

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 پروژه/ طرح جامع کشت تیره‌های یاخته‌های آبزیان (فاز اول: کشت سلولی قسمت قدامی هیپوفیز ماهی چالباش
(*Acipenser gueldenstaedti*)
 - شماره مصوب: ۱۹-۸۲-۰۷۱۰۴۳۶۰۰۰
 - نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارنده‌گان: احمد غرقی
 - نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرح‌های ملی و مشترک دارد): -
 - نام و نام خانوادگی مجری/ مجریان: احمد غرقی
 - نام و نام خانوادگی همکاران: رضا پورغلام- مرتضی هاشم‌زاده- سهراب رضوانی- محمد طاهری- محمدرضا مهربابی-
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
 - شمارگان (تیراژ): ۱۵ نسخه
 - تاریخ انتشار: سال ۱۳۸۸
- حق چاپ برای مؤلف محفوظ است. نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع 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

پایسیر قحاله



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

سلولی قسمت قدامی هیپوفیز ماهی چالباش (*Acipenser gueldenstaedtii*)

کد مصوب: ۱۹-۰۷۱۰۴۳۶۰۰۰-۸۲

با مسئولیت اجرایی: احمد غرقی^۱

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

تأیید قرار گرفت. معاون تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

^۱ 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 آبزبان (فاز اول

کشت سلولی قسمت قدامی هیپوفیز ماهی چالباش (*Acipenser gueldenstaedtii*)

ایستگاه □

مرکز □

پژوهشکده □

در ستاد ■

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



به نام خدا

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

چکیده

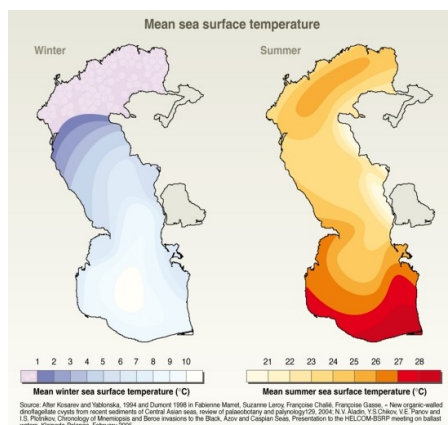
کشت سلولی یکی از مهمترین ابزارهای بیولوژیک محسوب می گردد و کاربردهای بسیاری در بررسی های ژنتیک مولکولی ایفا می کند و گام اول در زمینه ایجاد بانک سلولی محسوب می شود، که امروزه یکی از مهمترین ابزارهای مطلوب نگهداری ذخایر ژنتیکی آبزیان است و در حفظ تنوع زیستی آنان به عنوان سرمایه های ملی کاربرد دارد. به این منظور در این تحقیق برای اولین بار در کشور کشت سلول بافت هیپوفیزی ماهی 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، آن ها به محیط کشت سلولی حاوی DMEM + گلوتامین (glutamine) + بی کربنات سدیم (sodium bi carbonate) و سرم جنین گوساله اضافه شد و به سلوله اجازه داده شد تا تا سلول ها رشد کنند و در طول این مدت سلول ها را تحت نظر قرار داده و میزان و سرعت رشد آن ها بررسی گردید.

نتایج آزمایش ها حاکی از آن بودند که هرچند سلول های هیپوفیزی ماهی چالباش در انکوباتور دی اکسید کربن با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته بودند اما خود را با محیط سازگار نموده و از روز دهم وارد فاز رشد شدند. سلول های 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 تکثیری را انجام نداده اند و از آن پس تا روز چهارم فاز مرگ را سپری کرده و تمام سلول ها از بین رفتند و موفق به تولید هورمون رشد در محیط کشت مصنوعی نشده است. با توجه به رشد و ماندگاری سلول ها در این دوران می توان نتیجه گرفت که در شرایط مناسب و با پاساژدهی حداقل هر دو هفته یکبار می توان سلول ها را تا زمان طولانی کشت داده و از آن ها سلول های رده پیوسته را استخراج نموده و در زمینه بانک سلولی آبزیان با امکانات بیشتر قدم نهاد.

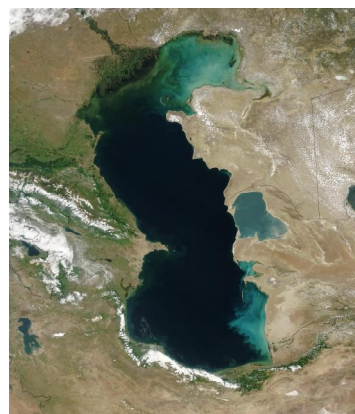
۱- مقدمه

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 جمهوری‌های ترکمنستان و قزاقستان محدود می‌شود. وسعت دریای خزر حدود ۴۳۶۰۰۰ کیلومتر مربع، ۱۲۰۰ کیلومتر طول و ۲۲۰ تا ۵۵۰ کیلومتر پهنا، و حجم آب آن افزون بر ۷۷۰۰۰ کیلومتر مکعب است. عمق آن از شمال به جنوب افزایش می‌یابد. 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 می‌دهد به ۹۶۰ تا ۱۰۰۰ متر می‌رسد، ژرفای ۱۰۲۵ متری نیز در ناحیه جنوبی این دریاچه گزارش شده است (Van der و همکاران، ۱۹۹۰). جهت جریان آب این دریاچه از سمت شمال غربی به جنوب شرقی است، همین ویژگی و ژرفای زیاد آب در کرانه‌های ایران که باعث کندی حرکت جریان می‌شود منجر به تجمع انواع آلودگی‌های این دریاچه در سواحل ایران به میزانی بیش از کرانه‌های دیگر کشورها می‌شود (Van der و همکاران، ۱۹۹۰). این دریا، محیط زیست گرانباترین ماهی‌های دنیا است. در بخش جنوبی دریای مازندران و رودخانه‌هایی که به آن می‌ریزند یعنی سواحل مربوط به ایران، ۷۸ گونه و زیرگونه ماهی یافت می‌شود. دریای مازندران یکی از بی‌همتاترین اکوسیستم‌های آبی جهان است که محیطی مناسب برای زندگی و رشد مرغوب‌ترین ماهی‌های خاویاری جهان گردیده است (حسینی، ۱۳۷۷).



(b)



(a)

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

ب) ماهیان خاویاری

ماهیان خاویاری یا استورژن (Sturgeon)، از خانواده تاس ماهیان، از جمله گونه‌های آبزی کم نظیری 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 تا به امروز باز مانده‌اند (Dettlaf 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 شپ و ماهی ازون 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 داراست. 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. فیل ماهی.

قره برون یا تاس ماهی 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 ترکی به معنای «بینی 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 می‌باشند گرچه رنگی تیره‌تر همراه با رنگ دانه‌های سفید دارد که تا بینی 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 ۱۴ سالگی بالغ می‌گردد (Dettlaf و همکاران، ۱۹۹۳).



شکل ۳. قره‌برون

تاس ماهی روس یا چالباش با نام علمی *Acipenser gueldenstadti* در زمره گونه‌هایی است که در تمام نقاط دریای خزر یافت می‌شود و خاویار آن را نیز از رتبه سوم ارزش 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).



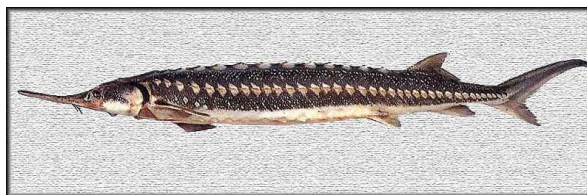
شکل ۴. چالباش

ماهی خاویار شیپ با نام علمی *Acipenser nudiventris* معمولاً ماهی مهاجری است که برای تخمیزی به سواحل ایران می آید و در رودخانه های آبریز دریای خزر تخمگذاری می کند. طول عمر آن به ۳۰ سال می رسد. 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 می گردد و تخمیزی می کند (آذری، ۱۳۷۶).



شکل ۵. شیپ

ماهی اوزون برون (دراکول) کوچک ترین ماهی خاویار دریای خزر می باشد که در ایران به اشتباه همه ماهیان خاویاری را به نام اوزون برون می شناسند. 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 می رود. در فاصله سنین ۸ تا ۱۲ سالگی بالغ می شود. طول آن ۱ تا ۱,۵ متر و وزنی سبک تر در قیاس با دیگر ماهیان این خانواده در دریای خزر دارد (آذری، ۱۳۷۶).



شکل ۶. اوزون 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 ایننام روی تاسماهی آتلانتیک آزمایش‌هایی را انجام دادند و میزان رسیدگی 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 دادند و در ضمن این پژوهش فراوانی مولدین نر و ماده تاسماهی آتلانتیک را نیز مورد بررسی قرار دادند. همچنین در سال ۱۹۹۸ روی تاثیر سن و اندازه بدن روی تکامل گنادهای تاسماهی آتلانتیک 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 ۱۳۰۱ 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 لقاح تخمها و مدت زمان رسیدگی جنسی آنها ندارند و همچنین بالاترین درصد لقاح را در محدوده شاخص قطبیت جنسی ۸-۶ اعلام کرد (حامدی، ۱۳۷۹).

طبق نظر دتلاف و گینزبورگ در سال ۱۹۹۳ بهترین درصد لقاح تخمها در شاخص قطبیت جنسی کمتر از ۸ دیده می شود. همچنین ایشان در مطالعات خود رابطه‌ای منطقی بین شاخص قطبیت جنسی و درصد لقاح تخمها و همچنین بین شاخص قطبیت جنسی و مدت زمان رسیدگی مولدین مشاهده کردند ولی رابطه ای بین شاخص قطبیت جنسی با کلاسه‌های 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 می دهد. این مسئله اهمیت مطالعه نرماتیوهای تکثیر این گونه را روشن می کند با توجه به اینکه جمعیت‌های مختلفی از این گونه در حوضه جنوبی خزر زندگی می کنند نرماتیوهای تکثیر در هر منطقه تحت تاثیر آب و هوای منطقه تخم‌ریزی 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،

درصد های لقاح و سایر نرماتيوه های تکثير در آنها مختلف خواهد بود و تکثير مولدين با درصد لقاح پايين علاوه بر اتلاف منابع ارزي کشور، ضربه به ذخاير اين گونه در دريای خزر خواهد بود (حامدی، ۱۳۷۹).

فيزيولوژی هورمون رشد در ماهیان

توليد مثل در ماهیها بوسيله ی فرآيندهای درون زا کنترل می گردد. اين فرآيندهای داخلی از طريق عوامل محیطی از قبيل نور، دما و عوامل غذایی تحريك می شوند. در مناطق معتدل تغييرات فصلی طول روز عامل مهم در آغاز رسيدگی غدد جنسی می باشد. در نتیجه ی اين هماهنگی فصلی، توليد نوزادان در فصلی انجام می پذيرد که شرايط تغذيه ای لاروها در بهترين حالت قرار دارد. چرخه ی توليد مثلی اساسا بوسيله هورمون کنترل و تنظيم می گردد. اين کنترل اصطلاحا توسط محور مغز-هیپوفيز-غدد جنسی صورت می پذيرد (ستاری، ۱۳۸۴).

نور از طريق چشم ها و غده ی پينه آل یا غده ی صنوبری که در بالاترين قسمت مغز جلویی قرار دارد، بر فرآيندهای داخلی ماهی تاثیر می گذارد. غده ی صنوبری ملاتونين را ترشح می کند. سطح ترشحي ملاتونين به سطح نور موجود در محیط بستگی دارد. بطوریکه بیشترین توليد ملاتونين در تاریکی انجام می گیرد. ماهیهای که در مناطق معتدل به سر می برند، معمولا به تغييرات طول روز (و ماهیهای گرمسیری به سیکل گردش ماه) حساس می باشند. در نتیجه ی تغييرات فصلی در توليد ملاتونين به همراه ریتم های درونزای ماهی، توليد هورمون آزاد کننده ی گنادوتروپين (GnRH) در هیپوتالاموس تحريك می گردد (Pavlov و همکاران، ۲۰۰۷).

