

تولید و ارزیابی رده سلولی اپیتلیالی شکل از بافت باله ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

کاوه نوروزی^۱، محمدرضا کلباسی^{۲*}، پروانه فرزانه^{۳*}، سیدابوالحسن شاهزاده فاضلی^۴، مریم فرقدان^۵،
احمد نسیمیان^۶، مهرناز ایزدپناه^۷، سپیده آشوری موثق^۸، شیوا محمدی^۹، زهرا مرادمند^{۱۰}، منصوره فرهنگ‌نیا^{۱۱}

۱- کارشناس ارشد گروه پرورش آبزیان، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- استادیار بانک سلول های جانوری و انسانی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران

۴- استادیار بانک سلول های جانوری و انسانی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران

۵- کارشناس بانک سلول های جانوری و انسانی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران

۶- کارشناس ارشد بانک سلول های جانوری و انسانی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران

۷- کارشناس ارشد بانک سلول های جانوری و انسانی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران

۸- استادیار بانک سلول های جانوری و انسانی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران

۹- کارشناس ارشد بانک سلول های جانوری و انسانی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران

۱۰- کارشناس ارشد بانک سلول های جانوری و انسانی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران

۱۱- کارشناس ارشد بانک سلول های جانوری و انسانی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران

چکیده

امروزه کشت سلول ابزار بسیار مفیدی برای پاسخ به بسیاری از سؤالات در زمینه‌ی زیست‌شناسی محسوب می‌شود و کاربرد رده‌های سلولی روز به روز در حال افزایش است. در این مطالعه تولید کشت اولیه و Cell line ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) مورد بررسی قرار گرفت و دو روش کشت اولیه Explant و روش جداسازی آنزیمی به کمک آنزیم تریپسین به منظور تولید کشت اولیه استفاده شد. مهاجرت سلول از باله‌های سینه‌ای، پشتی، دمی و مخرجی در روش Explant با یکدیگر مقایسه شد. تاثیر مدت زمان‌های مختلف تماس با تریپسین بر روی سلول‌ها با یکدیگر مقایسه شد. محیط کشت Leibovitz's L-15 به همراه ۲۰٪ FBS و ۱٪ Pen-Strep استفاده شد. به منظور ارزیابی رده تولید شده، از سلول‌ها کاربوتیپ تهیه شد و در نهایت این سلول‌ها با کمک DMSO فریز شدند و به دمای -196°C منتقل شدند. محاسبات کارایی کشت بافت نشان داد که باله سینه‌ای با میانگین ۷۱/۳۱٪ بهترین باله به منظور تولید رده سلولی از این ماهی است. در مقایسه کلی بین روش‌های کشت اولیه، در روش جداسازی آنزیمی با آنزیم تریپسین نسبت به روش Explant، سلول‌های زنده بیش‌تری حاصل شد. عدد کروموزومی سلول‌ها $2n=80$ بود و درصد زنده‌مانی بعد از گذشت یک ماه در اذت مایع ۸۴/۴٪ بود. با توجه به اینکه این سلول‌ها تا ۲۲ نوبت پاساژ و انجماد و ذوب متوالی، از قابلیت رشد خوبی برخوردار بوده‌اند، از آن‌ها می‌توان در مطالعات مختلف استفاده کرد. این سلول‌ها به عنوان اولین رده سلولی (Cell Strain) از آبزیان تولید شده در کشور در بانک سلول‌های جانوری مرکز ذخائر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) با کدهای CS2-1 و CS2-2 و شماره دستیابی IBRC C10190-3 نگهداری می‌شود.

