در بافت هیپوفیزی که توسط قیچی جراحی استریل تکه شده.



شکل ۱۶. مشاهده سلول‌های تریپسین دهی شده

تهیه تیره یاخته ای آبزیان

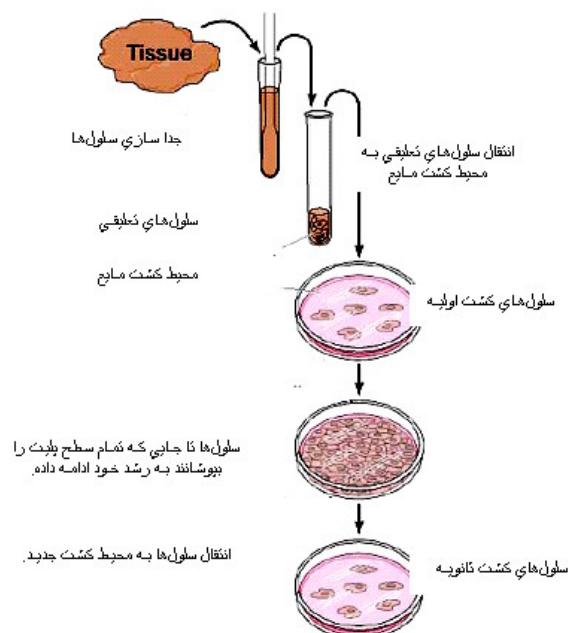
کشت اولیه حاوی انواع یاخته‌های متفاوت و بسیار ناهمگن از بافت اصلی به منظور تهیه یک تیره یاخته ای همگن تری به دست آمد و خصوصیات آنها بررسی شد و یاخته‌ها ذخیره گشتند. در این مرحله از مطالعه علاوه بر افزایش تعداد یاخته‌ها و یکنواختی آنها امکانات تجربی وسیعی فراهم شد.

پس از کشت اولیه هیپوفیز، کشت ثانویه انجام گردید.

سپس با استفاده از روش کلونینگ تیره‌های متفاوت یاخته ای و مناسب ترین سلول دودمانی هیپوفیز انتخاب شدند و آنها در محیط کشت سلولی حاوی * + گلوتامین + بی کربنات سدیم و سرم جنین گوساله کشت داده شدند. این عمل برای هر کدام از سلولهای انتخاب شده معین (Cloning) انجام گردید. سپس سلولها از محیط کشت خارج شده و پس از شستشو با محلول ورسن و رسوب آنها توسط سانتریفیوژ (۵۰۰ - ۲۰۰) دور به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد به محیط استریل و عاری از آنتی بیوتیک منتقل شد و هر ماه تیره‌های یاخته ای بدست آمده از نظر PH، شفافیت و عدم آلدگی، مرفولوژی، تمیز بودن و کیفیت یاخته مورد آزمایش قرار گرفت و بهترین کشت برای کشت مجدد و تولید کشت‌های دختر در شرایط سرمای بخار مایع ازت جامد حفظ گشت (Ranga and Shammi, 2002).



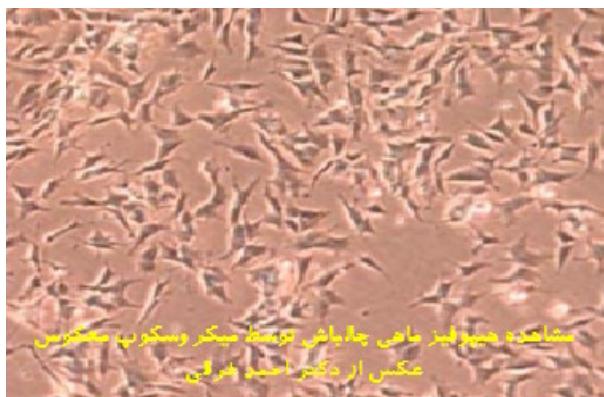
شکل ۱۷. مشاهده کشت سلولی هیپوفیز ماهی چالباش.



شکل ۱۸. خلاصه شرح عملیات.

۳- نتایج

یکی از نمونه ها بعد از ۲۴ ساعت آلودگی، نشان داد که از دور مطالعه خارج شد. سایر نمونه ها آلودگی نداشتند. بعد از ۱۰ روز کشت سلول ها چسبندگی به سطح نداشتند و مشاهدات در زیر میکروسکوپ اینورت نشان داد که فقط بیشتر سلول ها از نظر مرغولوزی سلول های کروی و از نظر اندازه دوبرابر شده بودند که به همین شکل می مانند.

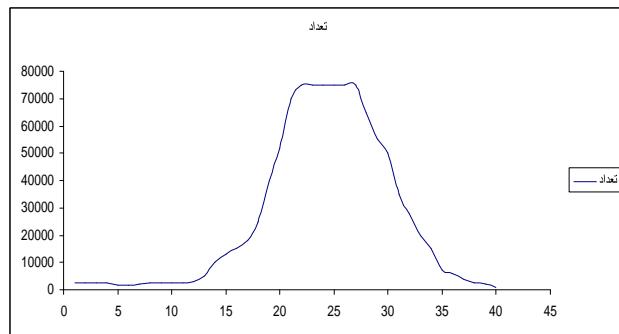


شکل ۱۹. مشاهده سلول های کشت داده شده توسط میکروسکوپ اینورت.

از روز دهم سلول ها وارد مرحله رشد و تکثیر شدند به طوری که در روز ۱۶ تعداد سلول ها به ۱۵۰۰۰ سلول در میلی لیتر رسید. روند رشد و تکثیر سلول ها ادامه یافت تا روز ۲۴ که تعداد سلول ها به ۷۵۰۰۰ سلول در میلی لیتر رسید و از آن به بعد تعداد سلول ها رو به کاهش رفت. در جدول ۹ رشد سلول ها را در روزهای مختلف کشت مشاهد می نماییم:

تعداد سلول‌ها در میلی لیتر	روز
2500	۱
2500	۲
2500	۳
2500	۴
1500	۵
1500	۶
2000	۷
2500	۸
2500	۹
2500	۱۰
2500	۱۱
3000	۱۲
5000	۱۳
10000	۱۴
13000	۱۵
15000	۱۶
18000	۱۷
25000	۱۸
40000	۱۹
52000	۲۰
70000	۲۱
75000	۲۲
75000	۲۳
75000	۲۴
75000	۲۵
75000	۲۶
75000	۲۷
65000	۲۸
55000	۲۹
50000	۳۰
35000	۳۱
28000	۳۲
20000	۳۳
15000	۳۴
7000	۳۵
6000	۳۶
4000	۳۷
2500	۳۸
2000	۳۹
1000	۴۰

جدول ۱. تعداد سلول‌ها در شمارش روزانه.



نمودار ۱. افزایش تعداد سلول های هیپوفیزی ماهی چالباش.



شکل ۲۰. کشت ۱۶ روزه سلول هیپوفیز
ماهی چالباش تعداد ۲۵۰۰۰ سلول در میلی لیتر



شکل ۲۱. کشت ۲۴ روزه سلول هیپوفیز
ماهی چالباش تعداد ۲۵۰۰۰ سلول در میلی لیتر



شکل ۲۲. مشاهده سلول های تحت کشت از روز ۳۰ تا ۳۷.



شکل ۲۳ . مشاهده سلول های تحت کشت از روز ۳۷ به بعد که وارد فاز مرگ می گردند

۱-۳-۱- تجزیه و تحلیل نتایج

نیروی محركه در رشد سلولی:

رده سلولی ثابت (Established Cell Lines)

سلول های هیپوفیز ماهی چالباش در محیط کشت از لحاظ رشد بسیار به میکرواور گانیسم ها شباهت دارند، و فاز رشد آنها مشابه باکتری ها، مخمرها و پروتوزوها است.

فاز آهسته (Lag phase)

در این مرحله رشدی صورت نگرفته و سلول ها چندین ساعت تا چندین روز در این فاز باقی مانندند.

فاز لگاریتمی (Log phase):

در این فاز سلول های هیپوفیز در حین اینکه رشد می کنند از لحاظ تعداد دوبرابر می شوند و این مراحل در سلول های با رشد بالا در هر ۱۵ تا ۲۰ ساعت یکبار رخ می داد.

فاز ثابت(Stationary phase)

پس از فاز لگاریتمی که تعداد سلول‌ها به حد اکثر رسید، رشد سلول‌ها متوقف شد و سلول‌ها وارد فاز سکون گشتند.

در طی فاز رشد تعداد سلول‌ها ی هیپوفیز ماهی چالباش مطابق فرمول زیر افزایش یافت(Rangam,2002):

$$N=N_0 e^{kt}$$

$$\log N = \log N_0 + Kt \log^2$$

(تعداد سلول‌های اولیه N_0 ، تعداد سلول‌ها در زمان t و K ضریب برگشتی است)

فاکتور Kt با تعداد سلول‌های تولید شده(n) نسبت دارد، تعداد سلول‌ها ی تولید شده در هر زمان از N_0 تا N به

صورت تصاعدی افزایش می‌یابد. به این معنی که زمان نسل (T)، زمان دوباره شدن سلول‌ها برابر است با عکس

ضریب برگشتی ($T=1/K$).

بنابراین معادله فوق را به صورت زیر می‌توان نوشت:

$$\log N = \log N_0 + n \log^2$$

$$n = (\log N - \log N_0) / \log^2$$

از آنجاییکه $\log^2 = 1/\log^2 = 3/32$ ، بنابراین معادله فوق را می‌توان به شکل زیر خلاصه نمود:

$$n = \frac{3}{32} (\log N - \log N_0)$$

حساب فرمول فوق نشان دهنده جمعیت سلول‌ها و سرعت رشد آن‌ها است. بنابراین در هر زمان که سلول‌ها

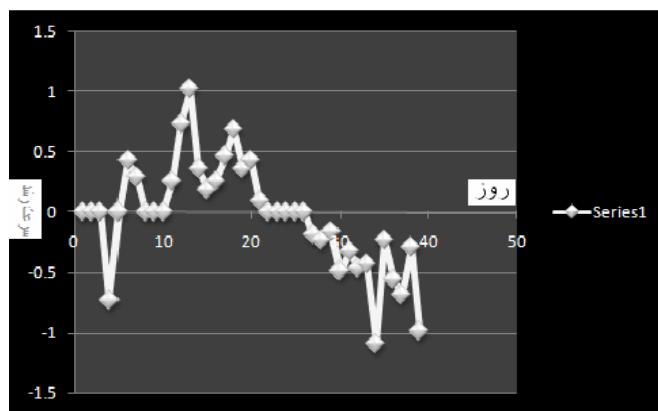
تقسیم نشدنند و تعداد بسیاری از آن‌ها مردند این نسبت تقسیم می‌گردد.

در رشد سلول‌ها در محیط کشت عوامل متعددی نظیر دما، اسمز، pH و... مؤثرند.

براساس فرمول فوق داده های آماری سرعت رشد روزانه به شرح زیر مشاهده شد:

سرعت رشد سلول های هیپوفیز ماهی چالباش در محیط کشت	روز
.	۱-۲
.	۲-۳
.	۳-۴
-۰/۷۳	۴-۵
.	۵-۶
۰/۴۳	۶-۷
۰/۲۹	۷-۸
.	۸-۹
.	۹-۱۰
.	۱۰-۱۱
۰/۲۶	۱۱-۱۲
۰/۷۳	۱۲-۱۳
۱/۰۲	۱۳-۱۴
۰/۳۶	۱۴-۱۵
۰/۱۹	۱۵-۱۶
۰/۲۶	۱۶-۱۷
۰/۴۶	۱۷-۱۸
۰/۶۹	۱۸-۱۹
۰/۳۶	۱۹-۲۰
۰/۴۳	۲۰-۲۱
۰/۰۹	۲۱-۲۲
.	۲۲-۲۳
.	۲۳-۲۴
.	۲۴-۲۵
.	۲۵-۲۶
.	۲۶-۲۷
-۰/۱۹	۲۷-۲۸
-۰/۲۳	۲۸-۲۹
-۰/۱۶	۲۹-۳۰
-۰/۴۹	۳۰-۳۱
-۰/۱۳	۳۱-۳۲
-۰/۴۶	۳۲-۳۳
-۰/۴۳	۳۳-۳۴
-۱/۰۹	۳۴-۳۵
-۰/۲۳	۳۵-۳۶
-۰/۰۶	۳۶-۳۷
-۰/۶۹	۳۷-۳۸
-۰/۲۹	۳۸-۳۹
-۰/۹۹	۳۹-۴۰

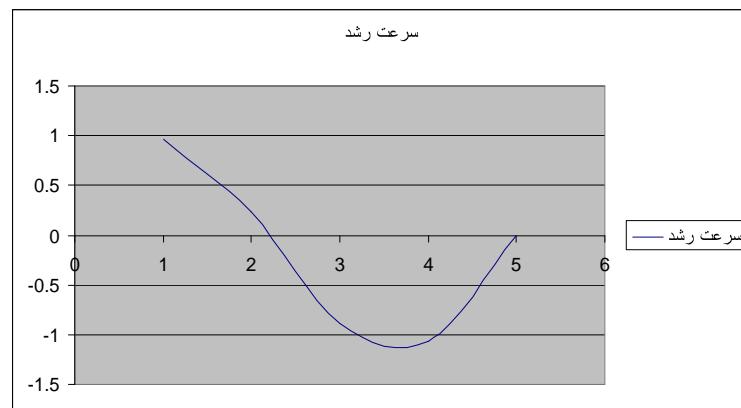
جدول ۲. تغییرات روند سرعت رشد روزانه



نمودار ۲. روند تغییرات سرعت رشد روزانه سلول‌های هیپوفیز ماهی چالباش.

جدول ۳. تغییرات روند سرعت رشد هفتگی

ساعت رشد سلول‌ها در محیط کشت	هفته
۰/۹۶	اول
۰/۲۳	دوم
-۰/۸۹	سوم
-۱/۰۶	چهارم
*	پنجم



نمودار ۳. منحنی روند تغییرات سرعت رشد هفتگی سلول‌های هیپوفیز ماهی چالباش.

۴- بحث و نتیجه گیری

مطالعه کشت سلول هیپوفیز ماهی چالباش برای اولین بار در کشور انجام گرفت و در هنگام آزمایشها تجربیات علمی خوبی بدست آمد که در این قسمت مورد بحث قرار می گیرد:

۱. تهیه محیط کشت

به منظور کشت هیپوفیزی ماهی چالباش از دو نوع محیط کشت استفاده شده است، محیط های نوع اول که تنها باعث بقای سلول شد، در صورتیکه محیط های نوع دوم باعث رشد و تکثیر سلولی شدند، تفاوت اصلی این دو محیط در این است که محیط های نوع اول به عنوان منبعی برای انرژی سلول به حساب آمده، اسمولاریتی مناسب جهت بقای سلولها را نیز فراهم نمودند. این محیط ها با ترکیب مشخص (defined media) از طریق افزودن گلوکز به محلول های تعادل نمکی (balanced salt solution) بدست آمدند(Ranga, 2002).

در مقابل محیط های مورد استفاده جهت کشت مدت دار سلول، نیازمند فاکتورهای اختصاصی نظیر آمینواسیدها، ویتامین ها، فاکتورهای رشد، هورمون ها و ... بودند که قابل سنتز توسط خود سلولها نبوده، رشد و تکثیر سلولها توسط آنها تنظیم می گشت(Terrence, 2004).

در روش اول هر یک از اجزای ضروری به صورت مواد شیمیایی خالص و با مقادیر مشخص و دقیق به محیط اضافه شدند، که چنین محیط هایی با عنوان محیط های مصنوعی و با ترکیب مشخص شناخته می شوند(Terrence, 2004). روش دوم بکار بردن منبع طبیعی جهت فراهم نمودن اجزای ضروری رشد سلول بود که از طریق اضافه کردن سرم به محیط کشت به دست آمد. از آنجایی که ترکیب شیمیایی سرم دقیقاً مشخص نیست، چنین محیط هایی با عنوان محیط های با ترکیب نامشخص (undefined media) شناخته می شوند(Terrence, 2004).

علاوه بر مواد و ترکیبات شیمیایی لازم و ضروری جهت رشد سلولها، شرایط ایده آل فیزیکی همانند pH مناسب، فشار اسمزی، فشار سطحی، ویسکوزیتی و عواملی همچون حلایت مواد، سازگاری اجزای تشکیل دهنده، خلوص ترکیبات سازنده محیط و ثبات مواد شیمیایی از جمله فاکتورهای مهم کنترلی در حین کشت سلول های هیپوفیزی ماهی چالباش بوده اند(Ranga, 2002).

برخی ویتامین ها و آمینواسیدها به عنوان ترکیباتی که از لحاظ شیمیایی ناپایدار می باشند از جمله فاکتورهای مهم در محیط های کشت سلولی هستند که به دلیل ماهیت ناپایدار، عمدتاً به عنوان مواد مکمل و به صورت جداگانه به محیط های کشت اضافه شدند.(Ranga, 2002).

در ادامه دو نوع محیط کشت طبیعی و مصنوعی اشاره خواهد شد. اگرچه در عمل ترکیبی از این دو نوع محیط مورد استفاده قرار گرفت. به عنوان مثال، محیط کشت استفاده شده ترکیبی از نمک ها و ترکیبات کربنی به عنوان منبع انرژی بود که بوسیله سرم به غذای مورد نظر رسیده شد. این قبیل محیط ها نیمه مصنوعی نامیده می شوند(Terrence, 2004).