تاکنون هفت نوع هورمون آزاد کننده ی گنادوتروپين در مهره داران شناسایی گردیده که تا به امروز دو نوع از اين هورمون در ماهیان استخوانی عالی مورد شناسایی قرار گرفته است GnRH-II و GnRH-I. جوجه (cGnRH-II) و آزاد ماهیان (sGnRH) در مغز تعدادی از ماهیان استخوانی از قبيل ماهی طلایی، قزل آلاي رنگين کمان، آزاد ماهیان و سوف ماهیان دریایی وجود دارد (Kah و همکاران، ۱۹۹۳). هورمون آزاد کننده ی گنادوتروپين به غده ی هیپوفيز (که متصل به هیپوتالاموس می باشد) منتقل شده و سبب القای رسيدگی جنسی از طريق تحريك سلول های عصبی- ترشحي ویژه در هیپوفيز برای توليد و ترشح دو نوع هورمون گنادوتروپين :

۱- هورمون محرک فولیکول (GTH-I=FSH)

۲- هورمون محرک جسم زرده (GTH-II=LH) می گردد.

گنادوتروپین های سنتز شده در گنادوتروپ های غده ی هیپوفیز، به داخل چرخه ی خونی محیطی ترشح شده و از طریق اتصال به گیرنده های واقع در غدد جنسی سبب القای فرآیند استروئیدوژنز و گامتوژنز در ماهیها می شود.

کنترل هورمونی رشد و رسیدگی نهایی تخمک

تخمدان در ماهیان استخوانی از اووگونیا، اووسیت، سلول های فولیکولی محاط کننده ی تخمک، بافت های حمایتی یا استروما و بافت عروقی و عصبی تشکیل شده است (ابراهیم زاده، ۱۳۸۲). با رشد اووسیت ها، سلول های فولیکول چند لایه می گردند. این لایه ها عبارتند از لایه سلولی دانه دار یا گرانولوزا و لایه ی تک. بنابر این اووسیت در مرحله ی زرده سازی مانند سایر مهره داران، دارای دو لایه ی سلولی اصلی _ یک لایه سلولی در بیرون (لایه ی تک) و یک لایه سلولی داخلی (لایه ی گرانولوزا) _ می باشد که بوسیله ی یک غشای پایه از همدیگر جدا می گردند. لایه ی تک از سلول زاینده ی بافت پیوندی (فیروبلاست)، فیبرهای کلاژن و مویرگ و در برخی از گونه ها سلول های ویژه تشکیل شده است (Nagahama 1994).

در مرحله ی ابتدایی رشد تخمک ها در مرحله ی پروفاز، تقسیم میوز متوقف می شوند. با وجود این تخمک ها به رشد خود ادامه داده و در مرحله ی زرده سازی یا ویتلوژنز به حداکثر رشد خود میرسند (ابراهیم زاده، ۱۳۸۲). مواد تشکیل دهنده ی زرده ی تخم (ویتلوژنین) در این مرحله از کبد از طریق جریان خونی وارد اووسیت می گردد. با توجه به اینکه گنادوتروپین باعث تحریک سنتز ۱۷-بتا-استرادیول (E) می شود که در حقیقت محرک سنتز ویتلوژنین کبدی است، جذب ویتلوژنین بوسیله ی اووسیت توسط گنادوتروپین نوع اول و احتمالاً دیگر فاکتورهای رشدی تحریک و کنترل می گردد (Tyler و همکاران، ۱۹۹۱) در طول رشد تخمک، پوسته ی تخم یا پوسته ی ویتلین، بین سلول های لایه ی گرانولوزا و غشاء اووسیت تشکیل می شود. پوسته ی تخم حاوی یک لایه ی نازک بیرونی و لایه ضخیم درونی می باشد (Swanson, 1994)، پروتئین های زنورادیاتا (Zr) از جنس گلیکوپروتئین بوده که در کبد در پاسخ به ترشح ۱۷-بتا-استرادیول (E) تولید میگردند (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 می یابد.

تولید ۱۷- بتا -استرادیول (E) توسط سلول های فولیکولی تخمدان آزاد ماهیان به سلول های ویژه ایی از هر دو لایه ی سلولی تک و گرانولوزا نیازمند می باشد. تستوسترون (T) توسط سلول های لایه ی تک تولید شده و به وسیله آنزیم آروماتاز در سلول های لایه ی گرانولوزا به ۱۷-بتا- استرادیول (E) تبدیل می گردد. در گونه های دیگر سلول ویژه لایه ی تک وجود نداشته و سلول های لایه گرانولوزا مکان اصلی تولید استروئیدها می باشند (Swanson, ۱۹۹۴) در آزاد ماهیان مشاهده گردیده که سطح هورمون گنادوتروپین نوع اول ارتباط معنی داری با سطح هورمون ۱۷-بتا- استرادیول و پروتئین های لایه ی زونارادیاتا دارد (Oppen-Berntsen و همکاران، ۱۹۹۲). بنابراین تولید ویتلوژنین و پروتئین های پوسته ی تخم در آزاد ماهیان احتمالا بطور غیر مستقیم توسط گنادوتروپین نوع اول از طریق تاثیر آن بر روی تولید استرادیول، انجام می گیرد (Swanson, ۱۹۹۴). در ادامه ی رشد تخمک، شاهد فرایند های رسیدگی نهایی (FOM) شروع دوباره ی تقسیم میوز و تخمک گذاری (اوولاسیون) در تخمدان ماهیها هستیم. حقیقات انجام شده بر روی ماهیهای مختلف نشان می دهند که گنادوتروپین ها از طریق تولید هورمون های القاء کننده ی 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 -17: آلفا-هیدروکسی پروژسترون ۱۷ (OHP-)، -17 آلفا- ۲۰-بتا- دی هیدروکسی -۴ پریژنن -3- وان ۱۷ (a,20B-DP)، -17 آلفا- ۲۰-بتا- ۲۱- تری هیدروکسی -۴ پریژنن -۳- وان ۲۰ (s-)، کورتیزول، دی اکسی کورتیکواسترون (Swanson, ۱۹۹۴). در آزاد ماهیان گنادوتروپین سبب تحریک سلول های لایه ی تک برای تولید ۱۷-آلفا-هیدروکسی پروژسترون می گردد. این هورمون در سلول های لایه ی گرانولوزا در اثر فعالیت آنزیم-20 بتا-هیدروکسی استروئید دی هیدروژناز ۲۰ (HSD-B به ۱۷- آلفا- ۲۰-بتا- دی هیدروکسی -۴ پریژنن -۳- وان ۱۷ (a,20B-DP) تبدیل می شود (Nagahama 1994) هورمون های القاء کننده ی رسیدگی جنسی سبب تولید فاکتور پیش برنده ی 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 مرحله ی متافاز متوقف می گردد (Thomas, 2003) در فولیکول آزاد ماهیان قبل از تخمک گذاری (اویولاسیون) هر دو نوع گنادوتروپین در تحریک سلول های لایه ی تک برای تولید ۱۷-آلفا-هیدروکسی پروژسترون نقش دارند ولی گنادوتروپین نوع دوم در تبدیل ۱۷-آلفا-هیدروکسی پروژسترون به ۱۷-آلفا-۲۰-بتا-دی هیدروکسی -۴ پرژنن -۳-وان ۱ مؤثرتر می باشد. افزایش توانایی گنادوتروپین نوع دوم در طول این مرحله با ظهور گیرنده های ویژه ی GTH-II بر روی لایه ی گرانولوزا همراه می باشد. بعد از مرحله ی زرده سازی، توانایی فولیکول برای تولید ۱۷-بتا-استرادیول کاهش یافته و از فعالیت آنزیم آروماتاز در سلول های گرانولوزا بطور چشمگیر کاسته می شود و در عوض فعالیت آنزیم ۲۰-بتا-هیدروکسی استروئید دی هیدروژناز ۲۰ (B-HSD) افزایش می یابد. در این زمان توانایی سلول های تک در پاسخ به افزایش گنادوتروپین برای تولید تستوسترون افزایش یافته و درست قبل از رسیدگی نهایی تخمک تولید ۱۷-آلفا-هیدروکسی پروژسترون ۱۷ (OHP-) توسط سلول های تک گسترش می یابد (Swanson, ۱۹۹۴)، بنابراین، GTH-II پلازما 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-آلفا-۲۰-بتا-دی هیدروکسی -۴ پرژنن -۳-وان و ۱۷-هیدروکسی پروژسترون) در سلول های لایه ی تک تخمک می گردد (ابراهیم زاده، ۱۳۸۶). تولید ۲۰-بتا-هیدروکسی استروئید دی هیدروژناز ۲۰ (B-HSD) نیز توسط گنادوتروپین نوع دوم کنترل می گردد چون سطح پلاسمایی این ماده در این دوره افزایش یافته و گیرنده های GTH-II واقع در لایه ی گرانولوزا نیز در این زمان گسترش می یابند (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 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 (موش، هامستر، جوجه،.....) و بافتهای انسانی کشت می گردد و این نقیصه با کشت انبوه یاخته های تیره ای آبزیان اقتصادی کشور تکمیل می گردد و این فرآیند ضمن خودکفایی مملکت و بالابردن 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 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 بافتهای محدود دو نوع آبزی پرورشی آنها با آبزیان پرورشی ما مشابه است (بافت اپی تلیال کپور معمولی و بافت گوناد ماهی قزل آلابی رنگین - کمان) لذا تولید یاخته های اختصاصی آبزیان با اهداف ذیل باعث اطمینان از سرمایه گذاری و بالابردن ارزش افزوده آبزیان و ایجاد امنیت غذایی کشور می گردد.

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 Harrison 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 می توانند 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 سال 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 فیروبلاست انسانی پس از تعدادی تقسیم در محیط کشت مرده و توانایی حیاتی محدودی دارند.