واژگان کلیدی: ماهی آزاد دریای خزر، کشت اولیه سلول، رده سلولی اپیتلیالی

مقدمه

در اکثر پژوهش‌ها، کشت‌های سلولی این امکان را فراهم می‌آورند تا فعالیت‌های سلولی در محیط کنترل شده یا محیط طراحی شده، مورد بررسی قرار بگیرند. بسیاری از رفتارهای سلول مثل حرکت سلولی و بسیاری از دیدگاه‌های آزمایشی مثل مدل‌سازی‌های سلولی به صورت انحصاری در کشت سلولی محقق می‌شوند. کشت سلول ابزار بسیار مفیدی برای پاسخ به بسیاری از سوال‌ها در زمینه‌های زیست‌شناسی و علوم پزشکی محسوب می‌شود. از نظر رده‌بندی جانوری، ماهی‌ها اولین و بزرگترین گروه مهره‌داران (۴۸٪) را تشکیل می‌دهند (Lakra et al., 2011). ویژگی‌های فیزیولوژیکی و اجزای تشکیل دهنده پلاسمای خون ماهیان استخوانی شبیه به موجودات خشکی‌زی است. این مسأله نشان دهنده اهمیت زیاد این منبع برای توسعه مدل‌های سلولی و بافتی مهره‌داران در علوم زیستی است. کشت سلولی آبزیان تفاوت‌های کاربردی نسبت به جانوران خشکی‌زی مانند برخورداری از گستره دمایی وسیع در زمان انکوباسیون سلولی و قابلیت نگهداری طولانی مدت به دلیل پایین بودن نرخ متابولیکی سلول‌ها، دارد. سلول‌های ماهی در مقایسه با سلول‌های پستانداران وابستگی شدید به pH ندارند به طوری که سلول‌های ماهی قزل‌آلا به خوبی در محدوده ۷/۲ الی ۷/۸ رشد می‌کنند (Wolf and Quimby, 1969).

بیش‌تر رده‌های تولید شده از ماهیان از بافت‌های طبیعی زنده به دست آمده‌اند و به صورت خود به خودی ترانسفورم شده‌اند (Butler and Nowak, 2004)، ولی گزارش‌هایی از نامیرا کردن رده‌های سلولی توسط موتاژن، ویروس و ترانسفکت کردن سلول نیز وجود دارد (Freshney, 2005).

کاربرد رده‌های سلولی ماهی بسیار زیاد، متنوع و روز افزون است، اما می‌توان به صورت خلاصه آن‌ها را در شش گروه اصلی مطالعات ویروس‌شناسی، زیست‌شناسی، ژنتیک مولکولی، زیست‌شناسی تکوینی، جایگزینی رده سلولی در برخی مطالعات به جای موجود کامل و مطالعات سم‌شناسی طبقه‌بندی کرد. موارد بیان شده می‌توانند در آینده صنعت آبی‌پروری نقش کاربردی داشته باشند یا در برخی موارد باعث تولید محصولات در راستای این صنعت شوند که از این موارد می‌توان تولید ویروس به منظور تهیه واکسن را نام برد (Leong et al., 1997).

در رده‌های سلولی تولید شده از ماهیان، بیش‌ترین رده‌های سلولی بعد از گناد، از باله تولید شده‌اند که علت آن را می‌توان قدرت بالای ترمیم و بازسازی این بافت دانست (Fryer and Lannan, 1994). بیش‌ترین مطالعات مربوط به تولید رده‌های سلولی مربوط به ماهیانی است که در صنعت آبی‌پروری از اهمیت اقتصادی برخوردار هستند که از جمله آن‌ها می‌توان دو خانواده کپورماهیان و آزادماهیان را نام برد (Fryer and Lannan, 1994). Wolf و Quimby برای اولین بار در سال ۱۹۶۲ با کشت سلول‌های گناد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موفق به تولید رده سلولی به نام RTG-2 شدند. کشت اولیه این رده سلولی به روش جداسازی آنزیمی بافت توسط آنزیم تریپسین انجام شد (Wolf and Quimby, 1962).

در سال ۱۹۶۵ Fryer و همکاران در آزمایشگاه دانشگاه اورگن مطالعات دقیقی درباره نیازهای سلول‌های جنینی ماهی آزاد اقیانوس آرام و هیپاتومی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام داد که منجر به تولید اولین رده سلولی از آزاد ماهیان جنس *Salmo* شد.

در ایران تاکنون تولید پایدار و نگهداری رده سلولی از ماهیان گزارش نشده است و در این مطالعه با توجه به اهمیت حفظ ذخائر ژنتیکی آبزیان ایران و نیز لزوم تهیه کشت‌های سلولی جانوران بومی برای مطالعات کاربردی، امکان تولید کشت اولیه سلولی از گونه ارزشمند و در معرض خطر انقراض ماهی آزاد دریای خزر مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

به محیط کشت مورد استفاده در این مطالعه Leibovitz L-15 (با شماره مرجع ۰۲۱-۴۱۳۰۰)، آنزیم تریپسین-EDTA X1 که به منظور جداسازی آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت، آنتی‌بیوتیک Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep) مخصوص کشت سلول و سرم جنین گوساله (FBS^۱؛ با شماره کاتالوگ محصول ۱۰۲۷۰-۱۶۰) اضافه شد (همه مواد از شرکت Invitrogen خریداری شدند). سرم قبل از استفاده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶°C حرارت داده می‌شد تا سیستم کمپلمان آن غیر فعال شود. ظروف کشت مورد استفاده در این بررسی شامل ظرف ۶ حفره مخصوص کشت سلول (ساخت شرکت TPP آلمان) و فلاسک کشت با اندازه سطح