محیط های کشت طبیعی مورد استفاده

گستره‌ی وسیعی از مواد طبیعی جهت کشت سلولهای حیوانی مورد استفاده قرار می گیرند که به دو دسته کلی قابل تقسیم می باشند:

- ۱- کوآگولا (Coagula): مانند پلاسمای منعقد شده

- ۲- مایعات بیولوژیک: مانند سرم، مایعات بافتی بخصوص مایعات جنینی

پلاسمای منعقد شده

پلاسما به ندرت جهت مصارف کشت سلول مدرن مورد استفاده قرار می گیرد. در قدیم برای کشت قطعات کوچک بافت های پرندگان کاربرد داشته است. به دلیل محدود بودن مصارف این ماده، از توضیح بیشتر در مورد آن خودداری می گردد.

مایعات بیولوژیک

رایج ترین مایع بیولوژیک در امر کشت سلول، سرم است تهیه سرم نسبتاً آسان بود، و از خاصیت انعقادی خون در غیاب مواد ضد انعقاد استفاده گردید. پس از منعقد شدن خون، مایع باقی مانده از روی بخش های منعقد شده جدا شده و در مرحله آخر فیلتر شد. سرم تهیه شده به سه صورت سرم کامل، سرم اولترا فیلتر (ultra filter) و سرم

دیالیز شده آماده گردید. در روش اولترا فیلتراسیون، مولکولهای بزرگ نظیر پروتئین ها و ترکیبات متصل به آنها از سرم جدا گردید. در بسیاری موارد این مولکولهای بزرگ اجزای ضروری برای رشد سلول بوده فقدان آنها در سرم های اولترافیلتر سبب کندی رشد سلولی و در مواردی توقف رشد می گردد. این نوع سرم ها معمولاً به عنوان منبع کمکی غذایی مورد استفاده قرار می گیرند. در سرم های دیالیز شده، ترکیبات با وزن مولکولی بالا در سرم باقی مانده و در عوض ترکیبات با وزن مولکولی پائین از سرم جدا گشته اند. این نوع سرم ها معمولاً در محیط های نیمه مصنوعی که حاوی ترکیبات با وزن مولکولی پائین می باشند مورد استفاده قرار می گیرند که نقش آنها تامین مولکولهایی با وزن بالا می باشد. اما سرم مورد استفاده در کشت سلولی هیپوفیز ماهی چالباش سرم کامل است (Terrence, 2004).

محیط های مصنوعی

محیط های ساختگی انواع نمک های معدنی هستند و به همین دلیل تحت عنوان محلول های تعادل نمکی BSS نامیده می شوند.

۲- نمک های فیزیولوژیک (Physiologic salines)

محلول های نمکی فیزیولوژیک برای اکثر کارها در کشت بافتی اساسی هستند. فرمولاتیون متعددی به طور تجاری در دسترس هستند که ما در این میان از محلول نمکی متتعادل شده هنکس (Hanks balanced salt solution) استفاده کردیم که یکی از مفیدترین آن هاست و شامل مقدار کمی بی کربنات سدیم اضافه شده به سیستم بافری فسفات است، که در معرض هوا مقدار pH آن به سرعت افزایش پیدا می کند (جدول ۱).

Component BSS	Earle's BSS	Hank's	Buffered saline Phosphate
NaCL a	6.80	8.00	8.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.27	0.19	0.132
KCL	0.40	0.40	0.20
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.14	-	-
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	-	0.045	1.15
NaHCO ₃	2.20	0.35	-
KH ₂ PO ₄	-	0.06	0.20
MgCl ₂ .6H ₂ O	-	0.10	0.10
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20	0.10	-
Glucose	1.00	1.00	-
Phenol red,1% soln	1 ml	1ml	1ml

جدول ۴. اجزای (g/L) نمک‌های فیزیولوژیک استفاده شده در کشت بافت ماهی چالباش (Wolf,K1988)

a. برای تهیه (Phosphate Buffered saline) مواد شیمیایی به طور مجزا استفاده شد. هر ماده‌ای به طور کامل قبل از اضافه کردن به ماده بعدی حل شده بود.

b. مقدار فنل رد ۱ ml/L بوده است.

pH - ۳

مدیریت عمل جهت pH بسیار اساسی می‌باشد، نه فقط برای رشد بهتر سلول‌ها بلکه برای تکثیر و همانندسازی ویروس‌های ماهیان به وسیله سلول‌ها لازم است. pH ۷/۶ تا ۷/۸ رشد بسیار خوبی را برای تیره‌های سلولی RTG-2 و BB,BF-2, ,CHSE-214, EPC, FHM همچنین هیپوفیز ماهی چالباش فراهم می‌نماید (جدول ۲). مجموعاً تیره‌های سلولی فوق قادر هستند که بسیاری از ویروس‌های ماهیان را برای جداسازی تکثیر دهنند.

Cell line Designation						
Common	ATCC	Animal	Tissue	Morphology	Somefish viruses replicated	Temperature tolerance(C)
BB	CCL-59	Brown bullhead	Caudal trunk	Fibroblast	CCV,IP	4-34
BF-2	CCL-91	Bluegill	Caudal	Fibroblast trunk	EVA,IPNV,LV	10-30
CAR	CCL-71	Goldfish	Fin	Fibroblast	GFV,GSV	15-30
CHSE-214	_	Chinook salmon	Embryo	Fibroblast	H.Salmonis,IHNV ,IPNV,OMV, VHSV	
EPC	_	Common Carp	Epithelioma	Epithelial	PFR SVC,VHSV	1-30
FHM	CCL-42	Fathead minnow	Caudal trunk	Epithelial	EV-2,GSV,IHNV, IPNV,PER,SVCV	0-36
RTG-2	CCL-55	Rainbow trout	Gonad	Epithelial	H.salmoneus,IHNV ,IPNV,OMV,PER ,VHSV	

جدول ۵. تیره های سلولی مفید برای ویروس شناسی ماهیان (Wolf, K., 1988)

CCV، ویروس گربه ماهی کاتالی، EVA ویروس مارماهی، GFV ویروس ماهی طلایی، GSV ویروس ماهی طلایی IPNV Infection hemtopoietic necrosis virus IHNV Herpesvirus salmonis H.Salmonis PFR Onchorhynchus masou virus OMV Lymphocystis virus LV infectionpanereatic necrosis virus viral hemorrhagic septicemia virus VHSV spring viremia of carp virus SVCV pike fry rhabdovirus

برای دستیابی به جدول کامل به Wolf and Mann , 1988 مراجعه شود.

انواع محیط های کشت برای رده های سلولی

رده های سلولی ماهیان به دی اکسید کربن نیاز دارند ولی نیاز آنها می تواند به وسیله بی کربنات هم تأمین شود. مقدار بی کربنات سدیم به طور اتفاقی در تمام محیط های کشت سلولی یافت می شود. عمل اضافی برای بی کربنات سدیم فراهم کردن ظرفیت بافری است. عمل بافری آن به وسیله یون بی کربنات در تعادل با CO_2 و با یون کربنات فراهم می شود ولی این حقیقت، غالباً مشخص نمی شود و می تواند مشکلی در کنترل pH ایجاد نماید. به عنوان مثال یک تصور غلط وجود دارد که بذر سلول های حیوانی جدید، محیط را قلیایی می کند و این کار باعث افزایش pH می گردد. در حقیقت CO_2 اولیه از ظروف کشت به داخل محیط (اتمسفر) منتشر شده و باعث می شود که pH افزایش پیدا کند. بعضی از افراد از اسید هیدروکلریک (hydrochloric acid) رقیق برای کم کردن pH استفاده می کنند، ولی با یک حالت تنظیمی ظرفیت بافری آن بخوبی کم می شود.

این عقیده که بذرهای جدید کشت داده شده، محیط را قلیایی می‌کنند، از طریق اضافه کردن محیط به تنها یی در ظروف کشت رد شده است. اگر سلول‌ها وجود داشته باشند pH افزایش پیدا خواهد کرد و حتی به مقادیر بالا خواهد رسید. همچنین می‌توان در ظرف محیط کشت باز از بافرهای آلی استفاده کرد. یکی از روش‌ها نظیر سیستم بافری شامل N-⁹Mm⁹ می‌کربنات سدیم (NaHCO₃) و ۱۶Mm⁹ هیدروکسی متیل آمینومتان (hydroxyl methyl amino metan) است. متناویاً HEPES (2-Hydroxy Ethyl Piperazine-N-2-Ethane Sulfonic acid) ۱۴Mm⁹ می‌کربنات سدیم (HEPES) مجدداً با ۹Mm⁹ می‌کربنات سدیم استفاده می‌شود. بافرهای آلی از محلول استریل مادر که تحت pH=۷/۸ در ۲۵ درجه سانتی گراد تهیه شده‌اند اضافه می‌شوند.

هو د میکروبیولوژی (Laminar Air flow)

کلیه کارهای انجام شده جهت رشد و تکثیر سلول‌های هیپوفیز ماهی چالباش در شرایط استریل و عاری از میکروب‌ها انجام گردید. وجود فیلترهای HEPA (High Efficiency Particle) در این نوع هودها و عبور هوا با فشار از آن ذرات بزرگتر از ۰/۳ میکرومتر حذف شد و شرایط مناسب کار را فراهم آورده. البته قرار گرفتن هود دور از محل رفت و آمد و تراکم کمتر وسایل در زیر آن به ایجاد این شرایط مناسب کمک بیشتری می‌نمود. با توجه به جهت و مسیر هوا در این هودها آن‌ها به دو نوع عمودی و افقی و با در نظر گرفتن نوع کار، ایمنی و حفاظت از کارور به سه نوع کلاس یک و دو و سه تقسیم بندی می‌کنیم.

هو د میکروبیولوژی کلاس I

در این نوع هودها جریان هوا بصورت عمودی و یا افقی از فیلتر اصلی به طرف محصول و یا کارور می‌باشد و وجود جریان یکنواخت هوا در سطح میز کار حفاظت از محصول را تضمین می‌نماید هودهای تولیدی کلاس I در دو نوع اتفاک ایمنی و هودهای ستونی طراحی و ساخته شده. هودهای ستونی جهت نصب بر روی پرکن‌های داروئی (filing) و یا هر گونه فعالیتی که به محیط تمیز کلاس ۱۰۰ نیازمند باشد مورد استفاده قرار می‌گیرد.

هو د میکروبیولوژی کلاس II

در این نوع هودها با وجود ۲ یا ۳ سری فیلتر هپا شرایط مناسبی را جهت کارور، محصول و محیط فراهم می آورد. مسیر جریان هوا در این کلاس بصورت چرخشی و در جهت عمودی از طرف فیلتر هپا به سوی سینی دستگاه و به صورت آرام و با فشار منفی در سطح میز کار است. در هنگام کار هوای تازه به میزان ۳۰-۲۵ درصد جایگزین می گردد. فشار منفی که باعث ایجاد سد جریان هوا در مقابل کارور می شود به نحوی که مانع خروج آلودگی از داخل هود به خارج و نیز از خارج به داخل می گردد. بعضی از هودهای کلاس II دارای ۲ سری و بعضی نیز با سه سری فیلتر هپا و فضای کاری دو طرفه امکانات ویژه ای را برای فعالیت گروهی ایجاد می نماید.

هو د میکروبیولوژی کلاس III

در این نوع هودها فضای داخل هود با بیرون ارتباط مستقیم ندارد و سیستم تهويه کاملاً بسته است. در صورت استفاده از ویروس ها و پاتوژن های (pathogens) خطرناک می بايستی از این نوع هود استفاده شود.

انکوباتور CO_2

انکوباتور CO_2 معمولاً از محدوده گرمایی ۲۸ درجه (برای رده های سلولی حشرات) تا ۳۷°C (برای رده های سلولی پستانداران) با کنترل حرارت ۵/۰ ± درجه سانتی گراد کاربرد دارد (chen و همکاران ۱۹۸۷). وجود بی کربنات (bi carbonate) به عنوان بافر در محیط کشت سلول ها و وجود ۵-۱۰ درصد CO_2 از نیاز های اولیه سلول ها جهت رشد بود که این میزان CO_2 توسط انکوباتور و دستگاه حساس سنجش CO_2 تامین گردید. رطوبت ۶۰-۸۰ درصد داخل انکوباتور توسط یک ظرف حاوی آب مقطر تامین شده که جهت جلوگیری از رشد قارچ به آن مقداری سولفات مس اضافه گشت. فضای داخل انکوباتور از جنس استیل مرغوب بوده و شستشو و ضد عفونی دوره ای آن را بصورت مرتب انجام شد.

میکروسکوپ معکوس

این نوع میکروسکوپ با توجه به ساختار خود امکان استفاده از فلاسک های کشت سلول های هیپوفیز ماهی چالباش و رویت سلول های داخل آن را فراهم نموده. این امکان در میکروسکوپ های معمولی به علت پائین بودن فاصله کانونی عدسی شیئی مقدور نیست، لذا از میکروسکوپ معکوس جهت مشاهده روزانه وضعیت رشد و تکثیر سلول های هیپوفیز ماهی چالباش و کنترل آلدگی آن ها استفاده شد.



شکل ۲۵. بررسی سلول های هیپوفیز ماهی چالباش.

سانتریفیوژ

از سانتریفیوژ های یخچال دار در کشت سلول های هیپوفیز ماهی چالباش جهت جمع - آوری سوب روئی کشت ها سلولی و تهییه سلول ها جهت نگهداری و پاساز استفاده شد. جهت جلوگیری از تولید ذرات آتروسل (aero cells) از سانتریفیوژ محفظه (باغت) درب دار استفاده نمودیم.

یخچال و فریزر

جهت نگهداری محیط های کشت از یخچال ۲-۸ درجه و از فریزر ۲۰-۷۰ درجه نیز برای نگهداری سرم جنینی گوساله استفاده شد. استفاده از فریزرهای دارای سیستم خودکار دی فراست به دلیل نوسان دما که سبب خراب شدن سرم و یا دیگر مواد می گردد استفاده نشده.. از فریزر ۷۰- نیز جهت نگهداری سلول ها و ویروسها در مدت زمان کوتاه تا چند ماه استفاده می شود.

اتوکلاو و فور

جهت استریل کردن وسایل و ابزار مورد استفاده در آزمایشگاه بسته به نوع و جنس آن از اتوکلاو یا فور استفاده گردید. بهترین شرایط برای اتوکلاو کردن رعایت ۲۰ دقیقه زمان در ۱۵ پوند فشار و ۱۲۱ درجه حرارت است. وسایل شیشه ای و یا فلزی رانیز می توان به مدت ۱ ساعت در ۱۸۰ درجه دما در فور استریل نمود.

تجهیزات مورد نیاز جهت فیلتراسیون

با توجه به اینکه محیط های کشت سلول را نمی توان به وسیله حرارت استریل نمود، با استفاده از فیلترهای ۰۰۰ میکرومتر و عبور محیط های کشت از آن محیطی عاری از باکتری ها جهت کشت سلول های هیپوفیز ماهی چالباش استفاده شد.

ملاحظات دیگر در فرمولاسیون محیط های کشت

مواردی از قبیل حلالیت مواد، خلوص ترکیبات، ناپایداری شیمیایی، آب و اسمولاریتی، درجه حرارت، ویسکوزیتی و تنش سطحی از جمله فاکتورهای مهم در تهیه و فرمولاسیون محیط های کشت سلول هستند که به اجمال توضیح داده، خواهد شد.

حالات مواد

بسیاری از ترکیبات تشکیل دهنده محیط های مصنوعی به مقدار خیلی کم در آب حل می شوند. به عنوان مثال: تیروزین(tyrosine) فقط در حلال های اسیدی قابل حل است. لیپیدها می بایستی قبل از مخلوط شدن با آب در محلولهای الکلی حل شوند. کلسیم و فسفات جز در محلول های بسیار رقیق قابلیت حل شدن را ندارند چرا که در این صورت رسوب می کنند.

خلوص ترکیبات

ترکیبات مورد استفاده در تهیه محیط کشت سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش دارای استاندارد لازم برای کشت بافت و سلول بوده، و عاری از غلظت‌های بسیار کم فلزات سنگین که برای سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش سمی است. نمک‌های مورد استفاده در محیط کشت هیپوفیزی ماهی چالباش نیز کاملاً عاری از این قبیل عناصر فلزی بودند. عناصر معدنی دیگری نظری روی، منگنز و کربالت برای رشد سلولی ضروری بوده ولی در غلظت‌های بسیار کم مورد نیاز هستند که عمدتاً به مقدار کافی و به عنوان ناخالصی سایر نمک‌ها به محیط‌های کشت هیپوفیزی ماهی چالباش وارد شدند.

ناپایداری شیمیابی مواد

گلوتامین معمولاً به صورت پودر خشک نگهداری می‌شود اما به شکل محلول می‌بایستی جهت جلوگیری از تجزیه در فریزر نگهداری شود. این ماده به عنوان ناپایدارترین اسید آمینه ضروری به سرعت به اسید کربوکسیلیک پیرولیدین (acid carboxylic pirolidin) و آمونیوم (ammonium) تجزیه می‌گردد. به همین دلیل گلوتامین به عنوان آخرین ماده به محیط کشت سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش اضافه شد و به مرور زمان و به صورت منظم جهت حفظ غلظت آن تجدید گردید.

بسیاری از اجزاء محیط کشت نباید به صورت همزمان حرارت داده شوند. به عنوان مثال اگر سیستئین (cystein) و اسید اسکوربیک در محلول همزمان اتوکلاو شوند، اسید اسکوربیک اکسیده شده و تخریب می‌گردد. همچنین گلوکز (glucose) و اسید اسکوربیک هر دو در محلول‌های قلیایی از بین می‌روند.

آب

آب معمولی دارای مقادیر فراوانی یون است که برای سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش سمی هستند. همچنین ممکن است حاوی اندوتوكسین (endotoxin) آزاد شده از باکتری‌های گرم منفی باشد. جهت فرمولاسیون محیط کشت هیپوفیزی ماهی چالباش از آب دو بار تقطیر و دیونیزه استفاده شد. دیونیزه (آب از میان مخلوطی از دانه‌های رزینی عبور کرده و سپس در شیشه تقطیری گردد).