در سال ۱۹۷۵ Milstein و Koehler توانست از سلول‌های رده هیبریدی 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 روش ها

۲-۱- وسایل و تجهیزات

- هود بیولوژیک
- مته 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 Cm²
- پیپت ۵ و ۱۰ میلی لیتری
- لوله سانتریفیوژ ۱۵ سی سی
- پمپ خلاء

۲-۲- مواد و محلول ها

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

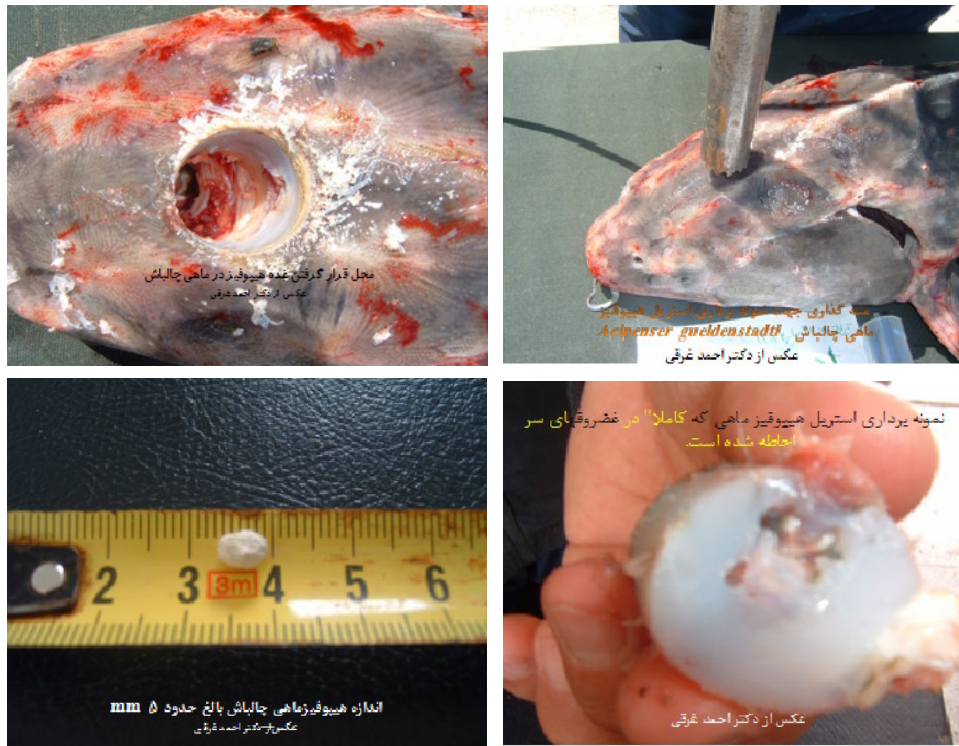
۳-۲- شرح عملیات (برنامه کاری)

۱- تهیه هیپوفیز ماهی چالباش

غده هیپوفیز ماهی چالباش بلافاصله پس از صید و ضد عفونی با استفاده از یک مته 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 نگاهداشته 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 خاوباری

کشت اولیه از طریق انتقال یاخته ها از قطعات بافت های 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 سلول ها در شرایط استریل و عاری از میکروب ها انجام گردید. وجود فیلترهای HEPA (High Efficiency Particle) در هود میکروبیولوژی باعث حذف ذرات بزرگتر از 0.3 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 ۵۰ میلی گرم در لیتر استرپتومایسین ۵۰ 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 نمونه ها ۳ بار با محیط کشت شست و شو داده شد، سپس هر نمونه را جداگانه در پتری دیش ۹۰ میلی متری استریل یکبار مصرف به وسیله قیچی ریز استریل جراحی تکه تکه کرده و برای بهتر خرد شدن بوسیله تیغ بیستوری شماره ۲۰ بافت های تکه تکه شده خیلی ریز تر شده و هر نمونه با ۵ میلی لیتر محیط کشت به لوله سانتریفیوژ ۱۵ سی سی انتقال داده شد و بر روی هر نمونه به میزان ۵ میلی لیتر آنزیم تریپسین ۰.۲۵٪ 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 ۲ mm نیستند خرد شده و جهت شست و شوی فیزیولوژیک و به منظور هموژن نمودن بافت هیپوفیز ماهی چالباش از محلول فیزیولوژیک (نمکی) نرمال (۰/۹g / ۱۰۰NaCl) و یا محلول نمکی ایزوتونیک تجارتي 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 ایده آل از محیط کشت EMEM به همراه Earle's BSS در ظروف بسته شده استفاده شد. تقریباً pH ایده آل ابتدایی که ۷/۸ - ۷/۶ می باشد ایجاد نموده سپس به منظور ادامه کار با استفاده از Co₂، 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 کشت های حاوی بذر سلول های هیپوفیزی ماهی چالباش جهت رشد و تکثیر به انکوباتور CO₂ به منظور ایجاد محیط مناسب از جهت دما، رطوبت و CO₂ منتقل گشت. جداسازی یاخته ها به روش مکانیکی: در این روش یاخته ها هنگام ریز کردن بافت-ها و یا عبور دادن بافت ها از توریها، و یا گذراندن 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.

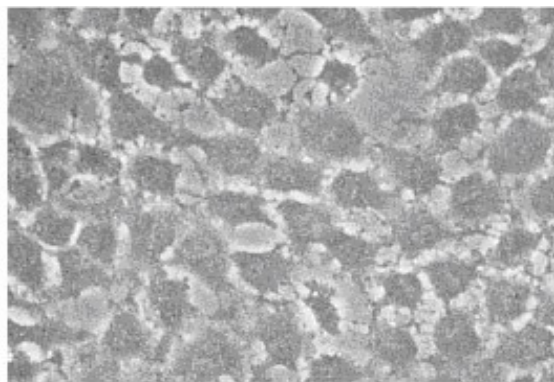


شکل ۱۴. بافت هیپوفیزی ماهی چالباش در انکوباتور دی اکسید کربن.

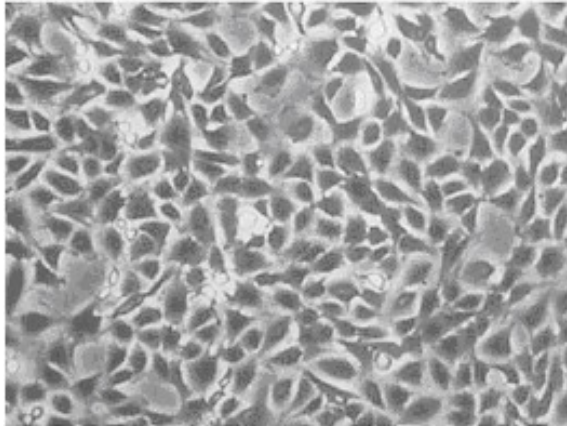
جداسازی یاخته ها به روش آنزیمی : بافت های هیپوفیز له و مخلوط شده در انکوباتور دی اکسید کربن با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت و برای اینکه آنزیم تریپسین بر روی بافت ها اثر کند، هر ۱۵ دقیقه لوله ها را تکان دادند. بعد از پایان انکوباسیون اجازه داده شد بافت های معلق در دمای اتاق ته نشین شوند. محلول بالایی (سوپرنیتنت 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 سوپرنیتنت 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 ، کلاژناز(kolagenaz) ، الاستاز(elastaz) ، هیالورونیداز(hialoronidaz) ، دی آن آز(di an az)، پروناز(prunaz) و یا مخلوطی از آنها بدست آمده .

جداسازی یاخته های زنده از غیر زنده : یاخته های مرده را در کشت اولیه از طریق سانتریفیوژ کردن در مخلوطی از فیکول(ficoll) و متریزوات 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 تکه شد.



شکل ۱۶. مشاهده سلول‌های تریپسین دهی شده

تهیه تیره یاخته ای آبزبان

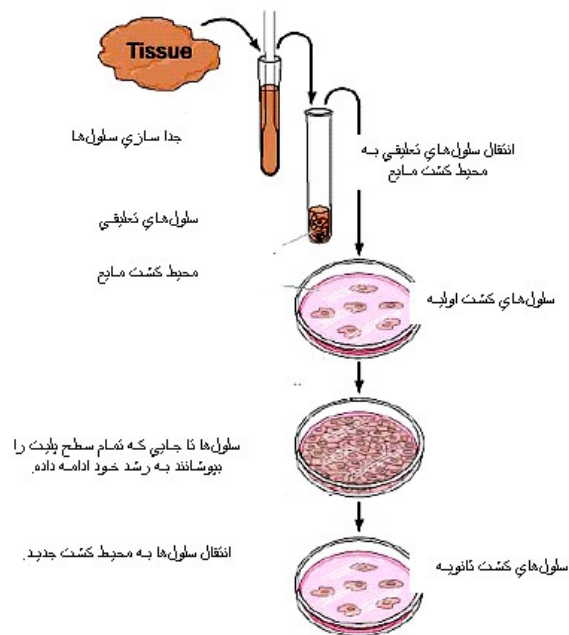
کشت اولیه حاوی انواع یاخته های متفاوت و بسیار ناهمگن از بافت اصلی به منظور تهیه یک تیره یاخته ای همگن تری به دست آمد و خصوصیات آنها بررسی شد و یاخته ها ذخیره گشتند. در این مرحله از مطالعه علاوه بر افزایش تعداد یاخته ها و یکنواختی آنها امکانات تجربی وسیعی فراهم شد.

پس از کشت اولیه هیپوفیز، کشت ثانویه انجام گردید.

سپس با استفاده از روش کلونینگ تیره های متفاوت یاخته ای و مناسب ترین سلول دودمانی هیپوفیز انتخاب شدند و آنها در محیط کشت سلولی حاوی * DMEM + 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 سانتریفوژ (۵۰۰-۲۰۰) دور به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد به محیط استریل و عاری از آنتی بیوتیک منتقل شد و هر ماه تیره های یاخته ای بدست آمده از نظر PH، شفافیت و عدم آلودگی، مرفولوژی، تمیز بودن و کیفیت یاخته مورد آزمایش قرار گرفت و بهترین کشت برای کشت مجدد و تولید کشت های دختر در شرایط سرمای بخار مایع ازت جامد حفظ گشت (Ranga and Shammi, 2002).



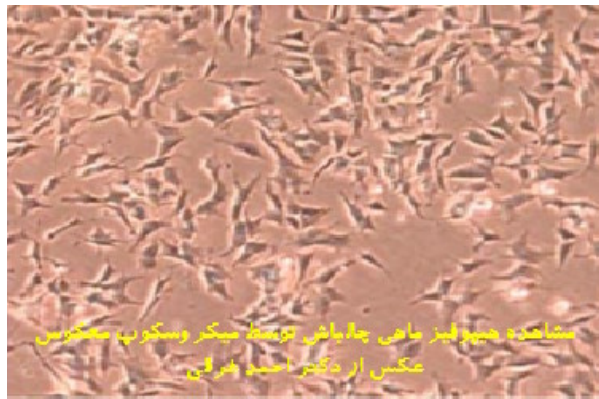
شکل ۱۷. مشاهده کشت سلولی هیپوفیز ماهی چالباش.



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 سلولها چسبندگی به سطح نداشتند و مشاهدات در زیر میکروسکوپ اینورت نشان داد که فقط بیشتر سلولها از نظر مرفولوژی سلولهای کروی و از نظر اندازه دوبرابر شده بودند که به همین شکل می مانند.

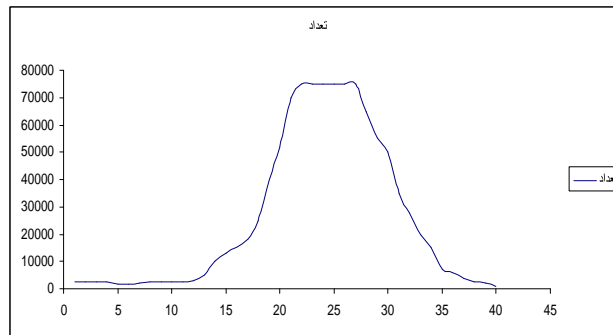


شکل ۱۹. مشاهده سلولهای کشت داده شده توسط میکروسکوپ اینورت.

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

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

جدول ۱. تعداد سلول ها در شمارش روزانه.



نمودار ۱. افزایش تعداد سلول‌های 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 ۷۵۰۰۰ سلول در میلی لیتر



شکل ۲۲. مشاهده سلول‌های 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

۳-۱- تجزیه و تحلیل نتایج

نیروی محرکه در رشد سلولی:

رده سلولی ثابت (Established Cell Lines)

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

فاز آهسته (Lag phase)

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

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 حداکثر رسید، رشد سلول‌ها متوقف شد و سلول‌ها وارد فاز سکون گشتند.

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

$$N = N_0 2^{kt}$$

$$\text{Log } N = \text{log } N_0 + Kt \log^2$$

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

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

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

ضریب برگشتی ($T=1/K$).