1- Fetal Bovine Serum

$10 \mu\text{g/mL}$ با غلظت کلسمید (ساخت شرکت Jet Biofil) بود. محلول کلسمید با غلظت $10 \mu\text{g/mL}$ (شرکت Gibco با شماره کاتالوگ ۰۱۲-۱۵۲۱۲) برای توقف تقسیم در مرحله متافاز مورد استفاده قرار گرفت. از عصاره گل میخک برای بیهوش کردن ماهی و از جنتامایسین تزریقی و نیستاتین خوراکی برای شستشوی بافت و حذف میکروارگانیسم‌ها استفاده شد. تمامی مراحل کشت اولیه بعد از شستشوی اولیه بافت و تمامی مراحل پاساژ سلول‌ها در زیر هود بیولوژیک کلاس ۲ (ساخت شرکت ژال تجهیز) انجام گرفت.

ماهی

۳۰ عدد ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) مورد نیاز این مطالعه از مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی واقع در تنکابن تهیه شد. این ماهیان به طور میانگین 1000 ± 200 میلی‌گرم وزن داشتند. ماهی‌ها بعد از انتقال به مرکز ملی ذخایر ژنتیک و زیستی ایران به آکواریومی که از قبل آماده شده بود منتقل و در دمای حدود ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

روش‌های کشت اولیه

در این بررسی از دو روش کشت اولیه شامل کاشت بافت^۱ و استخراج سلول به کمک آنزیم^۲ تریپسین استفاده شد. در هر دو روش ابتدا طبق پروتکل زیر بافت باله جداسازی و شستشو داده شد.

جداسازی بافت و شستشو

ابتدا ماهیان توسط عصاره گل میخک بیهوش و با زدن ضربه به جمجمه نخاعی شدند. سپس باله‌های سینه‌ای، مخرجی، دمی و پشتی توسط قیچی استریل جدا و بطور جداگانه به پتری‌دیش حاوی آب مقطر استریل منتقل شدند. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند تا مخاط سطحی روی باله‌ها تا مقدار ممکن حذف شود. به منظور آماده‌سازی محلول شستشو به ازای هر

1- Explant

2- Enzymatic disaggregation

۱۰۰ میلی‌لیتر نمک بافر فسفات (PBS)^۱، ۱۰۰ هزار واحد پنی‌سیلین تزریقی ۶,۳,۳، ۱۰۰۰ میکرولیتر جنتامایسین تزریقی و ۱۰۰۰ میکروگرم پودر نیستاتین خوراکی با هم مخلوط شده، به صورت سوسپانسیون درآمد. سپس هر باله به یک لوله آزمایش ته مخروطی درب پیچ‌دار ۵۰ mL که حاوی ۳۰ mL محلول نمکی فسفات و آنتی‌بیوتیک بود، منتقل شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر با دور متوسط (۹۰ rpm) قرار داده شد. سپس، هر لوله آزمایش بعد از ضد عفونی کردن سطح خارجی به کمک الکل ۷۰٪ به زیر هود منتقل شد. محلول شستشو که حاوی مقداری اضافات بافتی و مخاط سطحی بود تخلیه و با محلول شستشوی تازه جایگزین شد و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت (Wolf and Quimby, 1969). با توجه به بالا بودن میزان موکوس موجود بر روی باله‌ها، شستشو شش بار تکرار شد. در مرحله آخر به منظور جلوگیری از ورود آنتی‌بیوتیک شستشو به محیط کشت، از محلول نمکی فسفات بدون آنتی‌بیوتیک استفاده شد. بعد از این مرحله بافت‌ها به یکی از دو روش زیر تیمار شدند:

روش کاشت بافت

بعد از اتمام مراحل شستشو، باله‌ها در زیر هود از لوله‌های آزمایش ته مخروطی به پتری‌دیش‌های حاوی سه میلی‌لیتر محیط L-15 انتقال داده شدند. سپس توسط تیغ جراحی استریل هر باله به قطعات ریز (حدود ۲-۱ mm²) تقسیم شد. تعداد ۸-۱۲ قطعه از هر باله به یک حفره از ظرف کشت ۶ حفره‌ای منتقل شد و بر روی آن‌ها ۱ میلی‌لیتر محیط کشت L-15 که حاوی ۲۰٪ FBS و ۰/۵٪ Pen-Strep (محیط کشت اولیه) بود، ریخته شد و به انکوباتور ۲۰°C منتقل شد. دو روز اول بعد از کاشت بافت، روزانه محیط کشت به صورت کامل تعویض شد تا موکوس موجود، که منبع اصلی آلودگی در کشت سلولی ماهی است، خارج شود. ظرف کشت بعد از گذشت یک هفته در زیر میکروسکوپ بررسی شد و درصد کارآیی کاشت بافت برای هر باله از رابطه ۱ محاسبه شد (Moritz and Labbe, 2008).