اسمولاریته

رده های سلولی استاندارد و ثبت شده می توانند نوسانات شدید در فشار اسمزی محیط را تحمل کنند. بر عکس سلولهای تازه جدا شده هیپوفیزی ماهی چالباش که در مراحل ابتدایی کشت بودند به این تغییرات حساس بوده و فقط با اسمولاریته کنترل شده قادر به رشد بودند. سلولها جهت رشد به فشار اسمزی بین $280-320$ Osm/lit نیاز داشتند. اگرچه اسمولاریته ایده آل در حدود $290-300$ Osm/lit بود، به منظور رسیدن به pH مناسب HEPES را به محیط اضافه شد، مقدار برابر از غلظت سدیم کلراید (sodium chloride) نیز به منظور افزایش فشار اسمزی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید (Ranga, 2002):

فرض می کنیم که ۱ میلی گرم NaCl در میلی لیتر برابر با تغییرات فشار اسمزی به میزان 32 mOsm باشد

D-O/32=X

در این فرمول D، فشار اسمزی ایده آل، O فشار اسمزی مشاهده شده و X برابر با مقدار NaCl بر حسب میلی لیتر است که جهت حفظ فشار اسمزی ایده آل اضافه و یا کم می شود. با این پیش فرض که ۱ میلی لیتر میلی لیتر باعث تغییر غلظت NaCl در محیط به میزان یک میلی گرم در میلی لیتر می شود.

دما

تأثیر مستقیم دما بر سلولها امری بدیهی است. اما علاوه بر این، تاثیر غیر مستقیم دما بر pH محیط از طریق افزایش حلالیت CO_2 در دماهای پایین حائز اهمیت می باشد. همچنین مقدار PK_a بافر موجود در محیط کشت و درجه یونیزه شدن اجزای تشکیل دهنده سرم مستقیماً تحت تاثیر میزان دما می باشد. pH یک محیط در شرایط عادی و در درجه حرارت اتاق به میزان $20/2$ واحد کمتر از حرارت 37 درجه خواهد بود. شایان ذکر است که فل رد به عنوان نشانگر pH جهت مشاهده تغییرات pH به محیط های کشت اضافه می شود که در صورت نبود سرم در محیط حتی به میزان 0.005% تا حدودی اثرات سمی خواهد داشت.

ویسکوزیته

ویسکوزیته محیط های کشت سلول های هپوفیز ماهی چالباش عمدتاً تحت تاثیر میزان سرم موجود در آنها بوده و تاثیر حیاتی بر رشد سلولها نداشته اگرچه در شرایط به هم خوردن سوپرناتانت سلولی (به عنوان نمونه در شرایط پتیاژ کردن سلولها) ویسکوزیته محیط نقش مهم و حیاتی در جلوگیری از آسیب رسیدن به سلولها بازی نموده است. در مقیاس کلان کشت این آسیب ها می تواند از طریق افزودن کربوکسی متیل سلولوز (carboxy methyl cellulose) و یاپلی و ینیل پیرولودین (Poly vinyl pirolydine) به محیط کشت (جهت افزیش ویسکوزیته) کاهش یابد. این روش بخصوص در شرایط کشت با غلظت سرم اندک (برای مثال در راکتورهای مقیاس بزرگ و دارای همزن) اهمیت فراوان می یابد.

تنش(کشش) سطحی و کف کودن محیط

کاهش تنش سطحی در محیط های کشت می تواند باعث افزایش چسبندگی سلولها به سطوح مورد نیاز گردد. همچنین ایجاد کف معمولاً در محیط های دارای سرم دیده می شود که می تواند باعث دنا توره شدن پروتئین و غیرفعال شدن آنزیم موجود در محیط گردد. اگر کف ایجاد شده به گردن و یا دهانه ظرف کشت برسد، ریسک آلدگی میکروبی را به مقدار زیاد افزایش خواهد داد. یکی از راههای کاهش کف در کشت های شناور که در معرض مخلوط هوا و CO₂ قرار دارند استفاده از مواد ضد کف سیلیکونی در ورودی هوا و CO₂ به محیط کشت است.

ترکیبات مغذی در محیط های کشت سلول های جانوری

در این بخش به معرفی اجمالی ترکیبات غذایی در محیط های کشت پرداخته خواهد شد. این ترکیبات به چهار گروه اصلی طبقه بندی می شوند:

اسیدهای آمینه، پیش سازهای اسیدهای نوکلئیک، منابع کربنی، ویتامین ها

اسیدهای آمینه

اسیدهای آمینه ضروری انواعی از اسیدهای آمینه هستند که قادر به ساخته شدن از مواد اولیه توسط ارگانیسم های هتروتروف نیست. این اسیدهای آمینه به همراه تیروزین و سیستئین می باشند به محیطهای

مصنوعی، حتی اگر محتوی سرم باشد اضافه گردند. به طور کلی نیازمندی های خاص بنای نوع و شرایط کشت متفاوت است. به عنوان مثال اسیدهای آمینه غیر ضروری ممکن است به دلیل عدم توانایی سلولها در سنتر مقادیر کافی از آنها به محیط اضافه شود. غلظت تراکم اسیدهای آمینه تاثیر مستقیم بر تولیدات و رشد سلولها دارد به طوری که کمبود این مواد باعث جلوگیری از تقسیم سلولی افزایش فعالیت های لیزوژومی، مرگ سلولی و القای آسیب های کروموزومی می گردد. همچنین عدم تعادل در غلظت آمینواسیدها می تواند باعث ایجاد تغییرات کاریوتایپی گردد. بیشترین مصرف اسیدهای آمینه در طی دوران فاز تاخیر در سیکل سلولی اتفاق می افتد و سیستئین، گلوتامین، ایزولوسین (iso Lucien) و سرین (serine) به سرعت مصرف می گردد. گلوتامین بوسیله اکثر سلولها مصرف شده و مقادیر فراوانی انرژی و کربن تولید می نمایند. اگرچه برخی سلولها اسید گلوتامیک (glutamic acid) را ترجیح می دهند. این اسید آمینه جز ناپایدارترین انواع ترکیبات بوده و به سرعت و به شکل منظم می باشد در محیط تجدید گردد. گلوتامین همچنین در تولید مولکولهای مؤثر در چسبندگی سلولی نقش مهمی ایفا می نماید.

پیش نیازهای ساخت اسیدهای نوکلئیک

آدنوزین، گوانوزین، سیتیدین، یوریدین . تیمیدین بخصوص در صورتی که ذخیره اسیدفولیک (folic acid) در کشت هایی با چگالی پائین کم باشد به محیط کشت افزوده می شوند. محیط ۱۹۹ به طور خاص قادر است اسیدفولیک بوده و پیش نیازهای ساخت اسیدهای نوکلئیک می باشد که صورت کمکی به آن اضافه شوند.

منابع کربنی

بیشترین منبع انرژی از کربوهیدرات ها تأمین می شود، که شامل گلوکز و گالاكتوز (galactose) می باشد. در برخی از محیط های کشت از مالتوز (maltose) نیز استفاده می شود. رشد سلولی وابسته به وجود منابع کربنی به خصوص گلوکز و گلوتامین می باشد. اگر گلوکز مورد استفاده قرار گیرد یک منبع کمکی پیرووات (pirovat) نیز ضروری می باشد.

ویتامین ها

سرم یک منبع اساسی در تأمین ویتامین در کشت سلولی می‌باشد، با این حال در بسیاری موارد برخی از ویتامین‌ها به آن افزوده می‌شود. ویتامین‌ها به عنوان پیش‌ساز بسیاری از کوفاکتورها (co factors) شناخته شده است. بسیاری از ویتامین‌ها مانند ویتامین‌های گروه B در رشد و تکثیر و ویتامین B₁₂ برای بقای سلول‌ها بسیار حائز اهمیت است. برخی از رده‌های سلولی به ویتامین E و A بیشتری نیاز دارند. ویتامین‌های بیوتین (biotin) و تیامین (thiamin) در اغلب محیط‌های کشت استفاده می‌شوند.

از کاربردهای دیگر ویتامین‌ها می‌توان از نقش آنها در چسبندگی سلول‌ها نام برد. به عنوان مثال، رتینوئیدها (retinoids) عامل مؤثری در چسبیدن سلول‌ها به سطوح بوده و حتی می‌توان از غلظت‌های بالای آنها در حد ۱ میلی گرم در میلی لیتر در آغاز کشت استفاده کرد. غلظت‌های پائین این ماده در ادامه کشت و جهت حفظ شرایط کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مقادیر کافی کولین (choline) جهت شرکت در ساختمان غشای فسفولیپیدی سلول‌ها لازم می‌باشد و کمبود این ویتامین باعث مرگ سلولی می‌گردد. کولین به مقدار کافی در سرم موجود می‌باشد و فقط در صورت استفاده از محیط‌های بدون سرم SFM به صورت کمکی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

اسیداسکوریک (ویتامین C) ترکیبی ضروری برای بیشتر سلول‌ها بوده و فقط در صورتی که کشت ویروس‌های RNA دار توموری مورد نظر باشد می‌باشد از محیط کشت حذف گردد.

پروتئین‌ها و پپتیدها

در سرم پروتئین‌های ضروری وجود دارند و در برخی موارد پروتئین‌های افزودنی نظری آلبومین (albumin)، ترانسفرین (transferin)، فیرونکتین (fibronectin) و فیتوئین (fitoxin) نیز به محیط کشت افزوده می‌شود.

اسیدهای چرب و لیپیدها

اسیدهای چرب و لیپیدها (lipids) در سرم حضور دارند و بسیار حائز اهمیت می‌باشند، اما بسیاری از سلول‌ها به کلسترول (cholesterol) و استروئید (steroid) افزودنی نیز نیازمند می‌باشند.

عناصر کمیاب

عناصر کمیاب مانند روی، مس، سلنیوم (selenium) و اسید تری کربوکسیلیک (acid tri carboxylic) سبب رفع مسمومیت و دفع رادیکال های اکسیژن می شود.

پلیمرها

پلیمرها ترکیباتی با وزن مولکولی بالا هستند که برای رشد سلول ها در تراکم های پایین ضروری می باشند. پلیمرها رشد و بقای سلولی را از طریق جلوگیری از آسیب های مکانیکی بهبود می بخشنده ولی به خودی خود نقشی در رشد ندارند. Ficoll 400, Dextran T70, Dextran-T-500 و متیل سلولز به عنوان پلیمر در محیط های کشت مورد استفاده قرار می گیرند.

نقش سرم در کشت سلول

سرم مخلوط پیچیده ای از مولکولهای کوچک و بزرگ با فعالیت های ممانعت کننده یا محرک رشد سلولی هستند. سرم ها به دلایل ذیل به محیط های کشت افزوده می گردند:

- تامین فاکتورهای هورمونی جهت بهبود عملکرد و رشد سلولها
- تامین فاکتورهای چسبندگی و پراکندگی سلولها
- تامین پروتئین های انتقالی جهت حمل هورمون ها، مواد معدنی، چربی ها و ...

در زیر به طور خلاصه اجزاء سرم شرح داده می شود:

فاکتورهای رشد

بسیاری از فاکتورهای رشد به مقدار کم، معمولاً در حد نانوگرم و پیکوگرم در میلی لیتر در سرم موجود می باشند برخی از این فاکتورها مانند Colony Stimulating Factor (CSF) اختصاصاً در مراحل از تمایز سلولی عمل می کنند. برخی دیگر نظیر EGF به صورت تزایدی بر انواع مختلف سلولها اثر کرده و باعث تکثیر سلولهای فیبروبلاست اپیدرمی و سلولهای گلیال می گردند. ازسویی دیگر ممکن است یک سلول خاص به تعداد زیادی فاکتورهای رشد پاسخ دهد.

مثلاً فیروبلاست ها به فاکتورهای نظیر EGF، PDGF، Fibroblast Growth Factor، FGF و سوماتومدین (sumatomedin) پاسخ می‌دهد. نیاز سلولها به فاکتورهای رشد و اثر این مواد بر روی سلولها، مسئله‌ای بسیار پیچیده بوده به طوری که نقص دانش ما در این زمینه باعث شده است که بجای استفاده از مقادیر مشخص این مواد از مخلوطهای پیچیده مانند سرم که حاوی تمامی این ترکیبات است استفاده شود.

هورمون ها

انسولین هورمونی ضروری برای کشت تقریباً تمامی سلولها است. این هورمون با نیمه عمر بسیار کوتاه نسبت به غیرفعال شدن با سیستئین حساس بوده و به مقادیر بالا در محیط های کشت استفاده می‌شود. هورمون های گلوکورتیکوئیدی (glucocorticoid) نظیر هیدروکورتیزون (hydrocortisone) و دکساماتازوم (dexametasom) بسته به نوع سلول می‌توانند به عنوان ممانعت کننده و یا محرک رشد عمل نمایند. دیگر هورمون های استروئیدی، مانند استرادیول (stradiol)، تستوسترون، پروژسترون (progesterone) و هورمون های تیروئید (thyroid) در کشت برخی دودمان های سلولی جزئی ضروری بحساب می‌آیند.

فاکتورهای پراکنده‌گی و چسبندگی سلولی

بیشتر سلولهای دستکاری نشده (از نظر ژنتیکی) برای رشد و تکثیر می‌بایست به یک سطح جامد متصل شوند. فقط سلول های خونی و سلول های دستکاری شده (Transformed) بدون اتصال به سطوح می‌باشند. کندروتکین (condrotokin) جزء ضروری برای چسبیدن کندروئیت ها و لامینین (laminin) ترکیب لازم برای چسبندگی سلولهای اپیتیال هستند. فیرونکتین (fibronectin) از دیگر اجزای دخیل در اتصال سلولی است.

پروتئین های دخیل در چسبندگی

فاکتورها و ترکیباتی با وزن مولکولی پایین برای ورود به سلول نیازمند اتصال به پروتئین های حامل هستند. آلبومین به عنوان حامل ویتامین ها، لیپیدها و هورمون ها به داخل سلول و ترانسفرین به عنوان حامل و انتقال‌دهنده آهن نمونه چنین پروتئین هایی هستند.

اسیدهای چرب

سلولها نیازمند مقادیر متفاوتی از اسیدهای چرب ضروری، فسفولیپیدها و کلسترول هستند. پروستاگلندین E و آلفا به همراه EGF و دیگر فاکتورهای رشد در رشد سلولی نقش مهم و حیاتی دارند.

کشت سلولی

روشهای کشت یاخته علم سابقه داری است که از آغاز قرن اخیر تا کنون با سرعت قابل توجهی راه توسعه و ترویج را پیموده است ، طوری که امروزه به ابزاری ضروری در تحقیقات زیست شناسی مولکولی ، ویروس شناسی ، ایمنی شناسی ، مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی تبدیل شده است ، نیاز به علم و دانش کشت یاخته در آینده نزدیک محسوس تر خواهد شد زیرا اقتصاد کشور ما مشابه کشورهای در حال توسعه وابسته به پیشرفت دانش فن آوری زیستی و به کاربرد فرآورده های بیولوژیک می گردد ، با افزایش دانش یاخته شناسی و بکارگیری یافته های پژوهشگرانی که در زمینه کشت یاخته های اختصاصی (تیره سلولی) گام برداشته اند ، تولید فرآورده های بیولوژیک در راکتورهای کشت یاخته ای در حد انبوه واقعیت پیدا کرده است ، در کشورمان بجز کشت بافت و یاخته آبزیان ، سایر رده های حیوانی (موس، هامستر، جوجه،.....) و بافت های انسانی کشت می گردد و این نقیصه با کشت انبوه یاخته های تیره ای آبزیان اقتصادی کشور تکمیل می گردد و این فرآیند ضمن خود کفایی مملکت و بالابردن درآمد ملی باعث رفع نیازهای تحقیقاتی بیوتکنولوژی ، و کشت سلولهای دودمانی تولید فرآورده های بیوتکنولوژی اختصاصی نظری تولید هورمون رشد ماهی، شناسایی ژن رشد آبزیان و انتقال ان به ماهیان کم رشد ، شناسایی ، جداسازی عوامل ویروسی بیماریهای آبزیان می گردد ، بجز چند استثنا ، ویروسهای آبزیان فقط می توانند در بدن ماهی یا در کشت های سلولی آبزیان تکثیر پیدا نمایند . تاکنون کشورهای پیشرفته تنها هفت نوع تیره سلولی آبزیان تولید نموده اند که تنها بافت های محدود دو نوع آبزی پرورشی آنها با آبزیان پرورشی ما مشابه است (بافت اپی تلیال کپور معمولی و بافت گوناد ماهی قزل آلای رنگین - کمان) لذا تولید یاخته های اختصاصی آبزیان با اهداف ذیل باعث اطمینان از سرمایه گذاری و بالا بردن ارزش افزوده آبزیان و ایجاد امنیت غذایی کشور می گردد.

کشت سلول جانوری و کشت بافت برای اولین بار در سال ۱۹۰۷ توسط Rose Harrison با استفاده از بافت قورباغه انجام گردید(۶). روش های عملی و مقایسه ای برای سلول های ماهیان و کشت بافتی توسط Wolf و Ahne

(۱۹۸۲) Wolf و Quimby (۱۹۶۹) ارائه شده است. همچنین نیازهای اساسی برای کشت سلول‌ها از ماهی، دوزیستان و خزندگان توسط محققی به نام Clark (۱۹۷۲) با توجه به روش‌های مقایسه‌ای آن‌ها ارائه گردیده است. مباحث کوتاهی از تریپسین‌دهی بافتی در ماهیان توسط Mckenzie و Stephenson (۱۹۷۳)، Sigel و Beasley (۱۹۷۳a,b) و Wolf (۱۹۷۴) عنوان شده است. Bachmann و Ahne (۱۹۷۴) جزئیات قابل توجهی از روش‌های آماده سازی کشت سلولی استاندارد به وسیله تریپسین‌دهی بافت‌های جدا شده از ماهیان گرم آبی (کپور) و گونه‌های سرد آبی (قزل آلای رنگین کمان) را توصیف کرده‌اند.