بنابراین معادله فوق را به صورت زیر می‌توان نوشت:

$$\text{Log } N = \text{log } N_0 + n \log^2$$

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

از آنجاییکه $1/\log^2 = ۳/۳۲$ ، بنابراین معادله فوق را می‌توان به شکل زیر خلاصه نمود:

$$n = ۳/۳۲ (\text{Log } N - \text{log } N_0)$$

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

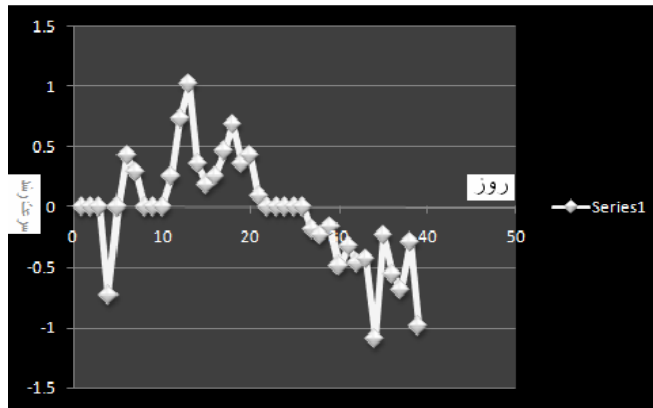
تقسیم نشدند و تعداد بسیاری از آنها مردند این نسبت تقسیم می‌گردد.

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

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

روز	سرعت رشد سلول های هیپوفیز ماهی چالباش در محیط کشت
۱-۲	۰
۲-۳	۰
۳-۴	۰
۴-۵	-۰/۷۳
۵-۶	۰
۶-۷	۰/۴۳
۷-۸	۰/۲۹
۸-۹	۰
۹-۱۰	۰
۱۰-۱۱	۰
۱۱-۱۲	۰/۲۶
۱۲-۱۳	۰/۷۳
۱۳-۱۴	۱/۰۲
۱۴-۱۵	۰/۳۶
۱۵-۱۶	۰/۱۹
۱۶-۱۷	۰/۲۶
۱۷-۱۸	۰/۴۶
۱۸-۱۹	۰/۶۹
۱۹-۲۰	۰/۳۶
۲۰-۲۱	۰/۴۳
۲۱-۲۲	۰/۰۹
۲۲-۲۳	۰
۲۳-۲۴	۰
۲۴-۲۵	۰
۲۵-۲۶	۰
۲۶-۲۷	۰
۲۷-۲۸	-۰/۱۹
۲۸-۲۹	-۰/۲۳
۲۹-۳۰	-۰/۱۶
۳۰-۳۱	-۰/۴۹
۳۱-۳۲	-۰/۳۳
۳۲-۳۳	-۰/۴۶
۳۳-۳۴	-۰/۴۳
۳۴-۳۵	-۱/۰۹
۳۵-۳۶	-۰/۲۳
۳۶-۳۷	-۰/۵۶
۳۷-۳۸	-۰/۶۹
۳۸-۳۹	-۰/۲۹
۳۹-۴۰	-۰/۹۹

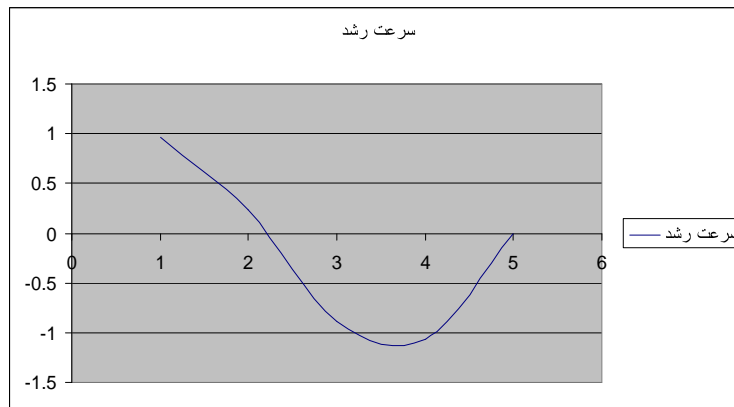
جدول ۲. تغییرات روند سرعت رشد روزانه



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

جدول ۳. تغییرات روند سرعت رشد هفتگی

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



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

۴- بحث و نتیجه گیری

مطالعه کشت سلول هیپوفیزی 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 حلالیت مواد، سازگاری اجزای تشکیل دهنده، خلوص ترکیبات سازنده محیط و ثبات مواد شیمیایی از جمله فاکتورهای مهم کنترلی در حین کشت سلولهای 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 Semi-synthetic نامیده می شوند (Terrence, 2004).

محیط های کشت طبیعی مورد استفاده

گستره ی 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 پلاسما منعقد شده
- ۲- مایعات بیولوژیک: مانند سرم، مایعات بافتی بخصوص مایعات جنینی

پلاسما منعقد شده

پلاسما به ندرت جهت مصارف کشت سلول مدرن مورد استفاده قرار می گیرد. در قدیم برای کشت قطعات کوچک بافت بخصوص 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 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 گشتند. این نوع سرم ها معمولاً در محیط های نیمه مصنوعی که حاوی ترکیبات با وزن مولکولی پایین می باشند مورد استفاده قرار می گیرند که نقش آنها تامین مولکولهایی با وزن بالا می باشد. اما سرم مورد استفاده در کشت سلولی هیوفیز ماهی چالباش سرم کامل است (Terrence, 2004).

محیط های مصنوعی

محیط های ساخنگی 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. فرمولاسیون متعددی به طور تجاری در دسترس هستند که ما در این میان از محلول نمکی متعادل شده هنکس (Hanks balanced salt solution) استفاده کردیم که یکی از مفیدترین آنهاست 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	Earle's	Hank's	Buffered saline Phosphate
BSS	BSS		
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 ml/L ۱ بوده است.

۳- کنترل pH

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 و همچنین هیپوفیز ماهی چالباش فراهم می‌نماید (جدول ۲). مجموعاً تیره‌های سلولی فوق قادر هستند که بسیاری از ویروس‌های ماهیان را برای جداسازی تکثیر دهند.

Cell line Designatio						
Common	ATCC	Animal	Tissue	Morphology	Somefish viruses replicated	Temperature rprerence(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	Epithelail	EV-2,GSV,IHNV,IPNV,PER,SVCV	0-36
RTG-2	CCL-55	Rainbow trout	Gonad	Epithelial	H.salmonis,IHNV,IPNV,OMV,PER,VHSV	

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

a. CCV، ویروس گربه ماهی کانالی، EVA ویروس مارماهی، GFV ویروس ماهی طلائی، GSV ویروس ماهی طلائی درخشان، H.Salmonis، Herpesvirus salmonis، IHNV، Infection hemtopoietic necrosis virus، IPNV، 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 آن ها 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 Co2 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 Co2 اولیه از ظروف کشت به داخل محیط (اتمفسفر) منتشر شده و باعث می شود که pH افزایش پیدا کند. بعضی از افراد از اسید هیدروکلریک (hydro cloridric 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 می کنند، از طریق اضافه کردن محیط به تنهایی در ظروف کشت رد شده است. اگر سلول‌ها وجود داشته باشند pH افزایش پیدا خواهد کرد و حتی به مقادیر بالا خواهد رسید. همچنین می توان در ظرف محیط کشت باز از بافرهای آلی استفاده کرد. یکی از روش‌ها نظیر سیستم بافری شامل ۹Mm بی کربنات سدیم (NaHCO₃) و ۱۶Mm هیدروکسی متیل آمینومتان (hydroxyl methyl amino metan) است. متناوباً N-2-Hydroxy Ethyl Piperazine-N-2-Ethane Sulfonic acid 14Mm (HEPES) مجدداً با ۹Mm بی کربنات سدیم استفاده می شود. بافرهای آلی از محلول استریل مادر که تحت pH=۷/۸ در ۲۵ درجه سانتی گراد تهیه شده اند اضافه می شوند.

هود میکروبیولوژی (Laminar Air flow):

کلیه کارهای انجام شده جهت رشد و تکثیر سلول های هیپوفیز ماهی چالباش در شرایط استریل و عاری از میکروب ها 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 می نمود. با توجه به جهت و مسیر هوا در این هودها آن ها را 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 می کنیم.

هود میکروبیولوژی کلاس I

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

هود 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.

هود میکروبیولوژی کلاس III

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

انکوباتور CO₂

انکوباتور CO₂ معمولاً از محدوده گرمایی ۲۸ درجه (برای رده های سلولی حشرات) تا ۳۷°C (برای رده های سلولی پستانداران) با کنترل حرارت ۰/۵ ± درجه سانتی گراد کاربرد دارد (chen و همکاران ۱۹۸۷). وجود بی کربنات (bi carbonate) به عنوان بافر در محیط کشت سلول ها و وجود ۱۰-۵ درصد CO₂ از نیاز های اولیه سلول ها جهت رشد بود که این میزان CO₂ توسط انکوباتور و دستگاه حساس سنجش CO₂ تامین گردید. رطوبت ۸۰-۶۰ 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 آلودگی آن ها استفاده شد.



شکل ۲۵. بررسی سلول های هیپوفیز ماهی چالباش.

سانتریفیوژ

از سانتریفیوژهای یخچال دار در کشت سلول های هیپوفیز ماهی چالباش جهت جمع-آوری سوپ روئی کشت ها سلولی و تهیه سلول ها جهت نگهداری و پاساژ استفاده شد. جهت جلوگیری از تولید ذرات آئروسول (aero cells) از سانتریفیوژ محفظه (باگت) درب دار استفاده نمودیم.

یخچال و فریزر

جهت نگهداری محیط های کشت از یخچال ۲-۸ درجه و از فریزر ۲۰- 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 را نیز 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 ۰/۲۲ 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، ویسکوزیته و تنش سطحی از جمله فاکتورهای مهم در تهیه و فرمولاسیون محیط های کشت سلول هستند که به اجمال توضیح داده، خواهد شد.

حلالیت 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 هیپوفیز ماهی چالباش نیز کاملاً عاری از این قبیل عناصر فلزی بودند. عناصر معدنی دیگری نظیر روی، منگنز و کبالت 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 هیپوفیز ماهی چالباش وارد شدند.

ناپایداری شیمیایی 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 pirolidyn) و آمونیوم (ammonium) تجزیه می‌گردد. به همین دلیل گلوتامین به عنوان آخرین ماده به محیط کشت سلول‌های هیپوفیز 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 سیستین (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 هیپوفیز ماهی چالباش سمی هستند. همچنین ممکن است حاوی اندوتوکسین (endotoxin) آزاد شده از باکتری‌های گرم منفی باشد. جهت فرمولاسیون محیط کشت هیپوفیز 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 تقطیر می‌گردد).

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 ابتدای کشت بودند به این تغییرات حساس بوده و فقط با اسمولاریته کنترل شده قادر به رشد بودند. سلولها جهت رشد به فشار اسمزی بین ۲۸۰-۳۲۰ Osm/lit نیاز داشتند. اگرچه اسمولاریته ایده آل در حدود ۲۹۰-۳۰۰ 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 ۳۲ 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 NaCl ذخیره باعث تغییر غلظت NaCl در محیط به میزان یک میلی گرم در میلی لیتر می شود.

دما

تاثیر مستقیم دما بر سلولها امری بدیهی است. اما علاوه بر این، تاثیر غیر مستقیم دما بر pH محیط از طریق افزایش حلالیت CO₂ در دماهای پایین حائز اهمیت می باشد. همچنین مقدار PKa 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 ۰/۲ واحد کمتر از حرارت ۳۷ درجه خواهد بود. شایان ذکر است که فنل 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 ۰/۰۰۵٪ تا حدودی اثرات سمی خواهد داشت.