کشت لکوسیت‌های ماهی توسط Etlinger و همکاران (۱۹۷۶)، Sigel و همکاران (۱۹۷۳) و Wolf (۱۹۷۶) توصیف گردیده است. Quimby (۱۹۷۶) سلولهای عصبی در انتخاب سوبستراها یاشان نسبت به سایر سلولها مشکل پسندتر می‌باشد Nelson و Lieberman (۱۹۸۱). آنها روی شیشه یا پلاستیک عمل آوری نشده و زنده نمی‌مانند اما در کلاژن و در پلی D-لیزین، برآمدگی ناشی از التهاب و آماس عصبی را نشان می‌دهند (Jacobson و Ebendal، ۱۹۷۷ و ۱۹۷۹).

کشت بافت‌های جدا شده

کشت بافت به طور لفظی روشی است که به وسیله آن قطعات کوچکی از اندام‌ها در شرایط آزمایشگاهی رشد پیدا کرده و زیاد می‌شوند. بافت‌هایی نظیر قلب، باله، پوست، تخدمان، قرنیه، کیسه شنا یا کلیه‌ها به قطعاتی که بزرگتر از 2mm نیستند بریده شده و به ظروف کشت منتقل می‌شوند. جهت مراقبت و نگهداری از آن‌ها در محیط، برای مشاهده میکروسکوپی بایستی به آن‌ها اجازه داد که به بنیاد یا طبقه زیرین برای مدت ۳۰ دقیقه بیشتر بچسبند. بافت‌های منتقل شده ممکن است در پلاسمای جوجه که برای ایجاد لخته به همراه عصاره جنین به دست آمده قرار گیرند، بنابراین یک سطح چسبنده فیزیولوژیک شفاف فراهم می‌شود. یکی از دو نمونه در هر سانتی‌متر مربع از منطقه رشد معمولاً ورقه‌های سلولی تولید می‌کند که به طور مؤثری برای بسیاری از کارهای ویروسی قابل استفاده است. باله، پوست و قرنیه وقتی منتقل می‌شوند معمولاً مهاجرت ماکروفاژها و سلول‌های اپی‌تیالی را در خلال یک محدوده چند ساعته نشان می‌دهند. گرچه در خلال تولید این ورقه‌ها تقسیم می‌توز بسیار ناچیز و بی‌اهمیت است، ورقه‌های یکنواخت سرعت به وسیله حرکات در سطوح بیرونی سلول‌های اپی‌تیال تکامل پیدا می‌کنند. وقتی ورقه‌ها به اندازه مناسب رسیدند کشت می‌تواند تلقیح شود. لایه‌های مشخص

شده از اپیتیلیوم مهاجرت کرده معمولاً یک منطقه مشخصی دارند که گسترش پیدا کردن در آنجا انجام نمی‌گیرد. ضمناً سلول‌ها شیوه فیروblast ظاهر شده که نشان دهنده فعالیت میتوزی بوده و معمولاً طول عمر زیادی دارند. کشت‌های منتقل شده از کیسه شنای ماهیان انقباضات عضلانی ریتمی و ضربان مژه‌ها را برای چندین ماه نشان می‌دهند و بافت‌های قلبی زنده مانده و برای سال‌ها ضربان دارند. آماده سازی کشت بافت‌های جدا شده زمانی مناسب هستند که فقط مقدار کمی از بافت در دسترس باشد. این روش زمانی کاربرد واقعی بیشتری خواهد داشت که تیره‌های سلولی به طور فوری در دسترس نبوده یا وقتی که به دلایلی ویژگی‌های میزبانی برای همانندسازی ویروسی نامناسب باشد.

امروزه در آزمایشگاه‌های کشت سلول از سه نوع رده سلولی استفاده می‌شود:

Primary cell culture	۱- کشت سلول نخستین
Diploid cell culture	۲- کشت سلول دیپلوبلاستیک
Continuous cell culture	۳- کشت سلول رده پیوسته

۱. کشت سلولی یک لایه‌ای اولیه(Primary Monolayer Cell Culture)

تکه‌ای از بافت، نظیر هیپوفیز ماهی چالباش، را که از اندام مشخصی جدا شده، و به همراه آن عروق خونی و بافت پوششی متصل است و این ضمایم در اولین مرحله کشت ۱ تا ۲ روز زنده خواهد بود، خیلی سریع به محیط کشت اولیه منتقل نموده. بسیاری از سلول‌های همراه بافت نظیر سلول‌های خونی پس از دو تا سه روز از بین رفته اما برخی از سلول‌ها نظیر نرون‌های عصبی تا ماه‌ها زنده مانده و پس از قرار گرفتن در شرایط مناسب تقسیم می‌گردند، پس از آن که تعداد آن‌ها به چندین برابر برسد می‌توان آن‌ها را پاساژ داده، که سلول‌های پاساژ داده شده رده سلولی اولیه(Primary Cell Line) نامیده می‌شوند.

رده سلولی اولیه به دلایل زیر بسیار حائز اهمیت می‌باشند:

۱. زیرا از این رده سلولی در مراحل بعدی استفاده می‌شود و به منظور نگهداری رده سلولی اولیه هزینه پرداخت می‌شود.

۲. در تولید واکسن و بررسی‌های آزمایشگاهی از رده سلولی اولیه استفاده می‌گردد.

۳. از رده سلولی اولیه در زمان کوتاهی می‌توان حجم عظیمی از بافت را تولید نمود.

۴. رده سلولی اولیه با دوام می‌باشد و در محیط کشت به راحتی قابل انتقال و رشد می‌باشند.

۵. حساسیت رده سلولی اولیه نسبت به ویروس‌های عفونت‌زا.

۶. استفاده و کشت سلول‌های اولیه اصلی مفید نبوده.

۷. سلول‌های اولیه ممکن است به صورت نهفته حامل ویروس باشند.

۸. سلول اولیه قادر به تحمل آزمایش‌های بیولوژیک زمانبر و طولانی مدت نمی‌باشند.

رده سلول‌های اولیه به سرعت تقسیم شده و بارها قابلیت پاساژ را دارا می‌باشند. هرچند پس از چندین بار پاساژ

رده سلول‌های اولیه به دلیل تکثیر وارد فاز مرگ می‌شوند. گاهی رده سلول‌هایی توانایی این را دارند که بارها

کشت داده شوند به این سلول‌ها، رده سلولی ثابت (Established Cell Lines) می‌گویند، طبق قوانین رده سلول‌های

ثابت به دسته‌ای از سلول‌ها اطلاق می‌شود که حداقل ۷۰ بار هر ۳ روز یکبار توانایی کشت را داشته باشند. تهیه سلول‌های

ثابت از طریق رده سلول‌های اولیه و طی فرآیند تولید سلول‌های تبدیل شده (Cell alteration or transformation) انجام

می‌گردد. فرآیند عمل به این ترتیب می‌باشد که در رده سلول‌های اولیه برخی از کلونی‌های سلولی نسبت به سایر سلول‌ها با

سرعت بالاتری رشد می‌کنند که این گروه از سلول‌ها همان سلول‌های تبدیل شده (Cell alteration or transformation) می‌باشند،

که نسبت به سایر سلول‌ها زودتر بزرگ می‌شوند و بر سایر سلول‌ها غالب می‌گردند. نکته قابل توجه آن است که سلول‌های

ثابت که به این طریق فراهم می‌شوند نسبت به سلول‌های رده اولیه دستخوش تغییراتی می‌شوند، تمام سلول‌های - رده‌ی

اولیه از لحاظ تعداد کروموزوم یکسان می‌باشد اما سلول‌های ثبت شده معمولاً از لحاظ تعداد کروموزوم

دستخوش تغییراتی می‌گردد.

مقایسه رده سلولی ثابت با سلول‌های اولیه:

۱. زمان دوبرابر شدن آن‌ها بسیار کوتاه می‌باشد، حدود ۱۲ تا ۲۰ ساعت به طول می‌انجامد.

۲. نیازهای غذایی مشابه سلول‌های اولیه می‌باشد.

۳. بسیار متراکم‌تر از سلول‌های رده اولیه می‌باشند.

۴. از لحاظ جهت‌گیری سه بعدی یکسان نمی‌باشند.

۵. به ندرت فعالیت‌های تخصصی از خود نشان می‌دهند.

۶. آن‌ها اغلب در محیط‌های کشت رقیق نیز رشد می‌کنند.

سلول های بسیاری از اعضاء را می توان در محیط خارج از بدن کشت داد برای این منظور تکه های کوچک چند میلی متری از نسج مورد نظر را بدون ایجاد آلودگی و تحت شرایط آسپتیک تهیه می شود و پس از چند بار شستشو با محلول های مغذی چون ارل و هنکس با محلول رقیق تر تریپسین مجاور می گردد و در حرارت ۳۷ درجه سلول و تریپسین را هم می زنند. به علت اثر پروتئولیتیک آنزیم تریپسین بر اتصال پروتئین بین سلول ها، قطعات نسج شکسته شده و سلول ها در محل آزاد می شوند. سپس این سلول های آزاد شده را به طریق سانتریفیوژ جدا می شود و پس از شستشو با محلول های مغذی فوق در محیط های کشت مخصوص به همراه متابولیت های لازم شامل املاح، ویتامین ها، گلوکز و اسیدهای آمینه در کنار ۲۰-۱۰ درصد سرم جنینی گوساله کشت می دهند.

حال اگر این سوسپانسیون سلول ها بر سطح شیشه بطری و یا فلاسک کشت سلول ته نشین شده و پس از آن تکثیر یافته باشد، می تواند به صورت یک ورقه تک لایه سلولی به آن بچسبد و تمام سطح آن را پوشاند در این مرحله تقسیم سلولی نیز متوقف می شود (Contact inhibition) حال کشت سلولی ایجاد شده را می توان مجدداً تحت تأثیر تریپسین قرار داده و پس از جدا شدن سلول ها به بطری ها یا فلاسک های دیگر انتقال داد با این عمل که اصطلاحاً پاساژ نامیده می شود می توان کشت سلولی را زیاد نمود. عمل پاساژ کشت سلولی در مورد اغلب نسوج محدود بوده و پس از چند بار پاساژ قدرت تکثیر سلول ها از بین می رود. به این نوع کشت های سلولی نخستین Primary cell culture می گویند.

تهیه تیره های سلولی فواید زیادی را در ویروس شناسی ماهیان فراهم می کند ولی گاهی اوقات کشت های اولیه یک لایه ای اصلی نه فقط حساس و قابل دسترس هستند بلکه برای سیستم های آزمایشگاهی بسیار مناسب می باشند. زیرا کشت های اولیه معمولاً انواع متعددی از سلول ها را ارائه می کنند و به طور کلی حساسیت آنها به ویروس ها بیش از حدی است که تیره های سلولی دارند. همچنین ویژگی میزان عامل مهمی است. همانطور که توسط Wolf و Mann (۱۹۸۰) نشان داده شده اختلافات واضحی در دسترسی به جانشین کردن تیره های سلولی ماهیان از خانواده های مهم مانند Serranidae (مانند باس دریایی) و خانواده Pleuronectidae (مانند کفشک ماهی راست رو) وجود دارد. بعضی از ویروس های ماهیان به طور مجزا ویژگی بالایی برای سلول های یک تیپ ظاهری ساده دارند. به عنوان مثال ویروس bluegill lanfosistic فقط در سلول هایی که شکل ظاهری

آن‌ها شبیه فیبروبلاست باشد همانندسازی می‌کنند. تمام این محدودیت‌ها از نقطه نظر کشت بافتی این نیاز را برای کشت‌های یک لایه‌ای اولیه می‌رساند. حداقل برای بعضی از کاربردها این حالت وجود دارد.

دو روش کلی برای تهیه کشت‌های یک لایه از سلول‌های ماهیان وجود دارد: روش اول روش مکانیکی و دومین روش (که بیشتر هم استفاده می‌شود) به وسیله هضم آنزیمی با استفاده از تریپسین می‌باشد. در هر دو حالت بافت‌ها به وسیله روش‌هایی که خطر آلودگی میکروبی در آن حذف یا کم می‌شود، به دست می‌آیند. در ادامه به راهنمایی به دست آوردن بافت‌ها اشاره می‌شود:

به طور کلی برخلاف پوست مهره‌داران خشکی‌زی، پوست ماهیان شامل فقط با یک لایه نازک از میکروفلور طبیعی محافظت می‌شود. گرچه انگل‌های خارجی ممکن است حضور داشته باشند و مشکل ایجاد کنند. از باله، سیلیک و بافت‌های قرنیه می‌توان برای کشت استفاده کرد و به طور کلی به خوبی رشد می‌کنند. تمیز کردن اولیه بافت‌ها بایستی شامل غوطه‌ور کردن آن‌ها در آب سرد یا خنک (ترجیحاً آب کلرینه) باشند. احتیاطات در تهیه باله و دیگر بافت‌های خارجی شامل اجتناب از آلودگی و آزردگی و همچنین جلوگیری از بیرون آمدن غذا یا مدفعه بایستی صورت گیرد. کاری که خوب طراحی شده باشد شامل پرهیز در غذادهی به ماهی به مدت چند روز قبل از تهیه بافت می‌باشد.

آن‌تی‌بیوتیک‌های متعددی خاصیت باکتری‌کشی داشته و در جلوگیری از آلوده شدن بافت‌های ماهی مؤثر می‌باشند. در معرض قرار دادن بافت‌های خارجی به غلظت‌هایی از پلی‌میکسین (polymixin) به مقدار ۱۰۰۰ IU/ml ۲۰۰۰IU/ml به مدت یک ساعت در کاهش آلودگی قبل از تهیه سلول‌ها، جهت کشت مفید خواهد بود. به طور مشابه استفاده از Neospon که به طور تجاری تهیه می‌شود و همچنین استفاده از مخلوطی از سه آنتی‌بیوتیک باکتری‌کش که به عنوان یک روش حمام در غلظتی معادل ۵۰۰ IU/ml پلی‌میکسین-B، ۵۰۰ میکروگرم neomycin و IU و از Zinc Bacitracin در هر میلی‌لیتر مفید است. روش درمان در آب سرد (۴-۱۰°C) درجه سانتی‌گراد) در مورد بافت‌ها یا کل بدن نوزادانی که تغذیه نشده‌اند و یا در مورد لاروها، به مدت ۱-۲ ساعت بایستی صورت گیرد. این کار از طریق غوطه‌وری و استریل و یا BSS صورت می‌گیرد. برای بافت‌های داخلی باید از یک روش Aseptic دقیق برای به دست آوردن اندام‌های مورد نظر استفاده نمود. ضدغ Fonی کردن موضعی نیز بایستی صورت گیرد. غوطه‌وری کامل در محلول‌های ضدغ Fonی کننده اغلب

عملی می باشد. مقدار ۵۰۰ ppm کلر که از محلول هیپو کلریت سدیم (hypo cloric sodium) یا کلسیم (Mحلول های بلیچ خانگی) به دست می آید، به عنوان یک حمام چند دقیقه ای مؤثر می باشد. استفاده از محلولی با غلظت ۱/۱۰۰۰ از کلرید بنزالکانیوم (benzene colorid alkanium vocal) و کال یا (زفیران) نتایج رضایت بخشی می دهد. هر دو ترکیب چهارتایی آمونیوم برای بافت های زنده سمی بوده بنابراین از ضد عفونی کردن بیش از حد بایستی اجتناب شود. یکی از روش های استفاده از اتانول ۷۰٪ یا ایزو پروپانول برای روش غوطه وری می باشد ولی اگر دیگر ضد عفونی کننده ها در دسترس نباشند می توان از الکل به عنوان یک محلول ضد عفونی کنند بی نظر استفاده کرد. به هر حال الکل باعث آگلو تینه شدن سریع اجزا پوست شده و احتمالاً مؤثر خواهد بود.

Ingredient	No.of volumes
Phosphate-buffered saline (PBS)	34
Trypsine or pancreatic solution	4
Serum (fetal bovin)	optionall
Antibiotic solution	1 topitionall

جدول ۶. اجزای مایع هضم کننده بافت ماهی (Wolf, K., 1988)

* محلول ذخیره برای پنی سیلین و استرپتومایسین (IU ۱۰۰۰۰ Mg/ml و ۱۰۰۰۰۰ Mg/ml) است
و محلول ذخیره برای جنتامایسین (۲۰۰۰ Mg/ml) است

مراقبت های لازم برای کشت های یک لایه اولیه

یکی از عوامل نامساعد برای کشت های اولیه این است که این کشت ها ممکن است محل پرورش عوامل بیماریزا شوند. همانند مروری که به وسیله Bullock و Sniezsko (1969) با دقت و مدارک کافی ارائه شده و تعداد معنی داری (بیشتر از ۲۶٪ بعضی نمونه ها) از هچریهایی که از نظر ظاهری سالم هستند بعضی اوقات مقادیر کمی از باکتری را نشان می دهند.

آن تی بیوتیک هایی که در محیط کشت استفاده می شوند مانع از رشد فلور میکروبی می گردد به هر حال ویروس ها از بین نمی روند و اگر مواردی نظیر ویروس عامل IPN وجود داشته باشد باعث تخریب کشت های اولیه می شود. افراد محتاط سعی می کنند قبل از تهیه کشت سلولی از بافت ها، تاریخچه سلامت ماهیان را گرفته باشند که باید از نظر ویروس IPN یا هر بیماری ویروسی دیگر عاری بوده باشند.

۲- کشت سلول های دیپلوئید: (Diploid cell culture)

تحت شرایط خاص و با استفاده از نسوج مخصوص چون پوست، شش، کلیه و میوکارد می توان کشت های سلولی تهیه نمود که پاساژ آن ها به چند بار محدود نبوده و در حدود یک سال قابل پاساژ می باشد و در این مدت سلول ها خصوصیات سلول های اولیه را حفظ می نمایند. به این نوع کشت، کشت سلولی دیپلوئید گفته شده که برای ایزوله کردن ویروس های بیماریزای انسانی مناسب بوده و جهت تهیه واکسن نیز بکار می رود و واکسن ضد بیماری هاری از نوع HDVC که بهترین واکسن از نوع خود می باشد روی سلول دیپلوئید ریه انسان تهیه می شود.

۳- کشت سلول ردہ پیوسته (Continuous cell culture)

بر خلاف ردہ سلول های قبلی سلول های فوق از نسوج بدخیم جهت کشت سلولی استفاده می شود و نسبت به سلول های بافت سالم بهتر می توانند به محیط in-vitro آدپته گردیده و لذا در اثر پاساژهای مکرر قادر به زندگی طولانی و تکثیر خواهند بود.

این نوع از کشت های سلولی به نام کشت های سلولی ردہ پیوسته نامیده می شوند که در این دسته از سلول ها تعداد کروموزوم ها برعکس ردہ دیپلوئید که به شکل مجموعه-ای از کروموزوم های زوج هستند غیر طبیعی می باشند. اولین ردہ سلولی نوع فوق از کارسينوم سرویکس از سال ۱۹۵۲ توسط gey تهیه گردید و به ردہ سلولی هلا (Hela) نامیده شد و همین ردہ سلولی است که در اکثر آزمایشگاههای ویروس شناسی نگهداری و استفاده می گردد. از ردہ سلولی پیوسته به غیر از هلا انواع دیگری نیز به طور خالص تهیه و امروزه در آزمایشگاههای کشت سلول مورد استفاده قرار می گیرد برای مثال می توانیم ردہ های سلولی Vero و KB و HeP2 را نام برد.

کشت اولیه سلولی می تواند از طبق هضم آنزیمی طیف وسیعی از بافت های حیوانی در درجه حرارت سرد یا گرم و با روش ادامه رشد سلولهای برداشت شده اولیه از بافت حیوانی انجام پذیرد. چنین کشت هایی می تواند در شرایط آزمایشگاهی برای مدت زمان کوتاهی ادامه یابد که طول زمان کشت بستگی به توانایی سلولها در تقسیم سلولی دارد. اگرچه نشان داده شده است که چنین سلوهایی با توانایی تقسیم، دارای چرخه حیاتی محدود در شرایط آزمایشگاهی می باشند. قسمت اعظم سلولها در انتهای چرخه حیاتی خود توانایی سنتز DNA را از دست داده وارد فاز بحرانی خود می شوند. در این حالت تقسیم سلولی متوقف شده و کشت پایان می یابد.

با این وجود امکان دستیابی به شرایط کشت، با توان رشد نامحدود سلولی وجود دارد. چنین دودمان های نامیرای سلولی می تواند به صورت خودبخودی (به عنوان یک پدیده نادر) و یا از طریق تغییرات ژنتیکی (به کمک موارد شیمیایی سرطانزا و یا ویروس های تومورزا بدست آید. نمونه چنین دودمان های نامیرای دائمی، دودمان لتفوبلاست موشی LS178Y و دودمان VA4 WI-26 می باشند که به ترتیب از طریق تیمار سلول با ماده شیمیایی میتل کولانترن (methyl cholantherne) و ویروس SV₄₀ ایجاد شده اند. روش دیگر در ایجاد دودمان های سلولی هیبرید (دو رگه) بین یک سلول با دوره حیاتی محدود و یک رده سلول نامیرا و نامحدود در ایجاد دودمان های سلولی هیبرید و یا جهت تولید آنتی بادی های مونوکلونال انجام شده است.

آنچه صرفظر از روش بکار رفته در نامیرا سازی سلولها مهم به نظر می رسد ایجاد تغییرات اساسی در خواص سلولها می باشد. سلول در جریان این تغییرات خواص اختصاصی بافت اصلی خود را ازدست داده و دچار تغییراتی در کروموزم های خود می گردد. تکنیک های مهندسی ژنتیک از جمله راهکارهای دیگر جهت نامیراسازی سلولها بحساب می آیند. طی این روند ژن های ویروسی جهت جلوگیری از میرایی و افول چرخه حیاتی سلولها به ژنوم سلول وارد می شوند. این ژن ها به دو دسته تقسیم می شوند. دسته اول ژن هایی که توانایی نامیرا کردن سلول ها را دارند. این ژن ها سلول های ابتدایی را به سلولهای زاینده (proliferative) تبدیل کرده و یا دوره حیاتی سلولها را همانند سلولهای فیربلاست جنبی اولیه افزایش می دهند. دسته دوم ژن هایی هستند که باعث تغییرات ژنتیکی اساسی (Transformation) در سلول می شوند مانند دودمان سلولی فیربلاست هوشی NIH. تغییرات ژنتیکی سرطانزا در سلولها توسط ویروس های DNA دار طی یک روند چند مرحله ای و در نتیجه همکاری چندین ژن سرطانزا (oncogene) انجام می پذیرد. نمونه چنین انکوژن هایی با توانایی نامیراسازی عبارتند از: آدنوویروس منطقه نزدیک 1A (Ad E1A) و منطقه کد کننده آنتی ژن T بزرگ لولپویا.

نمونه ژن هایی با توانایی Transformation عبارتند از: لولپویای T حد واسط ، آدنوویروس منطقه نزدیک 1B و آنکوژن های ras . اما روند نامیراسازی سلولهای انسانی پیچیده تر از سلولهای دیگر می باشد. در جوندگان، روند نامیراسازی، روندی یک مرحله ای می باشد در صورتیکه در مورد سلولهای انسانی این روند طی دو مرحله انجام می پذیرد:

مرحله ای کاملاً شبیه مرحله نامیراسازی در سلول های جوندگان است که توسط ژن-های یکسانی انجام می شود.

مرحله دوم مرحله ای مجزا و خاص بوده که به عنوان پدیده ایجاد جهش و با فراوانی^۷ ۱۰ انجام می گیرد، بنابراین اگرچه دودمان های سلولی تمايز یافته و تخصصی پستانداران به کمک پلاسمیدهای حاوی ژن های نامیراکننده از بسیاری از سلولهای اولیه ایجاد شده است، سهولت و موفقیت ایجاد چنین دودمان هایی کاملاً به نوع بافت و گونه-ای بستگی دارد که سلول های اولیه از آن بدست می آید. مکانیسمی که طی آن، روند فناپذیری سلولها توسط انکوژن های ویروسی متوقف و به روندی معکوس تبدیل می شود کاملاً شناخته نشده است. اما به نظر می رسد این روند با دخالت پروتئین P₅₃ و مسیرهای Rb انجام گیرد با شروع روند پیری و فناپذیری سلولها با افزایش ممانعت -کننده های کنیاز وابسته به سایکلین (P₂₁, P₁₆) (Cyclin – dependent Kinase inhibitors P₁₆, P₂₁) همراه است. اگرچه بروز اجزای سازنده آنزیم تلومراز به نحو قابل توجهی دورهی حیاتی برخی سلولها را افزایش می دهد اما فعالیت تلومرازی برای نامیراسازی بسیاری از سلولها کافی به نظر نمی رسد. روش نامگذاری در ادبیات علمی کشت سلول می تواند گمراه کننده باشد. لغت سلول اولیه یا ابتدایی (Primar Cell) می بایست به سلولی اطلاق شود که تحت هیچ مرحله کشته قرار نگرفته باشد. بعد از حتی یک مرحله کشت، سلول یا کشت ثانویه (Secondary Cell) نامیده می شود. اگرچه این نامگذاری بعد از چند مرحله کشت (Passage) اعتبار خود را از دست می دهد و دقیق نمی باشد، عبارت «کشت با دوره حیاتی محدود» برای هر نوع سلول دیپلوئید مناسب تر به نظر می رسد. همچنین مفهوم نامیرایی (Immortality) در نگاه اول مبهم به نظر می رسد. چه مدت زمان یک کشت باید به طول انجامد تا نامیرا به حساب آید؟

یک پاسخ استفاده از عبارت «چرخه حیاتی تمدید شده» می باشد زیرا ابهام نامحدود و بی نهایت بودن تقسیم سلولی را از ذهن دور می کند.

دودمان های سلولی متغیر ژنتیکی داده شده Transformed معمولاً دائمی تصور می شوند. اما سلول فیربلاست انسانی که با ویروس SV₄₀ تیمار شده است دچار بحران پیری و فناپذیری می شود که البته شروع آن در مقایسه با سلول های عادی دیرتر است. همانطور که ذکر شد نامیرایی دودمان های سلولی می تواند به سه روش آلوده سازی با ویروس های تومورزا، دو رگه سازی سلولی و تغییرات ژنتیکی سرطانزا بدست آید. در حال حاضر در اکثر آزمایشگاهها از روش های DNA نوترکیب استفاده می شود، اگرچه تکنیک های دیگر بنا به گونه و بافت مورد استفاده می تواند مناسب باشد. برای مثال، بهترین روش برای نامیراسازی سلول های موشی تولید کننده

آنٹی بادی مونوکلونال ایجاد سلول دو رگه (Hybrioma) می باشد. لنفوسیت های انسانی به بهترین شکل توسط ایجاد تغییرات ژنتیکی با ویروس (Epstein – Barr) (EBV) نامیرا میشوند و در مورد سلول های دیگر، آنٹی ژن T بزرگ SV₄₀ بهترین انتخاب برای نامیرا سازی شناخته می شود.

استاندارد نمودن رده های سلولی به منظور ارزیابی ماهیان وحشی

انجام تست های ویروسی و تست های تأیید شده به طور مختصر استانداردهایی را به منظور بررسی سلامت ماهیان وحشی در اختیار قرار می دهد. تمام تست های ویروسی مورد استفاده بر روی رده های سلولی توسط مؤسسه انواع کشت آمریکا (ATCC) مورد بررسی قرار گرفته است. رده های سلولی حداقل سالی یکبار از لحاظ آلودگی های مایکوپلاسمی و سه سال یکبار از لحاظ حساسیت های ویروسی باید مورد آزمایش قرار گیرند.

آزمایش های مایکوپلاسمایی در رده های پیوسته سلولی

آزمایش های مایکوپلاسمایی باید به طور دقیق در برنامه های کنترل کیفیت در رابطه با تمام رده های کشت شده سلولی انجام شود. مایکوپلاسمها از میکرو اور گانیسم هایی می باشند که قادر دیواره سلولی هستند، آن ها از باکتری های مجزا می باشند. با حداقل اندازه ۰,۲ تا ۰,۳ میکرومتر، مایکوپلاسمها کوچکترین اور گان های در حال زیست شناخته شده می باشند.

آلودگی های مایکوپلاسمایی اثرات بسیار زیادی در کشت سلولی دارند. بسیاری از آنزیم ها، سیتو کینازها (cytokinaz) بسیاری از اعمال سلولی را متوقف کرده و یا آنٹی ژن های سطحی سلول را تغییر می دهند. مایکوپلاسمها سبب شکستن کروموزوم ها و تخلیه غذایی محیط رشد سلول ها می شوند، همچنین سبب تغییر مرغولوژی سلول ها نیز می گردند.

۱- ضد عفونی

مایکوپلاسم ها در اثر آلودگی های سرم، از طریق خود نمونه های ماهی، از طریق تریپسین و یا در حین کار با رده های سلولی منتقل می شوند. انتقال مایکوپلاسم ها از رده های مختلف سلولی به یکدیگر بسیار شایع می باشد، بنابراین در حین کار و انجام کشت بافت باید نکات ایمنی رعایت شود، به این منظور از روش های ضد عفونی و آزمایش های متداول به منظور جلوگیری از آلودگی های مایکوپلاسمایی استفاده می شود.

روشهای ضد عفونی نظیر کار کردن در محل و سطح ضد عفونی شده، دست های تمیز، خودداری از صحبت کردن در حین کشت می باشد، به این ترتیب از آلودگی های مایکوپلاسمی جلوگیری می شود.

۲- تست های متداول

A: فراوانی

باید از سلامتی تمام ماهیان اطمینان حاصل شود و از نبود میکرو او رگانیسم ها در کشت سلولی اطمینان حاصل نمود. تست های متداول به طور سالانه انجام می شود تا از نبودن مایکوپلاسمها در رده های سلولی ذخیره، سرم ها و تریپسین اطمینان حاصل شود. آزمایش های مایکوپلاسمایی در مورد سرم ها و تریپسین ها چندین بار باید انجام شوند. رده های سلولی باید در شرایط بر دتی و قبل از آنکه از حالت انجام داد خارج شوند انجام گردد. در ضمن در مورد استفاده از رده های سلولی که به طور تجاری تهیه شده اند نیز باید از عدم آلودگی های مایکوپلاسمایی آن ها مطمئن شد.

۱- روش های آزمایشی

روش های مستقیم و غیرمستقیم بسیاری به منظور بررسی آلودگی های مایکوپلاسمایی وجود دارد. روش های مستقیم نظیر روش رنگ آمیزی DNA فلورو کروم، افزایش تعداد مایکوپلاسمها با روش ELISA و یا PCR و با استفاده از کیت های تهیه شده می باشد که بسیار سریع و آسان پاسخ می دهند. غالباً از یک روش استفاده نشده و از چند روش به منظور اطمینان کامل استفاده می شود.

۳- تیره های سلولی ماهی

اگرچه تیره های سلولی از ماهیان تجاری به دست می آیند و به عنوان سیستم های مدل در مطالعات جنین شناسی، سم شناسی، سرطان شناسی، سلول شناسی و زیست شناسی محیطی استفاده می شوند ولی کاربرد اصلی آن ها برای جداسازی، شناسایی و مطالعات ویروسی است، به جز چند استثناء ویروس های ماهی فقط می توانند در بدن ماهی یا در کشت سلولی ماهیان تکثیر پیدا کنند. سلول های BHK-21 که از کلیه نوزاد هامستر به دست می آید یک استثناء می باشد. از این سلول ها می توان برای رشد رابد و ویروس های ماهیان به همان خوبی ویروس های پستانداران، پرنده گان و دوزیستان استفاده کرد. گرچه اختلافات زیادی در سلول های ماهیان وجود دارد

و Mann و Wolf) ۱۹۸۰^{۱۰} ولی هفت نوع غالب آن که در کتب و مقالات معرفی شده‌اند برای بسیاری از کارهای ویروس‌شناسی ماهی کفايت می‌کنند. (کشت بعضی از هرپس ویروس‌ها استثناء می‌باشد).

این هفت نوع شامل:

گزارش شده، در متن The American Type Culture Collection Catalogue of Strain ارائه شده است. تیره‌های سلولی دائمی آن‌هایی هستند که ۷۰ بار یا بیشتر پاساژ داده می‌شوند و از نظر احتیاجات مورد نظر Federoff (۱۹۷۵)^{۱۱} که به طور اضافی استانداردی را برای کشت بافتی فراهم کرد مناسب می‌باشند. تیره‌های سلولی RTG-2 که Quimby و Wolf در سال ۱۹۶۲ به عنوان اولین تیره سلولی آنرا تهیه کردند، استفاده زیادی در تحقیقات دارد. بر اساس درجه انکوباسیون و تراکم اولیه بذردهی، Plumb و Wolf (۱۹۷۱) دریافتند که زمان لازم برای تولید کشت‌های استاندارد لوله‌ای خیلی متغیر می‌باشد، از ۱/۵ روز تا بیشتر از ۶۷ روز (جدول ۴) در درجه حرارت انکوباسیون ایده‌آل ۲۰ درجه سانتی گراد زمان مضاعف شدن تعداد سلول‌های RTG-2 دو روز می‌باشد (جدول ۵). زمان لازم برای مضاعف شدن تعداد در درجه حرارت بالاتر یا کمتر از حد ایده‌آل افزایش پیدا می‌کند. گرچه مطالعات مقایسه‌ای در دیگر تیره‌های سلولی ماهیان انجام نشده اما ارتباط عمومی آن‌ها احتمالاً به دست آمده است. تیره‌های سلولی نظیر EPC، BB، BF-2، FHM که درجه حرارت ایده‌آل آن‌ها بالاتر است زمان مضاعف شدن تعداد در آن‌ها کوتاه‌تر می‌باشد. تراکم بذردهی توصیه شده برای تیره‌های سلولی ماهیان مهم در جدول ۶ آمده است.

دستورالعمل‌هایی برای کشت مجدد سلول‌های ماهی و تکثیر تیره‌های سلولی ماهیان به وسیله Quimby و Wolf ۱۹۶۷^{۱۲} توصیف شده است.

مراقبت‌های لازم برای تیره‌های سلولی ماهیان

به طور کلی کشت‌های سلولی که در ویروس‌شناسی ماهیان به کار می‌روند بایستی به اندازه کافی تازه باشند به طوریکه سلول‌های در حال تقسیم را در منطقه رشد نشان دهند.

در زمان مشابه، محدوده رشد قابل دسترسی بایستی به خوبی توسط سلول‌ها پوشیده شود و به حدود ۸۰ تا ۹۰٪ رسیده باشد. کشت‌های متراکم یا کشت‌های پیر که تقسیم میتوزی در آن‌ها مشاهد نمی‌شود برای ویروس شناسی مناسب نمی‌باشند. یکی از چیزهای مهم که بایستی تحت مراقبت قرار گیرد اطمینان حاصل کردن از اینکه آن‌ها بایستی حساسیت به ویروس را حفظ کنند. تیره‌های سلولی FHM و BF-2 تاریخچه‌ای از نقص بازگشت به مقدار کمی یا تمامی حساسیت آن‌ها به یک یا ویروس‌های زیادی را دارند. یکی از مسائل سلول‌های سرکش، رسیدن به اجداد حساس به وسیله استفاده از سلول‌هایی با پاساژ کمتر می‌باشد.