ویسکوزیته

ویسکوزیته محیط های کشت سلول های هیپوفیز 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 پتپایز کردن سلولها) ویسکوزیته محیط نقش مهم و حیاتی در جلوگیری از آسیب رسیدن به سلولها بازی نموده است. در مقیاس کلان کشت این آسیبها می تواند از طریق افزودن کربوکسی متیل سلولز (carboxy methyl cellulous) و یابلی و نینیل پیرولودین (Poly vinyl pirolodyn) به محیط کشت (جهت افزایش 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 کردن 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 دناتور شدن پروتئین و غیرفعال شدن آنزیم موجود در محیط گردد. اگر کف ایجاد شده به گردن و یا دهانه ظرف کشت برسد، ریسک آلودگی 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 ارگانسیم های هتروتروف نیست. این اسیدهای آمینه به همراه تیروزین و سیستئین می بایست به محیطهای

مصنوعی، حتی اگر محتوی سرم باشند اضافه کردند. به طور کلی نیازمندی های خاص بنابه نوع و شرایط کشت متفاوت است. به عنوان مثال اسیدهای آمینه غیر ضروری ممکن است به دلیل عدم توانایی سلولها در سنتز 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 لیزوزومی، مرگ سلولی و القای آسیب های کروموزومی می گردد. همچنین عدم تعادل در غلظت آمینواسیدها می تواند باعث ایجاد تغییرات کاربوتایی 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 گردند. 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 بایست 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، سیتدین، یوریدین . تیمیدین بخصوص در صورتی که ذخیره اسید فولیک (folic acid) در کشت هایی با چگالی پائین کم باشد به محیط کشت افزوده می شوند. محیط ۱۹۹ به طور خاص فاقد اسید فولیک بوده و پیش نیازهای ساخت اسیدهای نوکلئیک می بایستی به صورت کمکی به آن اضافه شوند.

منابع کربنی

بیشترین منبع انرژی از کربوهیدرات ها تأمین می شود، که شامل گلوکز و گالاکتوز (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 (pivat) نیز ضروری می باشد.

ویتامین ها

سرم یک منبع اساسی در تأمین ویتامین در کشت سلولی می باشد، با این حال در بسیاری موارد برخی از ویتامین ها به آن افزوده می شود. ویتامین ها به عنوان پیش ساز بسیاری از کوفاکتورها (co factors) شناخته شده است. بسیاری از ویتامین ها مانند ویتامین های گروه B در رشد و تکثیر و ویتامین B12 برای بقای سلول ها بسیار حائز اهمیت است. برخی از رده های سلولی به ویتامین E و A بیشتری نیاز دارند. ویتامین های بیوتین (biotin) و تیامین (thiamin) در اغلب محیط های کشت استفاده می شوند.

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

مقادیر کافی کولین (choline) جهت شرکت در ساختمان غشای فسفولیپیدی سلولها لازم می باشد و کمبود این ویتامین باعث مرگ سلولی می گردد. کولین به مقدار کافی در سرم موجود می باشد و فقط در صورت استفاده از محیط های بدون سرم SFM به صورت کمکی مورد استفاده قرار می گیرد.

اسیداسکوربیک (ویتامین C) ترکیبی ضروری برای بیشتر سلولها بوده و فقط در صورتی که کشت ویروس های RNA دار توموری مورد نظر باشد می بایست از محیط کشت حذف گردد.

پروتئین ها و پپتیدها

در سرم پروتئین های ضروری وجود دارند و در برخی موارد پروتئین های افزودنی نظیر آلبومین (albumin)، ترانسفرین (transferrin)، فیبرونکتین (fibronectin) و فیتوئین (fitoin) نیز به محیط کشت افزوده می شود.

اسیدهای چرب و لیپیدها

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

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 بخشند 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:

- ۱- تامین فاکتورهای هورمونی جهت بهبود عملکرد و رشد سلولها
- ۲- تامین فاکتورهای چسبندگی و پراکندگی سلولها
- ۳- 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), (CSF) اختصاصاً در مراحل از تمایز سلولی عمل می کنند. برخی دیگر نظیر Epidermal Growth Factor, EGF به صورت تزایدی بر انواع مختلف سلولها اثر کرده و باعث تکثیر سلولهای فیرو بلاست اپیدرمی و سلولهای گلیال می گردند. از سویی دیگر ممکن است یک سلول خاص به تعداد زیادی فاکتورهای رشد پاسخ دهد.

مثلاً فیرو بلاست ها به فاکتورهای نظیر EGF, PDGF, Fibroblast Growth Factor, FGF, و سوماتومدین (sumatomedin) پاسخ می دهد. نیاز سلولها به فاکتورهای رشد و اثر این مواد بر روی سلولها، مسئله ای 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 غیر فعال شدن با سیستم حساس بوده و به مقادیر بالا در محیط های کشت استفاده می شود. هورمون های گلو کورتیکوئیدی (glucorticoid) نظیر هیدرو کورتیزون (hydrocortisone) و دکسامتازوم (dexametasom) بسته به نوع سلول می توانند به عنوان ممانعت کننده و یا محرک رشد عمل نمایند. دیگر هورمون های استروئیدی، مانند استرادیول (stradiol)، تستوسترون، پروژسترون (progesterone) و هورمون های تیروئید (tiroids) در کشت برخی دودمان های سلولی جزئی ضروری بحساب می آیند.

فاکتورهای پراکندگی و چسبندگی سلولی

بیشتر سلولهای دستکاری نشده (از نظر ژنتیکی) برای رشد و تکثیر می بایست به یک سطح جامد متصل شوند. فقط سلول های خونی و سلول های دستکاری شده (Transformed) بدون اتصال به سطوح می باشند. کندروتکین (condrotekin) جزء ضروری برای چسبیدن کندروئیت ها و لامینین (laminin) ترکیب لازم برای چسبندگی سلولهای اپیتال 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 انتقال دهنده آهن نمونه چنین پروتئین هایی هستند.

اسیدهای چرب

سلولها نیازمند مقادیر متفاوتی از اسیدهای چرب ضروری، فسفولیپیدها و کلسترول هستند. پروستاگلندین E و F2آلفا 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 (موش، هامستر، جوجه،.....) و بافتهای انسانی کشت می گردد و این نقیصه با کشت انبوه یاخته های تیره ای آبزیان اقتصادی کشور تکمیل می گردد و این فرآیند ضمن خودکفایی مملکت و بالابردن 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 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 بافتهای محدود دو نوع آبزی پرورشی آنها با آبزیان پرورشی ما مشابه است (بافت اپی تلیال کپور معمولی و بافت گوناد ماهی قزل آلالی 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 Ahne و Wolf

(۱۹۸۲) و Wolf و Quimby (۱۹۶۹) ارائه شده است. همچنین نیازهای اساسی برای کشت سلول‌ها از ماهی، دوزیستان و خزندگان توسط محققى 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 (۱۹۷۳) عنوان شده است. Ahne و Bachmann (۱۹۷۴) جزئیات قابل توجهی از روش‌های آماده سازی کشت سلولی استاندارد به وسیله تریپسین‌دهی بافت‌های جدا شده از ماهیان گرم آبی (کیپور) و گونه‌های سرد آبی (قزل آلاى رنگین کمان) را توصیف کرده‌اند.

کشت لکوسیت‌های ماهی توسط Etlinger و همکاران (۱۹۷۶)، Sigel و همکاران (۱۹۷۳) و Wolf و Quimby (۱۹۷۶) توصیف گردیده است.

سلولهای عصبی در انتخاب سوبستراهایشان نسبت به سایر سلولها مشکل پسندتر می‌باشند 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 (Ebdal و Jacobson، 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، تخمدان، 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 اپی‌تلیالی 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 اپی‌تلیال تکامل پیدا می‌کنند. وقتی ورقه‌ها به اندازه مناسب رسیدند کشت می‌تواند تلقیح شود. لایه‌های مشخص

شده از اپی تلیوم مهاجرت کرده معمولاً یک منطقه مشخصی دارند که گسترش پیدا کردن در آنجا انجام نمی گیرد. ضمناً سلول ها شبیه فیروبلاست ظاهر شده که نشان دهنده فعالیت میتوزی بوده و معمولاً طول عمر زیادی دارند. کشت های منتقل شده از کیسه شنای ماهیان انقباضات عضلانی ریتمی و ضربان مژه ها را برای چندین ماه نشان می دهند و بافت های قلبی زنده مانده و برای سال ها ضربان دارند. آماده سازی کشت بافت های جدا شده زمانی مناسب هستند که فقط مقدار کمی از بافت در دسترس باشد. این روش زمانی کاربرد واقعی بیشتری خواهد داشت که تیره های سلولی به طور فوری در دسترس نبوده یا وقتی که به دلایلی ویژگی های میزبانی برای همانندسازی ویروسی نامناسب باشد.

امروزه در آزمایشگاه های کشت سلول از سه نوع رده سلولی استفاده می شود:

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

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

تکه ای 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 خواهند بود، خیلی سریع به محیط کشت اولیه منتقل نموده. بسیاری از سلول های همراه بافت نظیر سلول های خونی پس از دو تا سه روز از بین رفته اما برخی از سلول ها نظیر نرون های عصبی تا ماه ها زنده مانده و پس از قرار گرفتن در شرایط مناسب تقسیم می گردند، پس از آن که تعداد آنها به چندین برابر برسد می توان آنها را پاساژ داده، که سلول های پاساژ داده شده رده سلولی اولیه (Primary Cell Line) نامیده می شوند.

رده سلولی اولیه به دلایل زیر بسیار حائز اهمیت می باشند:

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

۲. در تولید واکسن و بررسی های آزمایشگاهی از رده سلولی اولیه استفاده می گردد.

۳. از رده سلولی اولیه در زمان کوتاهی می توان 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 دسته ای 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 تثبیت 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 جهت گیری سه‌بعدی 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 بپوشاند 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 آن ها به ویروس ها بیش از حدی است که تیره های سلولی دارند. همچنین ویژگی میزبان عامل مهمی است. همانطور که توسط Mann و Wolf (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 lanfosistic و ویروس bluegill فقط در سلول هایی که شکل ظاهری

آن‌ها شبیه فیروبلاست 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 راهنمای 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، سیلک و بافت‌های قرینه 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 آزرده‌گی و همچنین جلوگیری از بیرون آمدن غذا یا مدفوع 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 1000-2000 IU/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 باکتری کش که به عنوان یک روش حمام در غلظتی معادل ۵۰۰ IU/ml پلی‌میکسین-B، ۵۰۰ میکروگرم نئومایسین (neomycin) و IU و از Zinc Bacitracin در هر میلی‌لیتر مفید است. روش درمان در آب سرد (۴-۱۰ 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.

ضد عفونی کردن موضعی نیز بایستی صورت گیرد. غوطه‌وری کامل در محلول‌های ضد عفونی کننده اغلب

عملی می باشد. مقدار ppm ۵۰۰ کلر که از محلول هیپوکلریت سدیم (hypo chloric sodium) یا کلسیم (محلول 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 اتانل ۷۰٪ یا ایزوپروپانول 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 کننده بی نظیر استفاده کرد. به هر حال الکل باعث آگلوتینه شدن سریع اجزا پوست شده و احتمالاً مؤثر خواهد بود.

Ingredient	No.of volumes
Phosphate-buifered salin (PBS)	34
Trypsine or pancreatig solution	4
Serum (fetal bovin)	toptionall
Antibiotic solution	1 topitionall

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

* محلول ذخیره برای پنی سیلین و استرپتومایسین (۱۰۰۰۰IU و ۱۰۰۰۰Mg/ml) 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 (۱۹۶۹) 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.