مسئله دیگر نگهداری کلونی‌های منجمد یا به دست آمده از دیگر آزمایش‌ها است. یک پیشنهاد، استفاده از هر روش کلون کردن سلول برای رسیدن به جمعیت‌های بعدی است. وقتی کلون‌ها ایجاد شدند ممکن است به طور مجزا آزمایش شوند و کلونی حساس برای تکثیر انتخاب می‌شوند. امروزه اغلب روش‌های تشخیصی ویروس‌شناسی و تحقیقات ویروسی با تیره‌های سلولی ماهیان انجام می‌شود. هر روزه در تهیه تیره‌های سلولی حیوانی خطراتی ایجاد می‌شود. آلودگی میکروبی، سمیت ترکیبات محیط‌ها، مسئله مدت عمر تیره‌های سلولی معین، درجه حرارت خیلی زیاد، کشت‌های مخلوط شده و آفات و حوادث از این عوامل می‌باشند.

و Wolf (1973 و 1978) Quimby تجربیاتشان را در تولید و مدیریت تکثیر تیره‌های سلولی حیوانی از نوع دائمی خلاصه کرده‌اند. نمودار 1A و 1B و موارد سیزدهگانه جدول ۷ نتیجه کار آن‌ها می‌باشد. این سیستم در طی ۱۷ سال تجربه در تولید و نگهداری تیره‌های سلولی ماهی و دوزیستان به دست آمده است.

نمودار ۱- تکثیر تیره‌های سلولی ماهیان

A- آماده سازی محیط:

۱. ذخیره سازی نمونه واحد (سالیانه)
۲. آزمایش کارآیی (قدرت) پلیت‌ها با استفاده از تیره‌های سلولی نماینده
۳. خریداری و نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد یا کمتر
۴. پودر MEM قابل اتوکلاو کردن و حل کردن در آب (آب USP برای تزریقات و یا معادل آن) و سپس استریل کردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و اضافه کردن L-Glutamine (محلول استریل) و بی کربنات سدیم (NaHCO3)

۵. اضافه کردن سرم جنین گاو و مخلوط کردن آن با محیط پایه و کامل شدن محیط
۶. فیلتر کردن سرم جنین گاو و مخلوط کردن آن با محیط پایه و کامل شدن محیط
۷. توزیع آسپتیک در چند ظرف
۸. کنترل استریل بودن برای ۲٪ از محیط ها برای ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ هفته و سپس نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد یا کمتر

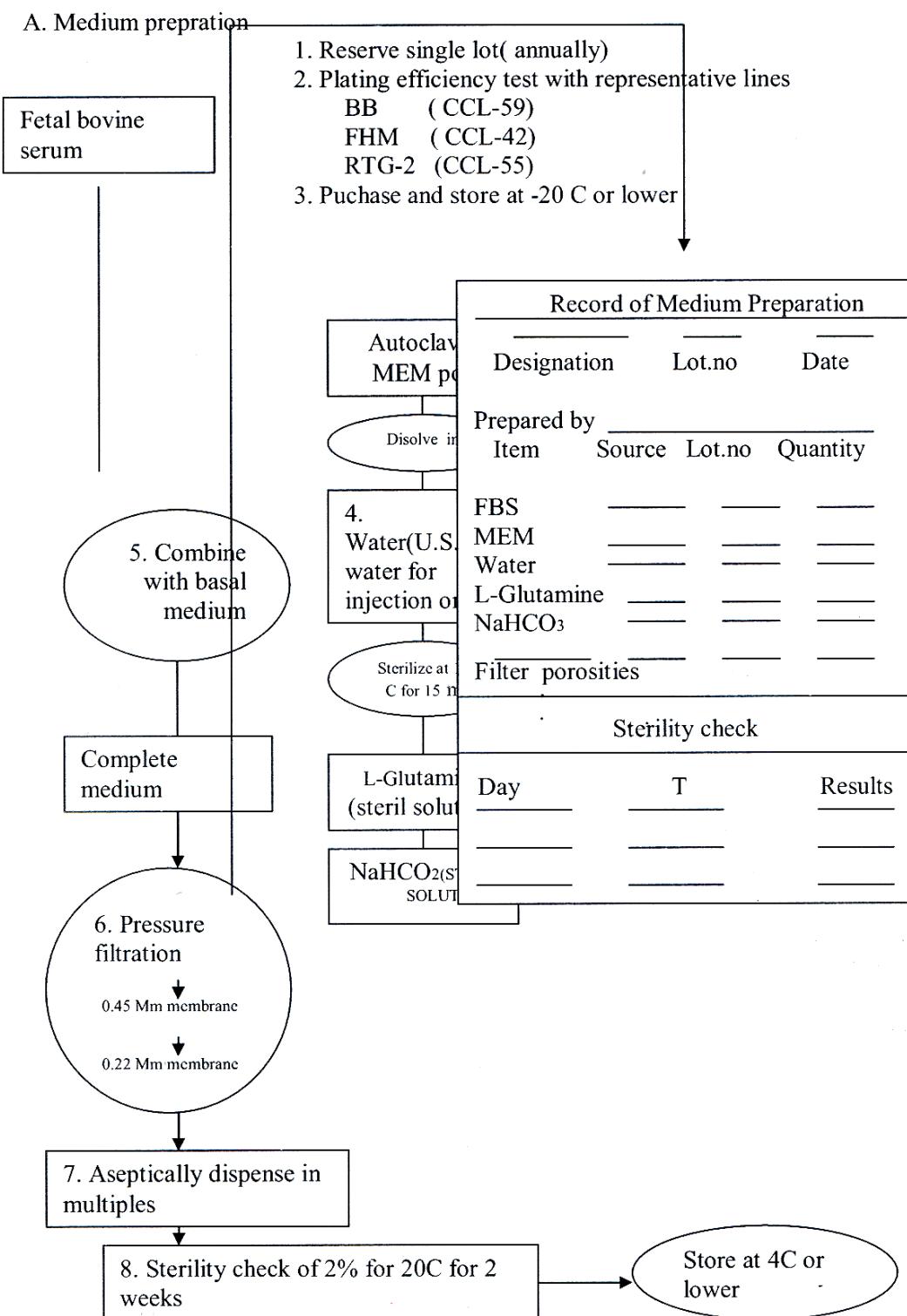
B- دستورالعمل تکثیر کشت های ذخیره

۱. تیره سلولی معین
۲. خارج کردن محیط کشت، آبکشی (شست و شو) با محلول ورسن (Versene)، درمان به مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه، پیپت کردن شدید برای خروج سلول ها، خنثی سازی توسط محیط، سانتریفیوژ در ۲۰۰ تا ۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، معلق کردن مجدد و تقسیم نمودن در دور نمونه (سری) از محیط کشت استریل و عاری از آنتی بیوتیک

سوی I- (یک نمونه محیط). تهیه کشت های چندتایی از آن:

۳. انکوبه کردن برای یکنواخت شدن و نگهداری به مدت ۱ تا ۲ ماه
۴. بازرسی از لحاظ pH، شفافیت و عدم آلودگی
۵. آزمایش میکروسکوپی از نظر مرفو لوژی، تمیز بودن و کیفیت سلول ها
۶. انتخاب بهترین کشت برای کشت مجدد
۷. نگهداری کشت های استفاده نشده به عنوان ذخیره
۸. تکثیر کشت های ذخیره و تولید کشت دختر
۹. ثبت تمام اطلاعات مربوطه
۱۰. کنترل سالیانه کشت برای آلودگی به مایکو پلاسمما
۱۱. کشت ذخیره مناسب به طور سالانه توسعه داده می شوند و سایر کشت های قدیمی حذف می گردد.

A. Medium preparation



Temperaturel °cl					
Initial seeding of cells (no/ml)	25	20	15	10	5
200.000	1.8	1.5	2.4	5.0	8.0
100.000	3.3	3.1	4.8	9.3	18.0
50.000	6.2	4.8	7.3	14.0	37.0
25.000	9.3	7.5	14.0	34.5	53.0
12.500	13.0	10.5	19.8	45.0	67.0

جدول ۷. زمان تقریبی (روز) برای تراکم‌های مختلف بذردهی سلول‌های RTG-2 برای رسیدن به یکنواختی ۲۷۵۰۰۰ ml (Wolf,K.,1988)

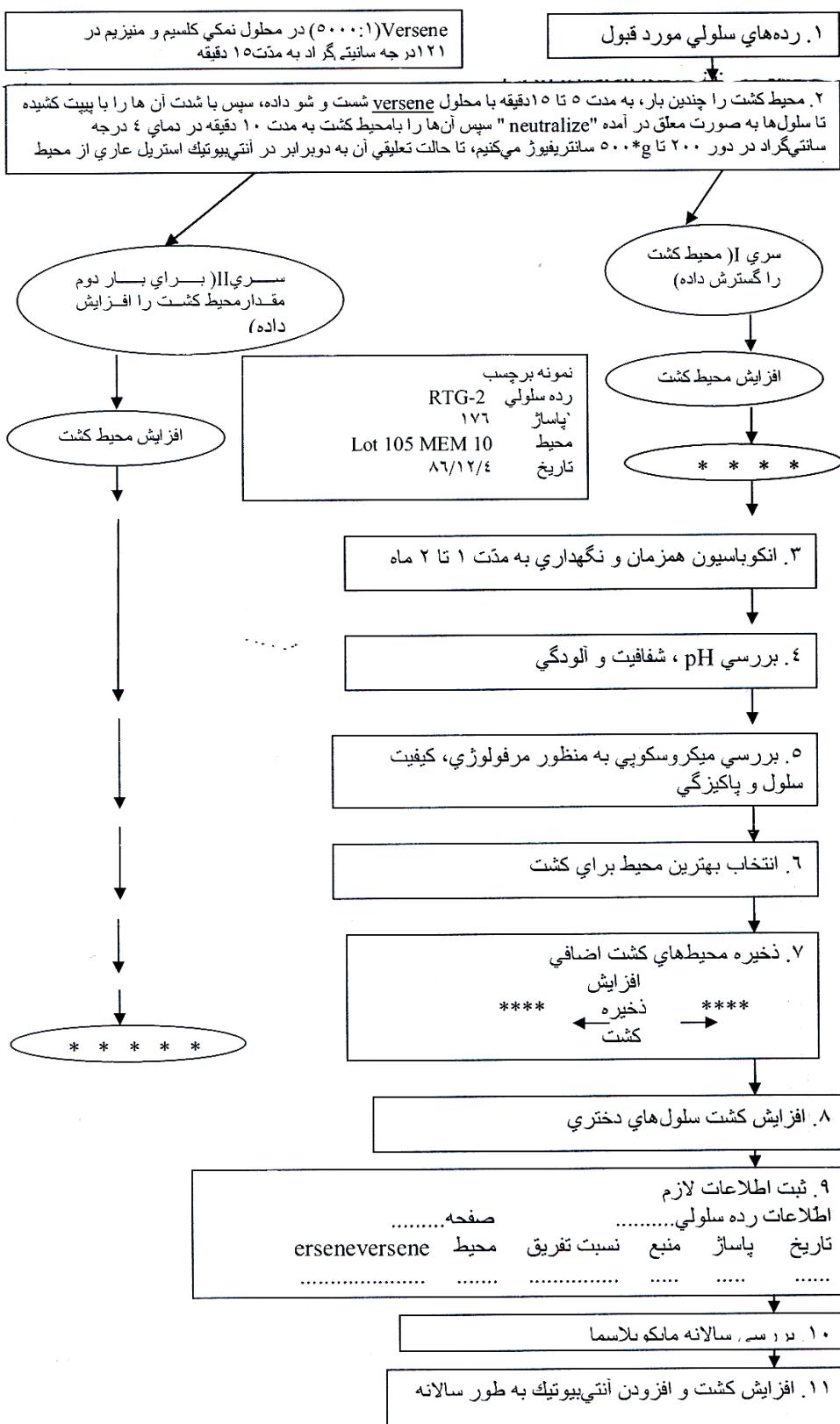
Temperaturel °cl					
Initial seeding of cells (no/ml)	25	20	15	10	5
100.000	2.4	2.0	3.5	7.0	10.0
50.000	2.5	2.0	3.5	5.5	14.5
25.000	2.5	2.0	4.0	8.0	16.0
12.500	2.7	2.5	4.1	8.8	13.5
Average	2.6	2.0	3.8	7.6	13.8

جدول ۸. زمان مضاعف شدن تعداد (روز) سلول‌های RTG-2 در تراکم‌های مختلف بذردهی و درجه حرارت. (Wolf,K.,1988)

Cell designation	Sukgested seeding density (no/ml)	Incubation temperature 1 °cl	Time to contlency (days)
BB (CCL-591)	200.000	30	3
BF-21CCL-911	250.000	25	3
CHSE-214	300.000	20	3
EPC	500.000	25	3
FHMICCL-121	500.000	25	3
RTG-21CCL-551	200.000	20	3

جدول ۹. تراکم بذردهی و درجه حرارت انکوباسیون برای تیره‌های سلولی متعدد ماهیان. (Wolf,K.,1988) CCL رده‌های سلولی مورد قبول در آمریکا.

سلول‌هایی که بیشترین حساسیت را به عوامل تعریف نشده به ویژه در سرم گاوی از خود نشان می‌دهند. BB بسیاری از سرم‌های گاوی برای رشد سلول‌های ماهی کافی نمی‌باشند، بسیاری از محیط‌های کشت قبل از مصرف باید چگالی آن‌ها تغییر کند بنابراین قبل از خریداری آن‌ها باید مورد آزمایش قرار گیرند.



نمودار ۵. طرح مختصر قواعد برای نگهداری تیره‌های سلوکی، ماهی، و دیگر حیوانات.

سروی II: دومین نمونه محیط کشت مانند سری I عمل شود.

۱. مشخص کردن میزان نظم و ترتیب مورد نیاز برای احتیاجات کشت سلولی
 ۲. نگهداری کشت های پایه جدا از کشت هایی که استفاده می شوند.
 ۳. به کار بردن یک وسیله دوتایی یا اضافی برای نگهداری کشت های پایه
 ۴. به کار بردن یک برنامه آزمایشی برای تولید سرم به طور سالیانه
 ۵. استفاده از آب با خلوص بالا برای تمام سلول ها
 ۶. آزمایش استریل بودن قبل از استفاده کردن تمام محلول هایی که تهیه می شوند
 ۷. اجتناب از استفاده از آنتی بیوتیک در نگهداری کشت ذخیره
 ۸. توزیع کشت های ذخیره با محلول ورسن اتوکلاو شده به جای محلول ورسن-تریپسین (versen-trypsin)
 ۹. به کار بردن فقط یک تیره سلولی در هر زمان
 ۱۰. آماده کردن و مراقبت از کشت های چندتایی دختر
 ۱۱. دادن کشت های مجدد از کشت های ذخیره به طور متناوب و نگهداری در درجه حرارت پائین
 ۱۲. نگهداری و ثبت جزئیات محلول هایی که در آماده سازی به کار می روند و نیز تاریخچه هر سلول
 ۱۳. کشت آزمایش حداقل به طور سالیانه برای مایکوپلاسمای
- دستورالعمل O.I.E جهت نمونه برداری و کشت سلولی در ماهیان نمونه برداری بر اساس اندازه بدن:
- بچه ماهیان و نوزادان با کیسه زرده: نمونه کامل ماهی، ولی در صورت وجود کیسه زرده باید جدا و حذف شود.
۱. ماهیان ۶-۴ سانتی متر: احشاء به طور کامل و نیز کلیه. یک تکه از مغز بعد از جدا کردن سر از لبه عقبی سرپوش آبشش و فشردن آن به طور جانبی
 ۲. ماهیان بزرگتر از ۶ سانتی متر: در آوردن کلیه، طحال و مغز
 ۳. ماهیان مولد: برداشتن مایع تخمدانی و بافت هایی که در بالا گفته شد.

دستورالعمل کلی برای نمونه برداری از اندام ها و مایعات برای آزمایشات ویروس شناسی

مجموعه اندام ها یا مایعات تخمدانی در یک ظرف استریل قرار داده می شوند و تا زمانی که عصاره ویروسی در آزمایشگاه تهیه شود در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می گردد. عصاره ویروسی بایستی در

خلال ۲۴ ساعت بعد از نمونه برداری از ماهی تهیه شود ولی تا ۴۸ ساعت هم قابل قبول می باشد. همچنین ممکن است نمونه های اندام ها به وسیله قرار دادن در ظرف حاوی محیط کشت سلول یا Hanks Bassal Salt Solution (HBSS) به همراه اضافه کردن آنتی بیوتیک ها برای جلوگیری از رشد آلودگی باکتریایی (یک حجم از ارگان رد حداقل ۵ حجم از مایع انتقال دهنده) به آزمایشگاه حمل شوند. غلظت های مناسب آنتی بیوتیک شامل: جنتامایسین $1000 \mu\text{gr}/\text{ml}$ یا پنی سیلین ($800 \text{ IU}/\text{ml}$) و دی هیدرو استرپتومایسین $800 \mu\text{gr}/\text{ml}$ از ترکیبات ضدقارچ Fungizone یا Mycostatin نیز ممکن است به محیط انتقال دهنده نمونه در غلظت نهایی $400 \text{ IU}/\text{ml}$ اضافه شود. همچنین ممکن است سرم یا آلبومن $10-5\%$ برای ثابت کردن ویروس اگر زمان انتقال بیشتر از ۱۲ ساعت طول بکشد، اضافه گردد.