آنتی بیوتیک هایی که در محیط کشت استفاده می شوند مانع از رشد فلور میکروبی می گردند 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 رده پیوسته (Continuous cell culture)

بر خلاف رده 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 آداپته 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 رده پیوسته نامیده می شوند که در این دسته از سلول ها تعداد کروموزوم ها برعکس رده دیپلوئید که به شکل مجموعه-ای از کروموزوم های زوج هستند غیر طبیعی می باشند. اولین رده سلولی نوع فوق از کارسینوم سرویکس از سال ۱۹۵۲ توسط gey تهیه گردید و به رده سلولی هلا (Hela) نامیده شد و همین رده سلولی است که در اکثر آزمایشگاههای ویروس شناسی نگهداری و استفاده می گردد. از رده 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 رده های سلولی Vero و KB و Hep2 را نام برد.

کشت اولیه سلولی می تواند از طیف 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 سلولهایی 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 (Transformation) به کمک موارد شیمیایی سرطانزا و یا ویروس های تومورزا بدست آید. نمونه چنین دودمان های نامیرای دائمی، دودمان لنفوبلاست موشی LS178Y و دودمان WI-26 VA4 می باشند که به ترتیب از طریق تیمار سلول با ماده شیمیایی میتل کولانترن (methyl cholanthrene) 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 صرفنظر 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 فیروبللاست جنبی اولیه افزایش می دهند. دسته دوم ژن هایی هستند که باعث تغییرات ژنتیکی اساسی (Transformation) در سلول می شوند مانند دودمان سلولی فیروبللاست هوشی NIH - 3T₃. تغییرات ژنتیکی سرطانزایی 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 کدکننده 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 چونندگان، 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 چونندگان 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 10^{-7} انجام می گیرد، بنابراین اگرچه دودمان‌های سلولی تمایز یافته و تخصصی پستانداران به کمک پلاسمیدهای حاوی ژن‌های نامیراکننده از بسیاری از سلولهای اولیه ایجاد شده است، سهولت و موفقیت ایجاد چنین دودمان‌هایی کاملاً به نوع بافت و گونه-ای بستگی دارد که سلول‌های اولیه از آن بدست می آید. مکانیسمی که طی آن، روند فناپذیری سلولها توسط انکوژن‌های ویروسی متوقف و به روندی معکوس تبدیل می شود کاملاً شناخته نشده است. اما به نظر می رسد این روند با دخالت پروتئین P_{53} و مسیرهای Rb انجام گیرد با شروع روند پیری و فناپذیری سلولها با افزایش ممانعت -کننده های کیناز وابسته به سایکلین (P_{21} , P_{16}) (Cyclin – dependent Kinase inhibitors P_{16} , P_{21}) و با کوتاه شدن تلومرها (telomers) همراه است. اگرچه بروز اجزای سازنده آنزیم تلومرز 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 می‌تواند گمراه کننده باشد. لغت سلول اولیه یا ابتدایی (Primar Cell) می بایست به سلولی اطلاق شود که تحت هیچ مرحله کشتی 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.

دودمان‌های سلولی متغیر ژنتیکی داده شده Transformed معمولاً دائمی تصور می شوند. اما سلول فیروپلاست انسانی که با ویروس SV_{40} تیمار شده است دچار بحران پیری و فناپذیری می شود که البته شروع آن در مقایسه با سلول‌های عادی دیرتر است. همانطور که ذکر شد نامیرایی دودمان‌های سلولی می تواند به سه روش آلوده سازی با ویروس‌های تومورزا، دو رگه سازی سلولی و تغییرات ژنتیکی سرطانزا بدست آید. در حال حاضر در اکثر آزمایشگاهها از روش‌های DNA نو ترکیب استفاده می شود، اگرچه تکنیک‌های دیگر بنابه گونه و بافت مورد استفاده می تواند مناسب باشد. برای مثال، بهترین روش برای نامیراسازی سلول‌های موشی تولید کننده

آنتی بادی مونوکلونال ایجاد سلول دو رگه (Hybridoma) می باشد. لئوسیت های انسانی به بهترین شکل توسط ایجاد تغییرات ژنتیکی با ویروس (EBV) (Epstein – Barr) نامیرا میشوند و در مورد سلول های دیگر، آنتی 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 میکوپلاسمی و سه سال یکبار از لحاظ حساسیت های ویروسی باید مورد آزمایش قرار گیرند.

آزمایش های میکوپلاسمایی در رده های پیوسته سلولی

آزمایش های میکوپلاسمایی باید به طور دقیق در برنامه های کنترل کیفیت در رابطه با تمام رده های کشت شده سلولی انجام شود. میکوپلاسمها از میکرو اورگانیزم هایی می باشند که فاقد دیواره سلولی هستند، آنها از باکتری های مجزا می باشند. با حداقل اندازه ۰,۲ تا ۰,۳ میکرومتر، میکوپلاسمها کوچکترین اورگان های در حال زیست شناخته شده می باشند.

آلودگی های میکوپلاسمایی اثرات بسیار زیادی در کشت سلولی دارند. بسیاری از آنزیم ها، سیتوکینازها (cytokinaz) بسیاری از اعمال سلولی را متوقف کرده و یا آنتی ژن های سطحی سلول را تغییر می دهند. میکوپلاسمها سبب شکستن کروموزوم ها و تخلیه غذایی محیط رشد سلول ها می شوند، همچنین سبب تغییر مرفولوژی سلول ها نیز می گردند.

۱- ضد عفونی

میکوپلاسم 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 میکوپلاسم 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 میکوپلاسمایی 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 میکوپلاسمی جلوگیری می شود.

۲- تست های متداول

A: فراوانی

باید از سلامتی تمام ماهیان اطمینان حاصل شود و از نبود میکرواورگانیزم ها در کشت سلولی اطمینان حاصل نمود. تست های متداول به طور سالانه انجام می شود تا از نبودن میکوپلاسمها در رده های سلولی ذخیره، سرم ها و تریپسین اطمینان حاصل شود. آزمایش های میکوپلاسمایی در مورد سرم ها و تریپسین ها چندین بار باید انجام شوند. رده های سلولی باید در شرایط بردتی و قبل از آنکه از حالت انجماد خارج شوند انجام گردند. در ضمن در مورد استفاده از رده های سلولی که به طور تجاری تهیه شده اند نیز باید از عدم آلودگی های میکوپلاسمایی آن ها مطمئن شد.

۱- روش های آزمایشی

روش های مستقیم و غیرمستقیم بسیاری به منظور بررسی آلودگی های میکوپلاسمایی وجود دارد. روش های مستقیم نظیر روش رنگ آمیزی DNA فلوروکروم، افزایش تعداد میکوپلاسمها 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 آنها 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 رابدو ویروس های ماهیان به همان خوبی ویروس های پستانداران، پرندگان و دوزیستان استفاده کرد. گرچه اختلافات زیادی در سلول های ماهیان وجود دارد

(Mann و Wolf، ۱۹۸۰) ولی هفت نوع غالب آن که در کتب و مقالات معرفی شده اند برای بسیاری از کارهای ویروس شناسی ماهی کفایت می کنند.

(کشت بعضی از هرپس ویروس ها استثناء می باشد).

این هفت نوع شامل:

RTG-2 و BB, BF-2, CAR, CHSE-214, EPC, FHM می باشد (جدول ۲). جزئیات دقیق ویژگی های تیره های سلولی گزارش شده، در متن The American Type Culture Collection Catalogue of Strain ارائه شده است. تیره های سلولی دائمی آنهایی هستند که ۷۰ بار یا بیشتر پاساژ داده می شوند و از نظر احتیاجات مورد نظر Federoff (۱۹۷۵) که به طور اضافی استاندارد را برای کشت بافتی فراهم کرد مناسب می باشند. تیره های سلولی RTG-2 که Wolf و Quimby 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 کشت های استاندارد لوله ای خیلی متغیر می باشد، از ۱/۵ روز تا بیشتر از ۶۷ روز (جدول ۴) در درجه حرارت انکوباسیون ایده آل ۲۰ درجه سانتی گراد زمان مضاعف شدن تعداد سلول های RTG-2 دو روز می باشد (جدول ۵). زمان لازم برای مضاعف شدن تعداد در درجه حرارت بالاتر یا کمتر از حد ایده آل افزایش پیدا می کند. گرچه مطالعات مقایسه ایی در دیگر تیره های سلولی ماهیان انجام نشده اما ارتباط عمومی آنها احتمالاً به دست آمده است. تیره های سلولی نظیر BB, BF-2, EPC و FHM که درجه حرارت ایده آل آنها بالاتر است زمان مضاعف شدن تعداد در آنها کوتاهتر می باشد. تراکم بذردهی توصیه شده برای تیره های سلولی ماهیان مهم در جدول ۶ آمده است.

دستورالعمل هایی برای کشت مجدد سلول های ماهی و تکثیر تیره های سلولی ماهیان به وسیله Wolf و Quimby ۱۹۶۷ توصیف شده است.

مراقبت های لازم برای تیره های سلولی ماهیان

به طور کلی کشت های سلولی که در ویروس شناسی ماهیان به کار می روند بایستی به اندازه کافی تازه باشند به طوریکه سلول های 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 تا ۹۵٪ رسیده باشد. کشت‌های متراکم یا کشت‌های پیر که تقسیم میتوزی در آن‌ها مشاهده 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.

Quimby و Wolf (۱۹۷۸ و ۱۹۷۳) 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

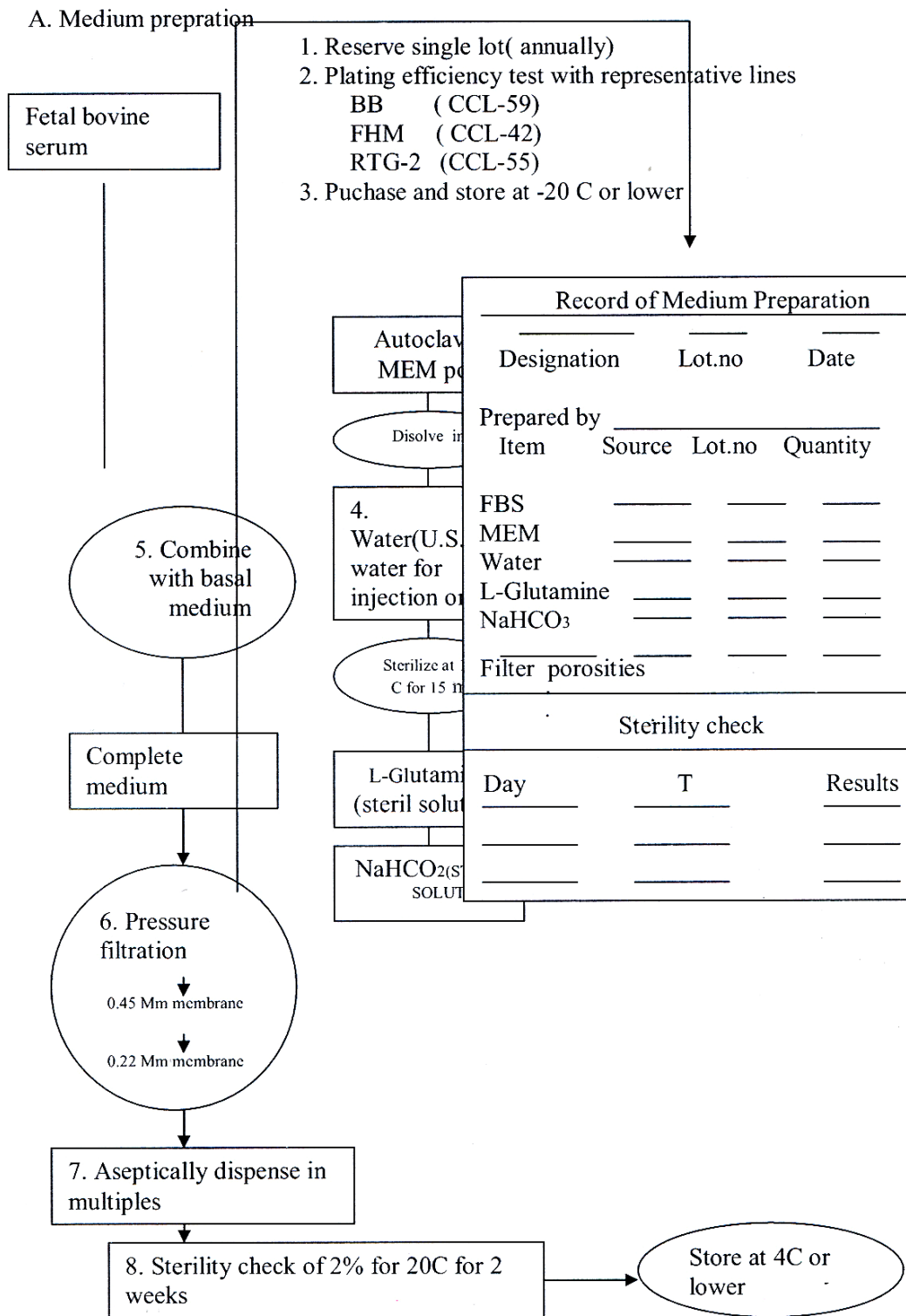
A- آماده سازی محیط:

۱. ذخیره سازی نمونه واحد (سالانه)
۲. آزمایش کارایی (قدرت) پلیت‌ها با استفاده از تیره‌های سلولی نماینده
۳. خریداری و نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و اضافه کردن L-Glutamine (محلول استریل) و بی‌کربنات 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 محیطها 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، پیست کردن شدید برای خروج سلولها، 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
- سری 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 مرفولوژی، تمیز بودن و کیفیت سلولها
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. تثبیت تمام اطلاعات مربوطه
۱۰. کنترل سالیانه کشت برای آلودگی به مایکوپلازما
۱۱. کشت ذخیره مناسب به طور سالانه توسعه داده می شوند و سایر کشت های قدیمی حذف می گردد.



نمودار ۴. آماده سازی محیط (Wolf,K.,1988)

Temperaturel °cl					
Initlal 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 ml ۲۷۵۰۰۰ سلول. (Wolf,K.,1988)

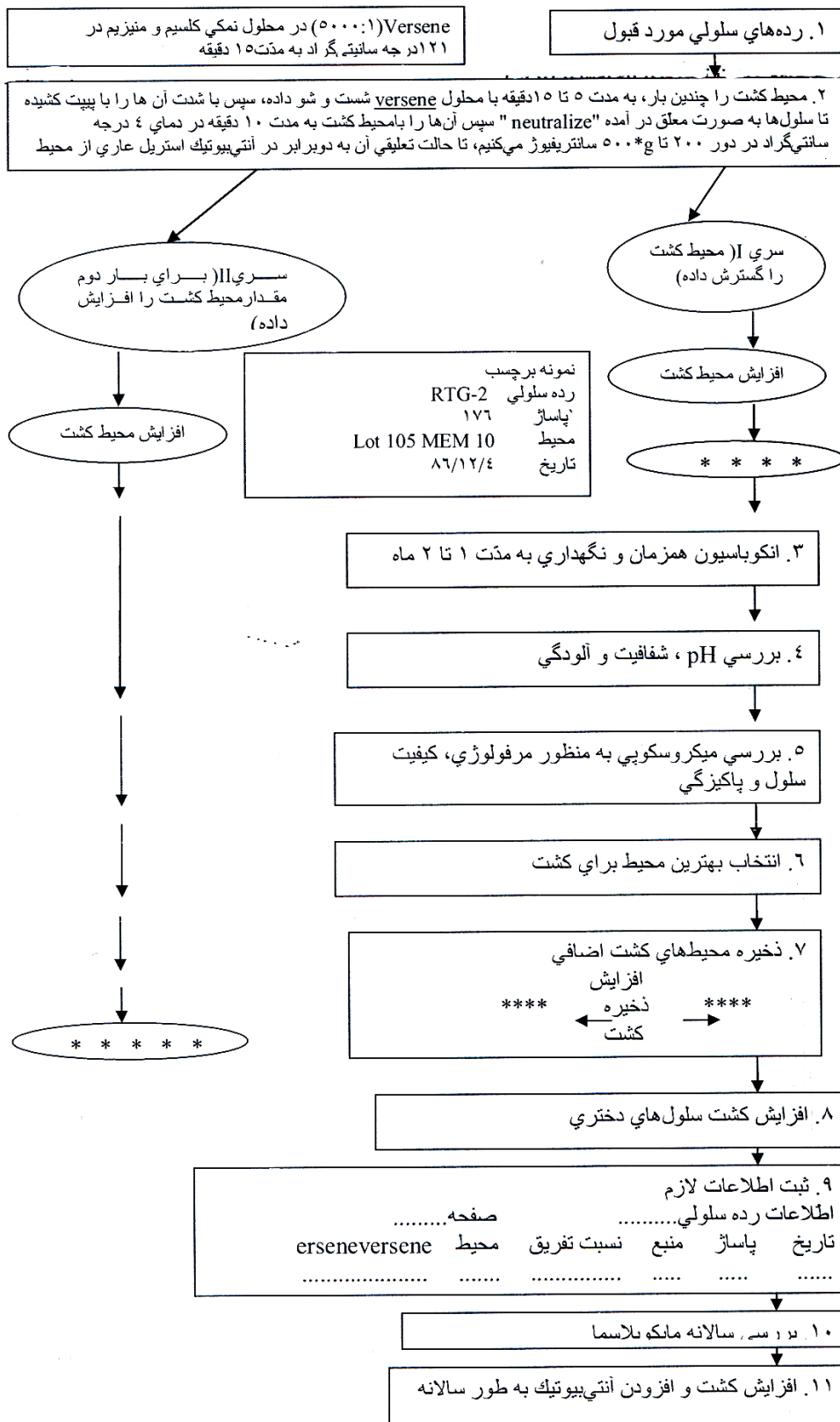
Temperaturel °cl					
Initlal seeding of cells (no/ml)	25	20	15	10	5
100.000	2.4	2.0	3.5	7.0	10.0
50.000	2.5	2.0	3.5	5.5	14.5
25.000	2.5	2.0	4.0	8.0	16.0
12.500	2.7	2.5	4.1	8.8	13.5
Average	2.6	2.0	3.8	7.6	13.8

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 contluency (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.

BB سلول‌هایی که بیشترین حساسیت را به عوامل تعریف نشده به ویژه در سرم گاوی از خود نشان می‌دهند. 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 تیره های سلولی ماهی و دیگر حیوانات.

سری 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 میکوپلازما

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 ۴-۶ 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 زمانیکه 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 ۱۰۰۰ μgr/ml یا پنی سیلین (۸۰۰ IU/ml) و دی هیدرواسترپتومایسین ۸۰۰ μgr/ml از ترکیبات ضدقارچ Mycostatin یا Fungizone نیز ممکن است به محیط انتقال دهنده نمونه در غلظت نهایی ۴۰۰ IU/ml اضافه شود. همچنین ممکن است سرم یا آلبومن ۱۰-۵٪ 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.

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

۵- نتیجه گیری

محیط های 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 سلول های پستانداران، پرندگان، خزندگان، دوزیستان و ماهیان استخوانی (Teleosts) نزدیک می کند (Rao و همکاران، ۱۹۹۷).

برای استفاده سلول های ماهیان آنادروم (anadrom) آب شیرین، محیط EMEM اسمولاریته مناسبی داشته و نیازی به اضافه کردن ماده ای ندارد (نقطه انجماد آن در حدود ۰/۶- درجه سانتی گراد است). از آنجائیکه نقطه انجماد خون در ماهیان استخوانی دریایی در حدود ۰/۷۵- درجه سانتی گراد می باشد محیط کشت برای سلول های ماهیان استخوانی دریایی بایستی به اضافه کردن ۱۰۰ ml / ۰/۴۵ gr / ۴۵. نمک طعام (NaCl) متعادل گردد. یکی از راه های ساده از طریق اضافه کردن ۲۰ / ۶ ml / L از محلول استوک (ذخیره) استریل ۳/۴ مولار (به نسبت وزنی به حجم ۲۰٪) از نمک طعام می باشد. معمولاً EMEM یا به شکل مایع خریداری می شود 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 کشت های بافتی حل شود. آب با خلوص بالا به وسیله مقطر کردن یا غیرمعدنی کردن یا هر دو روش تهیه می شود. آب USP تزریقات (که در داروخانه ها و یا مراکز تهیه کننده مواد بیمارستانی موجود است) رضایت بخش بوده و به طور کلی مقرون به صرفه می باشد (Pumper, 1973).

در کشت سلولی ماهیان رشد سلول ها خیلی کندتر از آنچه که انتظار می رود می باشد ولی اضافه کردن ۵٪ سرم و یا ۷-۵٪ تخم مرغ کامل فیلتر شده باعث تحریک رشد می شود. اصولاً سنجش برای رشد سلولی بایستی بر روی یک قاعده موقتی صورت گیرد. اگر رشد آهسته ادامه پیدا کند، بایستی دلایل دیگر جستجو شوند. استفاده از آنتی بیوتیک ها در محیط کشتی که تحت تأثیر خطر آلودگی قرار دارد استفاده می شود. برای اهداف معمولی اضافه کردن ۱۰۰ IU سدیم پنی سیلین-G، ۱۰۰ میکرو گرم ی هیدرواترپتومایسین (di hydro ether peto mysin) ۲۵ IU نیستاتین (niacin) (۲۵ IU) هر میلی لیتر از محیط، احتمالاً بیشترین اثر را در جلوگیری از آلودگی ثانویه می گذارد. پنی سیلین (peni cellin) استرپتومایسین (strepto mysin) می توان با جنتامایسین (jenta mysin) آنتی بیوتیک کشنده

باکتری (Bactericidal) می‌باشد تعویض نمود (به مقدار ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر). جتتامایسین را می‌توان اتوکلاو نمود. این دارو کشنده باکتری‌ها بوده و اثرات مؤثری علیه بسیاری از مایکوپلازماها (myco plasma) دارد (Nijimasu، ۱۹۸۷).

همانطور که در شکل پایین مشاهده می‌شود، سلول در محیط کشت تحت فاکتورهایی به شرح زیر قرار می‌گیرد: فعالیت‌های درونی سلولی نظیر؛ نسخه‌برداری DNA، سنتز پروتئین، متابولیسم انرژی، متابولیسم دارو، و سیکل سلولی، تمایز و آپوپتوز، تغییرات درون سلولی نظیر؛ RNAهای گیرنده هورمونی، متابولیت‌ها و انتقال کلسیم، عوامل محیطی نظیر؛ عوامل عفونی، فعالیت‌های دارویی، اتصال عوامل سیتوتوکسیک، موتاژن‌ها و کارسینوژن‌ها به گیرنده‌های سلولی، اثر متقابل سلول‌ها نظیر؛ مرفوژنز، کنترل‌های پاراکرائینی، انرژی جنبشی سلول‌های در حال تکثیر، همبستگی سلول‌ها، تهاجم سلولی، عوامل ژنتیکی نظیر؛ آنالیز ژنی، ترجمه و انتقال ژنی، نسخه‌برداری، آلودگی، پیری، مرگ و سلول‌های تولید شده نظیر؛ ترشح- متابولیتی، برداشت سلول‌ها به منظور پاساژ، اثر تراکمی سلول‌های تولید شده بر روی یکدیگر، همانطور که ملاحظه می‌گردد تمام عوامل فوق که از عوامل طبیعی می‌باشند سلول‌ها را در محیط کشت تحت تأثیر قرار می‌دهند. اما قابل توجه است که سلول‌ها در محیط کشت تحت استرس‌هایی قرار گرفته که این عوامل در محیط‌های طبیعی و موجود زنده اثر داشته، ولی حضور آن‌ها در محیط کشت سبب مرگ سلول‌ها در زمان طولانی می‌گردد.