تیره های سلولی ماهیان

چهار تیره سلولی ماهی برای آزمایش جهت عوامل بیماریزا در کدی که O.I.E تعیین کرده است وجود دارد:

(Blugill Fibroblast) BF-2 *

(Channel Catfish Ovary) CCO *

(Epithelioma Papulosum Cyprini) EPC *

اطلاعات ژنتیکی برای استفاده از این سلول ها به منظور جداسازی عوامل بیماریزا در جدول ۸ آمده است.

جدول ۱۰. اطلاعات تکنیکی برای استفاده از تیره های سلولی مناسب جهت جداسازی عوامل بیماریزا.

فهرست اصطلاحات سلولی				
ویژگیها	BF-2	CCO	CHSE-214	EPC
خصوصیات بافت				
مورfolوژی بافت	Fibroblastic	Fibro/ epithelioid	Epitheli- oid	Epithelioid
($^{\circ}\text{C}$) بازه ای دمایی	15-28	15-35	4-25	10-33
($^{\circ}\text{C}$) دمای مناسب رشد	20	30	20	30
Inoculum ($\text{x}10^4/\text{cm}^2$) (1)	20	35	16	30
($\text{x}10^4/\text{cm}^2$) تعداد سلول (2)	150	300	150	300
(روز) مدت اشباع	8	5-6	10	8
برای بدست آوردن تراکم کم در ۲۴ ساعت (1) در رشد مناسب (2).				

۵- نتیجه‌گیری

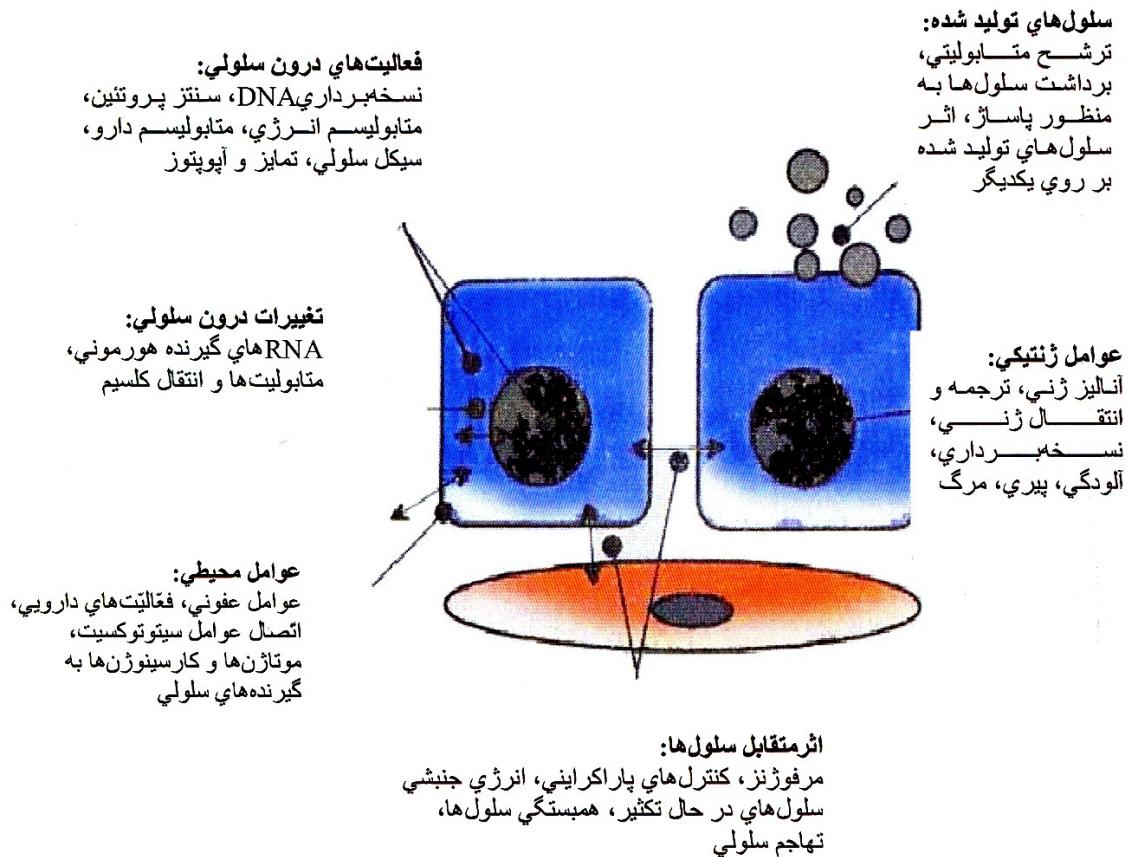
محیط‌های کشت مورد استفاده در کشت بافت ماهی

گرچه گهگاهی ممکن است محیط ایگل (EMEM) Eagle's Minimum Essential Medium کافی نباشد ولی کامل کردن آن با ۱۰٪ سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum) آن را به تمام اهداف یک محیط کشت برای سلول‌های پستانداران، پرنده‌گان، خزندگان، دوزیستان و ماهیان استخوانی (Teleosts) تزدیک می‌کند (Rao و همکاران، ۱۹۹۷). برای استفاده سلول‌های ماهیان آنادروم (anadrom) آب‌شیرین، محیط EMEM اسمولاریته مناسبی داشته و نیازی به اضافه کردن ماده‌ایی ندارد (نقطه انجماد آن در حدود ۰/۶ درجه سانتی گراد است). از آنجاییکه نقطه انجماد خون در ماهیان استخوانی دریایی در حدود ۰/۷۵ درجه سانتی گراد می‌باشد محیط کشت برای سلول‌های ماهیان استخوانی دریایی بایستی به اضافه کردن ml/۱۰۰ gr ۰/۴۵ نمک طعام (NaCl) متعادل گردد. یکی از راه‌های ساده از طریق اضافه کردن L/۶ ml ۰/۲۰ از محلول استوک (ذخیره) استریل ۳/۴ مولار (به نسبت وزنی به حجم٪ ۲۰) از نمک طعام می‌باشد. معمولاً EMEM یا به شکل مایع خریداری می‌شود و یا در دو شکل دیگر به صورت پودر است که یکی از آن‌ها مقاوم در برابر حرارت است و ممکن است به وسیله اتوکلاو و استریل شود و دیگری حساس به حرارت که بایستی فیلتر گردد. EMEM پودری بایستی در آب با خلوص بالا و یا در کشت‌های بافتی حل شود. آب با خلوص بالا به وسیله مقطر کردن یا غیرمعدنی کردن یا هر دو روش تهیه می‌شود. آب USP تزریقات (که در داروخانه‌ها و یا مراکر تهیه کننده مواد بیمارستانی موجود است) رضایت بخش بوده و به طور کلی مقرن به صرفه می‌باشد (Pumper, 1973).

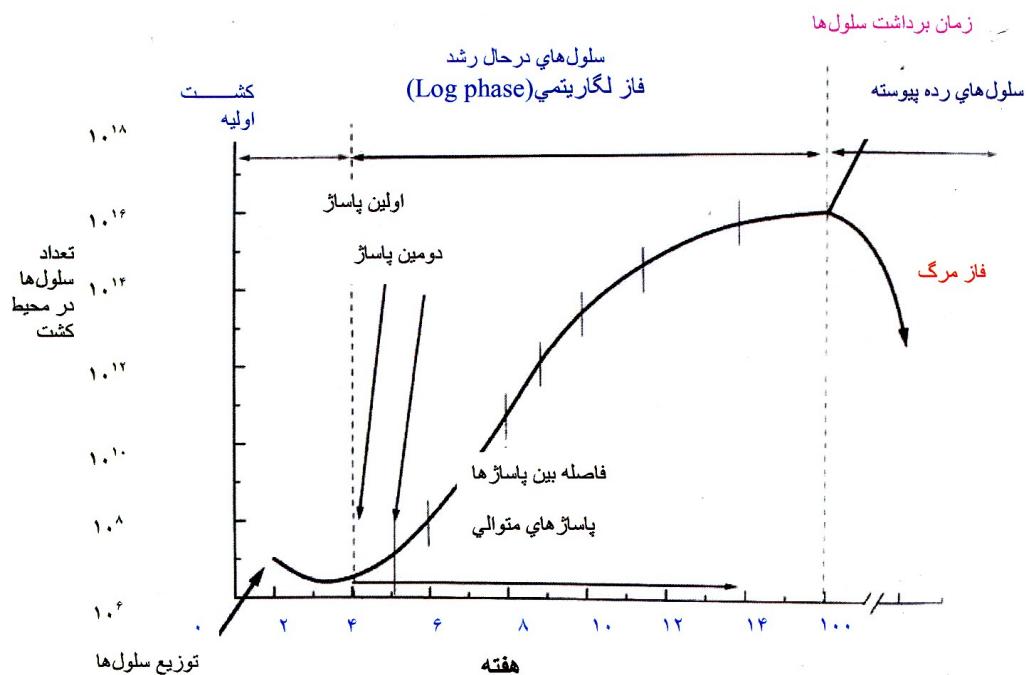
در کشت سلولی ماهیان رشد سلول‌ها خیلی کنده‌تر از آنچه که انتظار می‌رود می‌باشد ولی اضافه کردن ۵٪ سرم و یا ۷-۵٪ تخم مرغ کامل فیلتر شده باعث تحریک رشد می‌شود. اصولاً سنجش برای رشد سلولی بایستی برروی یک قاعده مؤقتی صورت گیرد. اگر رشد آهسته ادامه پیدا کند، بایستی دلایل دیگر جستجو شوند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط کشتی که تحت تأثیر خطر آلودگی قرار دارد استفاده می‌شود. برای اهداف معمولی اضافه کردن IU ۱۰۰ سدیم پنی‌سیلین-G، ۱۰۰ میکروگرمی هیدرواترپومایسین (di hydro ether peto mysin) و ۲۵IU نیستاتین (niacin) ر هر میلی‌لیتر از محیط، احتمالاً بیشترین اثر را در جلوگیری از آلودگی ثانویه می‌گذارد. پنی‌سیلین (peni cellin) استرپтомایسین (strepto mysin) و آنتی‌بیوتیک کشنده

باکتری(Bactericidal) می باشد تعویض نمود (به مقدار ۱۰۰ میکرو گرم در هر میلی لیتر). جتامايسین را می توان اتوکلاو نمود. این دارو کشنده باکتری ها بوده و اثرات مؤثری علیه بسیاری از مایکوپلاسمها (myco plasma) دارد (Nijimasu, ۱۹۸۷).

همانطور که در شکل پایین مشاهده می شود، سلول در محیط کشت تحت فاکتورهایی به شرح زیر قرار می گیرد: فعالیت های درونی سلولی نظیر؛ نسخه برداری DNA، سنتز پروتئین، متابولیسم انرژی، متابولیسم دارو، سیکل سلولی، تمایز و آپوپتوز، تغییرات درون سلولی نظیر؛ RNA های گیرنده هورمونی، متابولیت ها و انتقال کلسیم، عوامل محیطی نظیر؛ عوامل عفونی، فعالیت های دارویی، اتصال عوامل سیتو توکسیت، موتاژن ها و کارسينوژن ها به گیرنده های سلولی، اثر مقابل سلول ها نظیر؛ مرفوژنر، کترل های پاراکراینی، انرژی جنبشی سلول های در حال تکثیر، همبستگی سلول ها، تهاجم سلولی، عوامل ژنتیکی نظیر؛ آنالیز ژنی، ترجمه و انتقال ژنی، نسخه برداری، آلدگی، پیری، مرگ و سلول های تولید شده نظیر؛ ترشح - متابولیتی، برداشت سلول ها به منظور پاساز، اثر تراکمی سلول های تولید شده بر روی یکدیگر، همانطور که ملاحظه می گردد تمام عوامل فوق که از عوامل طبیعی می باشند سلول ها را در محیط کشت تحت تأثیر قرار می دهند. اما قابل توجه است که سلول ها در محیط کشت تحت استرس هایی قرار گرفته که این عوامل در محیط های طبیعی و موجود زنده اثر داشته، ولی حضور آن ها در محیط کشت سبب مرگ سلول ها در زمان طولانی می گردد.



شکل ۲۶ . عوامل مؤثر در سلول های در حال کشت.



نمودار ۶. منحنی فوق حاصل تحقیقات انجام شده در مؤسسات پژوهشی American Type)ATCC German)DSMZ (European Collection Of Cell Cultures) ECACC (Culture Collection (Collection of microorganisms and Cell Cultures بر روی یاخته های جانوری است.

همانطور که از منحنی فوق استنباط می گردد تمام یاخته های جانوری پس از آن که به محیط کشت منتقل می شوند یک دوره فاز آهسته (Lag phase) دارند که در سلول های هیپوفیزی ماهی چالباش این دوره ۱۰ روز به طول انجامید، که در مقایسه با منحنی فوق قابل قبول می باشد. نکته قابل توجه زمانی است که سلول ها وارد فاز لگاریتمی (Log phase) می شوند، در این فاز همانگونه که پیش از این ذکر شد و در منحنی فوق نیز مشاهده می گردد سلول ها تکثیر یافته و تعداد آنها روند افزایش را طی کرده است، روند فوق در رابطه با سلول های کشت بافت هیپوفیز ماهی چالباش چنین سیر افزایشی را تا روز ۲۲ نشان داده، (مطابق نمودار ۱). البته بر اساس نمودار ۲ روند تغییرات رشد در زمان های مختلف متفاوت می باشد و همانطور که از نمودار فوق استنباط می شود؛ تا روز چهارم رشدی انجام نشده بنا بر این سرعت رشد برابر با صفر در نظر گرفته شده است. در روزهای ششم و هفتم تعداد سلول ها تغییر نکرده اما بر اساس محاسبات انجام شده

سرعت رشد روند افزایش داشته است، از روزهای هشتم تا یازدهم تعداد سلول‌ها ثابت مانده و سرعت رشد صفر شده است.

از روز دوازدهم تا روز بیست و یکم تعداد سلول‌ها افزایش یافته هرچند که بر اساس منحنی شماره ۲ و ۳ روند تغییرات رشد نوسانات کاهشی و افزایشی را طی کرده است.

در روز بیست و دوم تعداد سلول‌ها به حداکثر (۷۵۰۰ سلول در میلی‌لیتر) رسیده و تا روز بیست و هفتم با این تعداد باقیمانده است و تغییرات سرعت رشد آن معادل صفر بوده است که بر اساس منحنی شماره ۴ این زمان بهترین دوران سلول به منظور نگهداری آن‌ها می‌باشد. از آنجا که پاساژ دادن سلول‌ها در این زمان انجام نگرفت، تا محیط مناسبی برای رشد سلول‌ها فراهم شود، استرس‌های القاء شده در سلول‌های در حال کشت باعث شد تا روند رشد کاهشی و کاهش تعداد سلول‌ها رخ داده به طوری که سلول‌های هیپوفیز ماهی چالباش از روز بیست و هشتم وارد فاز مرگ شده و تا روز چهلم روند فوق را با کاهش تعداد سلول‌ها و دامنه تغییرات رشد منفی به طور نوasanی از خود نشان داده است.

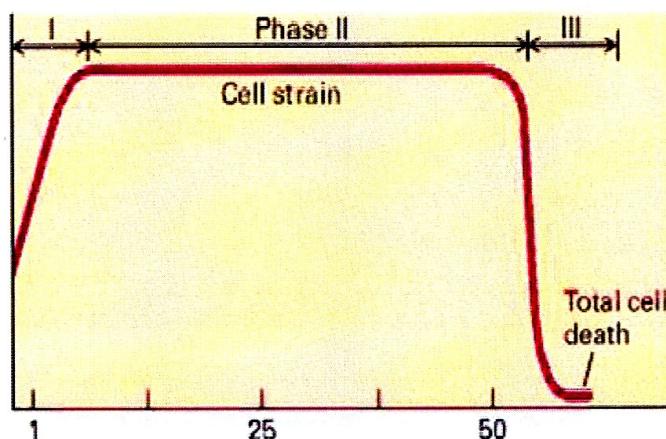
در مقایسه منحنی شماره ۱، منحنی تغییرات ایجاد شده در کشت سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش، که از موجودات خونسرد تلقی می‌شود با کشت سلولی انسان و موش که در مؤسسات پژوهشی،

(European Collection Of Cell Cultures)ECACC (American Type Culture Collection)ATCC

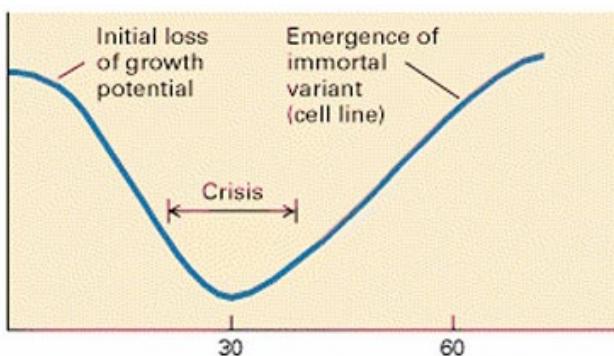
(German Collection of microorganisms and Cell Cultures)DSMZ که زمان شروع فاز لگاریتمی در سلول‌های انسانی بسیار کوتاه است در حالی که در رابطه با کشت سلول‌های موش فاز آهسته بسیار طولانی بوده به طوری که در این فاز روند کاهشی تعداد سلول‌ها بسیار زیاد است، در حالی که منحنی تعداد سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش روندی حد واسط را نشان داده و در ۱۰ روز اول فاز آهسته خود را طی کرده است.

فاز ثابت در سلول‌های انسانی بسیار طولانی می‌باشد، در حالی که در این آزمایش دورانی که سلول‌های هیپوفیزی در این فاز قرار می‌گیرند تنها پنج روز می‌باشد، بنابراین زمان کوتاهی برای ذخیره سلول‌های فوق وجود دارد.

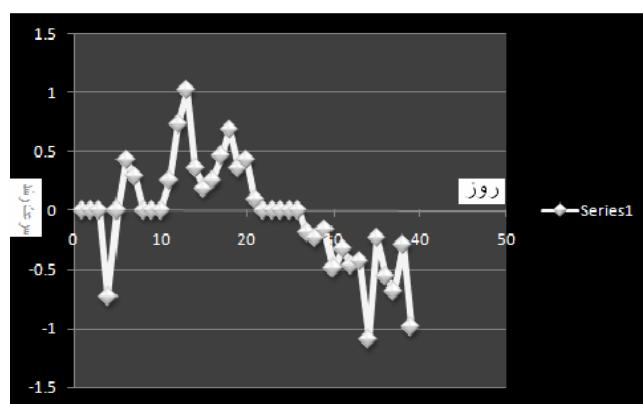
فاز مرگ سلول‌های انسانی بسیار کوتاه و با شیب بالا می‌باشد در حالی که سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش به صورت نوسانی و در زمان طولانی، حدود ۱۲ روز این دوره را طی نموده‌اند.



نمودار ۷ . مراحل مختلف رشد سلول‌های انسانی در محیط کشت



نمودار ۸ . مراحل مختلف رشد سلول‌های موش در محیط کشت



نمودار ۹ . مراحل مختلف رشد سلول‌های هیپوفیز ماهی چالباش در محیط کشت.

تمام عوامل فوق نظیر استرس های القاء شده در محیط کشت که در بخش بالا ذکر شده است سبب مرگ سلول های هیپوفیزی ماهی چالباش شده، که در این میان مهمترین آنها پاساژ ندادن سلول ها از روز بیست و یکم به بعد است، اما عامل مهم تر استفاده از انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد دی اکسید کربن دار می باشد.

همانطور که می دانیم ماهی چالباش نظیر سایر ماهیان خونسرد بوده و در دمای ۲۶-۲۴ درجه سانتی گراد زندگی می کند(شکل ۲۳) اما در زمان کشت سلول های هیپوفیزی آن به علت نبودن انکوباتور با دمای فوق استرس شدیدی به سلول ها وارد شده که با این وجود زنده ماندن و تکثیر شدن آنها در دوران ۳۰ روز جای شگفتی دارد! به هر جهت این مطالعات حاکی از آن است که عوامل فیزیولوژیک و شرایط متفاوت طبیعی تولید مثل و تکثیر این ماهیان نقش اساسی دارند، بنابراین چنانچه این عوامل کنترل شوند به راحتی نسبت به تکثیر طبیعی این ماهی می توان اقدام نمود.

پیشنهادها

این مطالعه در مدت ۴ سال انجام گردید و با توجه به تجربیات بدست آمده و نوع تحقیق و شرایط فیزیولوژیک

ماهی موارد ذیل پیشنهاد می‌گردد:

- رشد سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش در محیط کشت بسیار کند و آهسته صورت می‌پذیرد و در

ضمون کشت، سلول‌ها تحت استرس‌هایی قرار گرفته‌اند. یکی از مهمترین استرس‌های ایجاد شده در

کشت سلولی هیپوفیز ماهی چالباش بالا بودن درجه حرارت اتاق کشت و در دسترس نبودن انکوباتور

یخچالدار بود، حضور این استرس‌ها در محیط کشت تهدید بزرگی برای سلول‌ها بود به این منظور باید

استرس‌ها را با استفاده از انکوباتور یخچالدار و اتاق کشت استریل و ایزووله به حداقل ممکن کاهش داد،

- مطالعه کشت ۴ ساله بافت هیپوفیز ماهی چالباش نشان می‌دهد که در روزهای ۲۱ تا ۲۷ کشت

سلول‌های در فاز لگاریتمی قرار دارند، این زمان مناسب‌ترین وقت پاساژ دادن سلول‌های هیپوفیزی

ماهی چالباش و تهیه سلول‌های یک لایه اولیه به منظور حفظ، نگهداری و مطالعات بیولوژیک است.

- به منظور جداسازی هورمون رشد هیپوفیزی ماهی چالباش، پیشنهاد می‌شود توالی ژن هورمون رشد

ماهی چالباش را سنتز نموده و آن را به باکتری کلیون کرده و در بیوراکتور بطور انسبوه هورمون رشد

ماهی تولید نمود، به این ترتیب می‌توان با روشی ارزان‌تر، آسان‌تر و سریع‌تر به هورمون رشد ماهی

دست یافت، لذا با توجه به نتایج ۴ ساله کشت سلولی قسمت پیشین هیپوفیز ماهی چالباش پیشنهاد

می‌گردد از روش کشت سلول‌های هیپوفیزی اقدامی صورت نگیرد.

- به منظور تهیه کشت‌های سلولی و تولید انواع تیره‌های سلولی آبزیان جهت مطالعه ویروس‌شناسی

ماهیان پیشنهاد می‌گردد

برای تشخیص ویروس گربه ماهی کانالی (CCV) و ویروس نکروز پانکراس (IPNV) از سلول‌های فیبروبلاست

بافت انتهایی تنه دمی گربه ماهی *Brown bullhead* از خانواده *Ictaluridae* جنس *Ameiurus* گونه *nebilosus*،

برای تشخیص ویروس لیمفوسیستیس (LV)، ویروس مارماهی (EVA) و ویروس نکروز پانکراس (IPNV) از سلول‌های

فیبروبلاست دمی ماهی سیم *Blue gill* از خانواده *Centrarchidae* جنس *Lepomis* گونه *macrochirus*

برای تشخیص ویروس ماهی طلائی(GFV) و ویروس ماهی طلائی درخشان(GSV) از سلولهای فیروblast دم ماهی طلائی (Goldfish).

برای تشخیص هرپس ویروس آزاد ماهیان (*H.Salmon*), ویروس نکروز سلول های خونساز(IHNV), ویروس ماهی قزل آلای رنگین کمان(OMV) و ویروس سپتی سمی هموراژیک(VHSV) از سلولهای فیروblastی جنین ماهی آزاد چینو ک(*Chinook salmon*) استفاده گردد.

برای تشخیص رابدو ویروس اردک ماهیان (PFR) ، ویروس وايرمی بهاره کپور ماهیان (SVCV) و ویروس سپتی سمی هموراژیک(VHSV) از سلول های بافت پوششی (*Cammon carp*) استفاده گردد.

برای تشخیص ویروس مار ماهی (EVA)، ویروس ماهی طلائی(GSV) ، ویروس نکروز عفونی مراکز خونساز (IHNV) ، رابدو ویروس اردک ماهی ها (PER) و ویروس وايرمی بهاره کپور ماهیان(SVCV) از سلولهای اپیتیال انتهای تنه پشتی دم ماهی (*Fathead minnow*) از خانواده *Cyprinidae*. استفاده گردد.

برای تشخیص هرپس ویروس آزاد ماهیان (*H.salmonis*) و ویروس نکروز مراکز خونساز(IHNV) و ویروس نکروز عفونی پانکراتیک(IPNV) و ویروس ماهی قزل آلای رنگین کمان(OMV) و رابدو ویروس اردک ماهی ها (PFR) و ویروس وايرمی بهاره کپور ماهیان(VHSV) از سلولهای اپیتیال سلولهای جنسی ماهی رنگین کمان(*Rainbow trout*). استفاده گردد.

برای مطالعه بیشتر و دستیابی به تیره های مفید جهت شناسایی ویروس های آبزیان به کتاب ویروس شناسی ولف (Wolf,k.1988) مراجعه شود.

منابع

- ۱- آذری تاکامی، ق.، پوستی ا.، ابراهیمی، ع. ۱۳۷۶. بررسی تشخیص استعداد تولید مثل در مولدان تاسماهی ایران . مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران . دوره ۵۱. شماره ۳ و ۴. ص ۹۷-۱۱۱
- ۲- حامدی نهادنی، ز. ۱۳۷۹ . بررسی نرماتیوهای تکثیر در تاسماهی ایرانی . پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران. ص ۸۵
- ۳- قربانی نصر آبادی، رسول . ۱۳۷۹ . بررسی صفات مورفولوژیک ، سن، رشد، عادات غذایی و انگلهاهای بچه ماهیان قره برون و چالباش در سواحل جنوب شرقی دریای خزر . پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان . ص ۱۰۰
- ۴- روزبه فلاحتی، بررسی بیماری IHV در برخی مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان (Onchorhynchus mykiss) کشور، سال ۱۳۸۰، دوازدهمین کنگره دامپزشکی ایران
- ۵- روزبه فلاحتی، استفاده از کشت سلول برای جداسازی ویروسهای ماهیان، سال: ۱۳۸۰، دوازدهمین کنگره دامپزشکی ایران
- ۶- روزبه فلاحتی، تهیه کشت سلولی پرایمری از اندام های مختلف داخلی و خارجی ماهی
- ۷- روزبه فلاحتی، ۱۳۸۴. تهیه کشت سلولی پرایمری از اندام های مختلف داخلی و خارجی ماهی قرمز (Carassius auratus) به روش Planting، سومین کنگره ویروس شناسی ایران
- ۸- روزبه فلاحتی، ۱۳۸۴. تهیه کشت سلولی پرایمری از اندام های مختلف داخلی و خارجی ماهی قرمز (Carassius auratus) به روش هضم آنزیمی. چهاردهمین کنگره دامپزشکی ایران
- 9 - Andral, R.; Hurard, C.; Eizierre - Papayannl, P.; Vivaress, C.P. 1988.
Establishment and characterization of a rainbow trout kidney cell-line RTK montpellier. Pathology in marine science . Proceeding of the Third International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture Held in Gloucester Point Virginia. October, 2-6 .
- 10- Bejar,J.;Borrego,J.J.;Alvarez,M.C. 1997. A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-held seabream (*Sparus aurata L.*) Aquaculture, 150, 143-153. Bisswas,SP. 1993 . Manual of methods in fish biology .Dibrugrah university.pp 122
- 11 - Bols, N. C.; Barlian, A.; Chirino-Trejo, M.; Caldwell, S. J.; Goegan, P.; Lee, L. E. J. (1994) Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *O.mykiss* (Walbaum), gills. J. Fish Diseases, 17 , 6 , 601-611 .
- 12 - Chen-Jaun-Horng.; Chen-Shiu-Nan.; Kou-Guaag-Hsiuag .1987. Primary monolayer culture of common carp (*Cyprinus carpio*) fin and its susceptibility to fish virus. The Memoir of Virology and Pharmacology in Fish Disease, 1221-23 .
- 13 - Chen-Shiu-Nan.; Shih-Hsiu-Hul.; Kou-Guang-Hsiung .1995. Primary cell cultures from tissues of penaeid shrimps and their susceptibilities to monodon type baculovirus (MBV) Coa-Fish-Ser , 53, 1-14 .
- 14- Chi-Shau-Chi,; Chen-Shiu-Nan.; Kou-Guang-Hsiung .1987. Monolayer culture of goldfish (*Carassius auratus*) swimming bladder. The Memoir of Virology and Pharmacology in Fish Disease, 12 , 19-20 .
- 15- Dettlaf,T.A., A. S. Ginsburg, AND O. I. Schmalhausen. 1993 . Sturgeon fishes . Developmental Biology and Aquaculture . Springer- verlag , NEW YORK. Pp 210
- 16- Diago,M.L.; Lopez-Fierro, M.P.; Razquin,B. (1995) Establishment and characterization of pronephric stromal cell line (TPS) from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* W. Fish-Shellfish-Immunology. 5, 6 , 441-457 .

- 17-Doroshov S., Eenennaam V JP-Van,Webb-Mah, Deng- Xin, Mayfield-RB, Cech-JJ JR, Hillemeier-DC,Wilson-TH . 2001 . Artifitital spawning and larval rearing of klamat river green sturgeon . Transaction of the American Fisheries Society, Vol 130, No 1, p 159-165
- 18- Doroshov S., Eenennaam V JP-Van,Webb-Mah, Deng- Xin, Mayfield-RB, Cech-JJ JR, Hillemeier-DC,Wilson-TH . 2001 . Artifitital spawning and larval rearing of klamat river green sturgeon . Transaction of the American Fisheries Society, Vol 130, No 1, p 159-165
- 19- Doroshov S. Fred S. Conte . 1988 . Hatchary for the white sturgeon . Davis University. Pp 65-74
- 20- Dr. Ranga, Dr. Q.J.Shammi. 2002. Animal cell and tissue culture,
Fredric's, G. N. (1996) in Vitro culture of embryonic cells from the freshwater prawn *Macro brachium rosenbergii* . Aquaculture , 143 , 3-4 , 227-232 .
- 21- Fredric's, G.N. 1996. Identification and elimination of mycoplasma in fish cell line cultures. J. Fish Diseases, 19, 6 , 435-439 .
- 22- Holcik,J . 1989 . The Freshwater fishes of Europe . Aula- Verlag Wiesbaden, VOL 1 , part 2. pp 402
- 23- International Symposim on Fish Biologics: Serodiagnistics and Vaccines. Development in Biological Standardization. 49:233-241.
- 24- Kamler, E. 1992 . Early life history of fishes, An Energetics Approach. London , Chapman&Hal .pp 125
- 25- Lannan, C.N.,1994. Fish cell culture: A protocol for quality control.Journal of Tissue Culture Methods 16:94-98
- 26- Lidgerding, B.C., 1981. Cell lines used for the production of viral fish diseases agents.
- 27- Meyers, T.R, editor. 1997. Fish pathology section laboratory manual. Alaska Department of Fish and Game, Commercial Fisheries Management and Development. Juneau, Alaska. Pages 5-3 through 5-11.
- 28- Miller,T.J . 1995.The ralation between otolith size and larvea size at hatching for atlantic cod (*Gadus morhua*) . Fish Bulltin . Vol 102. p 325-332
- 29- Moberg G. P. Watson J. G. Moored. S. Linares J . 1996 . Reproductive conditions of the atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) in the hudson river . Estuaries journal , Vol 19 No 4 , p 769-777
- 30- Nikoloski,G. 1969. Detailed ichthyology.PWRIL waszawa (in polish).pp 250
- 31- Nijimasu, K.; Baiyo, S. 1987. Cell culture of rainbow trout liver. Bull. Jap. Soc. Fish Mitsubishi, 53 ,4 , 537-542 .
- 32- O.I.E. 1995. Diagnostic manual for aquatic animal diseases.
- 33- Perry, D. M. 1987. A procedure for obtaining erythrocytes from larval fish for cytological study and a description of larval blood of red hake , *Urophycis chuss* (Walbaum) and Atlantic mackerel , *Scomber scombrus* (Linnaeus) J. Fish Biol. 30, 6, 743-748 .
- 34- Ranga and Shammi Q.J. 2002. Fish Biotechnology
- 35- Rao , K. S.; Joseph , M. A.; Shankar , K. M.; Mohan, C.V. (1997) Primary cell culture from explants of heat tissue of Indian major carps . Curr. Sci , 73, 4, 374-385 .
- 36- Terrence ott. 2004. Tissue culture of fish cell lines, chapter 10.
- 37- Transboundary Diagnostic Analysis for the Caspian Sea. The Caspian Environment Programme, 2002
- 38- Wang, R.; Neumann, N. F; Shen, Q.; Belosevic, M.(1995)
Establishment and characterization of a macrophage cell line from the goldfish. Fish-Shellfish-Immunology.,5, 329-346.
- 39- Wolf, K.,1988. Fish viruses and fush viral diseases. Cornel University Press. Ithaca,new York. Pages 459-470.
- 40- Wolf, K., and Quimby, M.C.,1976. Procedures for subculturing fish cells propagating fish cell lines. Volume 2. Tissue Culture Association Manual 2:471-47

Abstract:

Fish cell lines have been used to support many areas of research, beginning with fish viruses and extending into immunology, genetic studies, toxicology, environmental effects, aquaculture and seafood quality and it is the first step in the gene banking, to preserve gene materials. The present study we cultured cell of interior pituitary of the *Acipenser gueldenstaedtii* gland, as a first attempts in IRAN.

FISH cell culture has widespread applications in virology, toxicology and as *in vitro* models in cytogenetic, biomedical, physiological researches. A cell line has been established from the *Acipenser gueldenstaedtii* interior pituitary and scales have been used to develop primary cell cultures. Recently, successful primary culture of the interior pituitary gland of *Acipenser gueldenstaedtii* has been developed by explants method.

The present study evaluated the potential of several interior pituitary gland from different developmental stages for development of cell cultures using explants method. Pituitary gland from various stages of the adult *Acipenser gueldenstaedtii* was collected under standard aseptic conditions. Developing gonads from 15-20-year-old male and female sturgeon were collected during late April and early May 2007. In all the cases the tissues were pooled in cold PBS-antibiotic-antimycotic solution (Sigma Chemicals, USA). The tissues were evaluated for attachment, growth and ability to undergo to produce suspension of cells. Primary cultures were initiated from the above tissues according to our earlier procedures, with certain modifications in the sub cultivation procedure. Briefly, tissues were cut into 1 mm³ size fragments which were seeded into 25 cm² tissue culture flasks. After appropriate semidrying and addition of minimum essential medium (MEM) (Sigma, USA) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) (Sigma, USA), cell growth was monitored. A seeding density of 1.5×10^5 cells as determined by a haemocytometer.

The results have been showed the *Acipenser gueldenstaedtii* interior pituitary cells growth in incubator Co₂ in 37° C, the cells adapted in this temperature. They were in Lag phase for 10 days, in log phase on 10- 22 days, and in stationary phase on 23- 28 days, after that they died. So we could produce sturgeon growth hormone from fish pituitary cells culture.

By this study we can passage the cells on 21th day, for every week. In this way we can produce continued cell culture and store them for gene banking

Key word: *Acipenser gueldenstaedtii*, pituitary gland, primary cell culture

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.