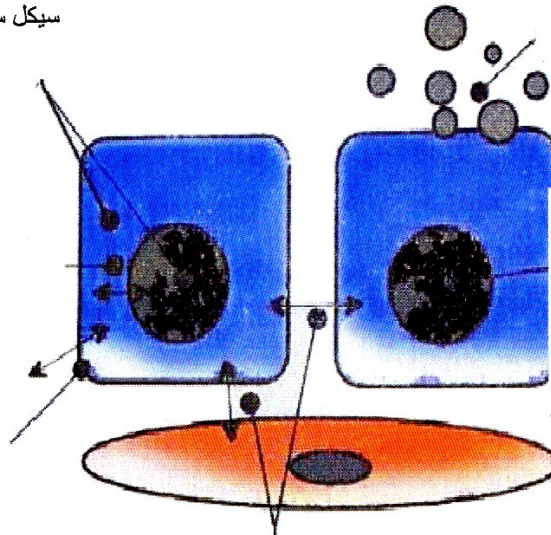
سلول های تولید شده:
 ترشح متابولیتی،
 برداشت سلول ها به
 منظور پاساژ، اثر
 سلول های تولید شده
 بر روی یکدیگر

فعالیت های درون سلولی:
 نسخه برداری DNA، سنتز پروتئین،
 متابولیسم انرژی، متابولیسم دارو،
 سیکل سلولی، تمایز و آپوپتوز

تغییرات درون سلولی:
 RNA های گیرنده هورمونی،
 متابولیت ها و انتقال کلسیم

عوامل ژنتیکی:
 آنالیز ژنی، ترجمه و
 انتقال ژنی،
 نسخه برداری،
 آلودگی، پیری، مرگ

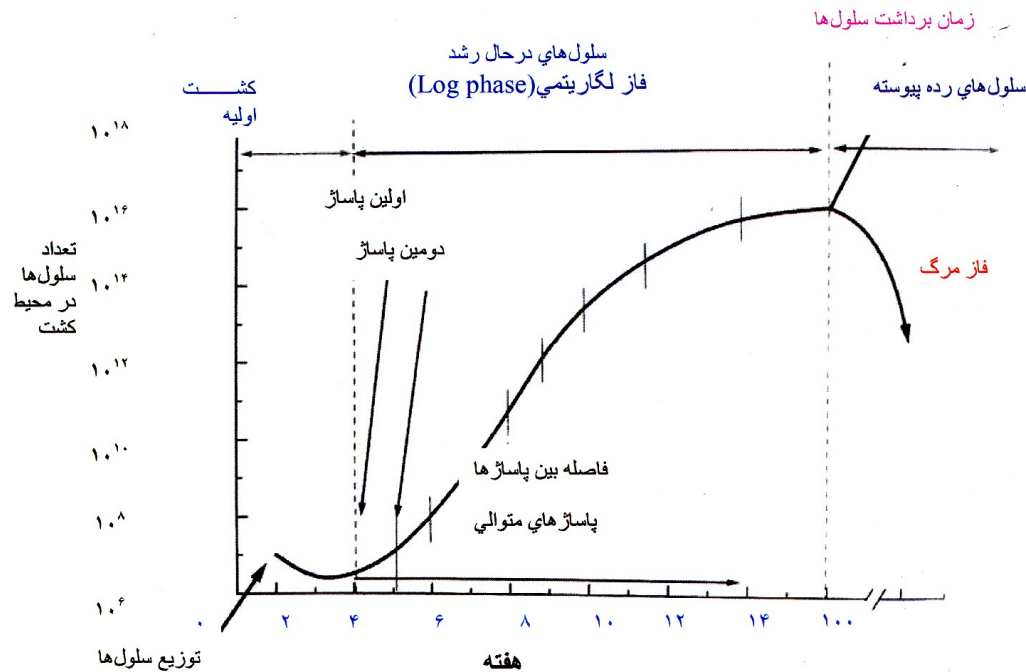
عوامل محیطی:
 عوامل عفونی، فعالیت های دارویی،
 اتصال عوامل سینتوتوکسیت،
 موتاژن ها و کارسینوژن ها به
 گیرنده های سلولی



اثر متقابل سلول ها:

مرفوژنز، کنترل های پاراکراینی، انرژی جنبشی
 سلول های در حال تکثیر، همبستگی سلول ها،
 تهاجم سلولی

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



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

همانطور که از منحنی فوق استنباط می‌گردد تمام یاخته‌های جانوری پس از آن که به محیط کشت منتقل می‌شوند یک دوره فاز آهسته (Lag phase) دارند که در سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش این دوره ۱۰ روز به طول انجامید، که در مقایسه با منحنی فوق قابل قبول می‌باشد. نکته قابل توجه زمانی است که سلول‌ها وارد فاز لگاریتمی (Log phase) می‌شوند، در این فاز همانگونه که پیش از این ذکر شد و در منحنی فوق نیز مشاهده می‌گردد سلول‌ها تکثیر یافته و تعداد آن‌ها روند افزایش را طی کرده است، روند فوق در رابطه با سلول‌های 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 زمان‌های مختلف متفاوت می‌باشد و همانطور که از نمودار فوق استنباط می‌شود؛ تا روز چهارم رشدی انجام نشده بنابراین سرعت رشد برابر با صفر در نظر گرفته شده است. در روزهای ششم و هفتم تعداد سلول‌ها 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 (۷۵۰۰۰ 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 هیپوفیزی 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 نواسانی از خود نشان داده است.

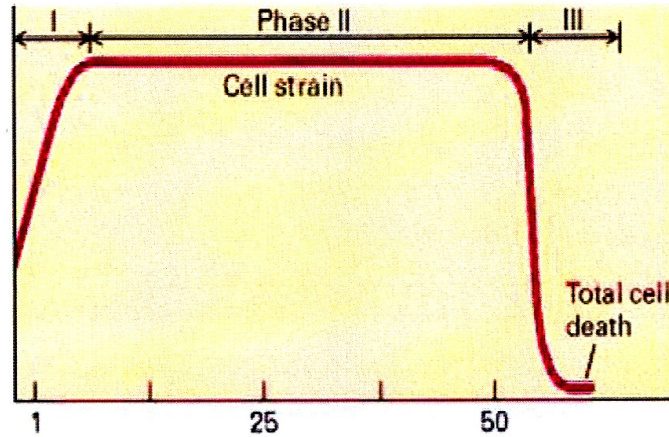
در مقایسه منحنی شماره ۱، منحنی تغییرات ایجاد شده در کشت سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش، که از موجودات خونسرد تلقی می‌شود با کشت سلولی انسان و موش که در مؤسسات پژوهشی،

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

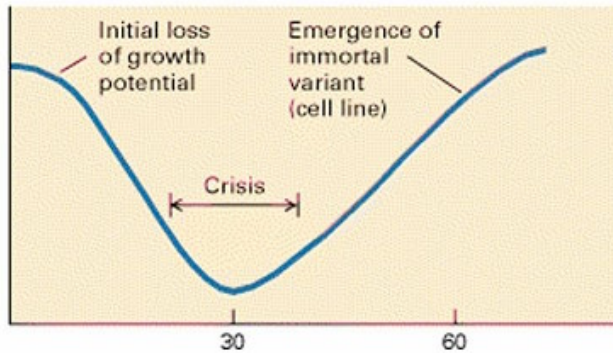
(German Collection of microorganisms and Cell Cultures) DSMZ انجام گردیده است چنین استنباط می‌گردد که زمان شروع فاز لگاریتمی در سلول‌های انسانی بسیار کوتاه است در حالی که در رابطه با کشت سلول‌های موش فاز آهسته بسیار طولانی بوده به طوری که در این فاز روند کاهشی تعداد سلول‌ها بسیار زیاد است، در حالی که 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.

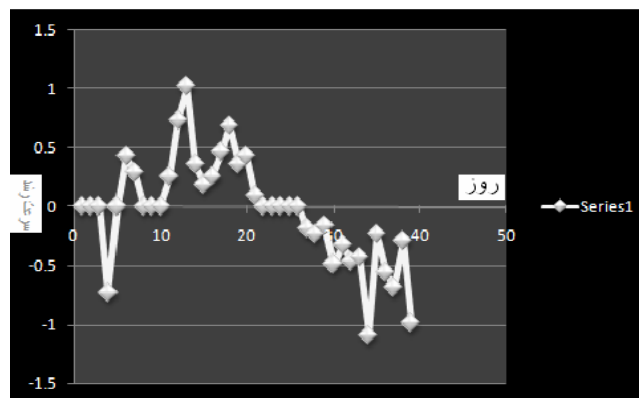
فاز مرگ سلول‌های انسانی بسیار کوتاه و با شیب بالا می‌باشد در حالی که سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش به صورت نوسانی و در زمان طولانی، حدود ۱۲ روز این دوره را طی نموده‌اند.



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 آن ها 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 آن ها 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 باتوجه به تجربیات بدست آمده و نوع تحقیق و شرایط فیزیولوژیک ماهی موارد ذیل پیشنهاد می گردد:

- رشد سلول‌های هیپوفیزی ماهی چالباش در محیط کشت بسیار کند و آهسته صورت می‌پذیرد و در ضمن 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 ایزوله 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 کلون کرده و در بیوراکتور بطورانبوه 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 آبیان جهت مطالعه ویروس‌شناسی ماهیان پیشنهاد می‌گردد

برای تشخیص ویروس گربه ماهی کانالی (CCV) و ویروس نکروز پانکراس (IPNV) از سلول‌های فیروبلاست بافت انتهایی تنه دمی گربه ماهی *Brown bullhead* از خانواده *Ichthaluridae* جنس *Ameiurus* گونه *nebilosus*، برای تشخیص ویروس لیمفوسیتیس (LV)، ویروس مارماهی (EVA) و ویروس نکروز پانکراس (IPNV) از سلول‌های فیروبلاست 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 فیروبلاست دم ماهی طلائی (*Goldfish*).

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

برای تشخیص رابدو ویروس اردک ماهیان (PFR), ویروس وایرمی 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 وایرمی بهاره کپور ماهیان (SVCV) از سلولهای اپیتلیال 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 آلائی رنگین کمان (OMV) و رابدو ویروس اردک ماهی ها (PFR) و ویروس وایرمی بهاره کپور ماهیان (VHSV) از سلولهای اپیتلیال 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 نهاوندی، 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 انگلهای 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
 - ۵- روزبه فلاحی، بررسی بیماری IHV در برخی مزارع پرورش قزل آلائی رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) کشور، سال ۱۳۸۰، دوازدهمین کنگره دامپزشکی ایران
 - ۶- روزبه فلاحی، استفاده از کشت سلول برای جداسازی ویروسهای ماهیان، سال: ۱۳۸۰، دوازدهمین کنگره دامپزشکی ایران
 - ۷- روزبه فلاحی، ۱۳۸۴. تهیه کشت سلولی پرایمیری از اندام های مختلف داخلی و خارجی ماهی قرمز (*Carassius auratus*) به روش *Planting*، سومین کنگره ویروس شناسی ایران
 - ۸- روزبه فلاحی، ۱۳۸۴. تهیه کشت سلولی پرایمیری 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.; Vivares, 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 my kiss* 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 . Artificial 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 . Artificial 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: Serodiagnitics 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 relation 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 oxrinchus*) in the hudson river . Estuaries journal , Vol 19 No 4 , p 769-777
- 30- Nikoloski, G. 1969. Detaled 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 37⁰ 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.