1- Phosphate-Buffered Saline

$$\text{رابطه ۱:} \quad \text{تعداد قطعات بافتی که سلول از آن‌ها مهاجرت کرده} \\ \text{درصد کارایی کاشت بافت} = \frac{\text{تعداد قطعات کل کاشته شده}}{\text{تعداد قطعات بافتی که سلول از آن‌ها مهاجرت کرده}} \times 100$$

روش جداسازی آنزیمی

پس از طی کردن مراحل شستشو، هر باله توسط قیچی به تکه‌های کوچک ($1\text{cm}^2 - 0.5$) تقسیم شد و به درون بطری دردار استریل به همراه مگنت منتقل شد و بر روی آن‌ها ۱۵mL آنزیم تریپسین X1 ریخته شد. بطری بعد از محکم شدن در از زیر هود خارج و بر روی استیرر با دور آرام قرار داده شد. شدت چرخش مگنت درون بطری به نحوی تنظیم شد تا کف ایجاد نشود (Wolf and Quimby, 1976).

بعد از سپری شدن ۱۵ دقیقه بطری از روی استیرر برداشته شد و به زیر هود منتقل شد. محلول درون بطری که حاوی سلول‌های جدا شده بود توسط پیپت خارج و درون یک لوله آزمایش ته مخروطی درب پیچ‌دار استریل ۵۰mL ریخته شد. به منظور خنثی‌سازی تریپسین، هم حجم آن محیط کشت حاوی FBS ۲۰٪ به آن اضافه شد و چندین بار عملیات پیپتاژ انجام شد تا محلول یکنواخت شود. FBS موجود در محیط کشت اولیه باعث غیرفعال شدن آنزیم تریپسین شد. پس از آن لوله آزمایش با دور ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سوپرناتانت آن حذف شد. به پلت سلولی به دست آمده یک میلی‌لیتر محیط کشت اولیه اضافه شد و به وسیله پیپتاژ، سوسپانسیون سلولی ایجاد شد. در نهایت سلول‌ها با تراکم 5×10^5 در ظروف کشت ۶ حفره کاشته شدند. در کل استخراج سلول از بافت سه بار تکرار شد و در انتها درصد بقا سلول‌ها با استفاده از محلول تریپان بلو ۰/۴٪ محاسبه شد. به منظور به حداقل رساندن خطا عملیات شمارش ۳ بار تکرار شد و درصد بقا از رابطه ۲ به دست آمد (Freshney, 2005).

$$\text{رابطه ۲:} \quad \text{تعداد سلول‌های زنده} \\ \text{درصد بقا} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد سلول‌های شمارش شده}} \times 100$$

نگهداری و پاساژ سلول‌ها

ظرف کشت اولیه روزانه در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت و رشد سلول‌ها مشاهده شد. بعد از گذشت ۷ تا ۱۰ روز (زمانی که سلول‌ها حدود ۷۰٪ کف را پوشانده بودند) اقدام به پاساژ آن‌ها شد. ابتدا ظرف کشت به زیر هود منتقل شد و محیط کشت درون آن تخلیه شد. در کشت Explant تکه‌های باله به کمک یک پنس استریل از ظرف کشت خارج شدند. به منظور شستشو و جدا کردن سلول‌های مرده و FBS موجود درون ظرف، که عامل محدود کردن فعالیت آنزیم تریپسین است، ۱ mL از PBS درون ظرف ریخته شد. ظرف به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان داده شد. بعد از خارج کردن PBS، ۵۰۰ μL آنزیم تریپسین X1 بر روی سلول‌ها ریخته شد. سلول‌ها به مدت ۳ دقیقه در معرض تماس با آنزیم قرار گرفتند. بعد از این مدت ۱ mL محیط کشت حاوی FBS ۲۰٪ بر روی سلول‌ها ریخته شد تا تریپسین خنثی شود و چندین بار عملیات پیپتاژ انجام شد تا سلول‌ها به طور کامل از کف ظرف جدا شوند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰ g سانتریفیوژ شد. پلت سلولی حاصل در ۱ mL محیط کشت اولیه به صورت سوسپانسیون درآمد و به فلاسک کشت جدید منتقل شد (Wolf and Quimby, 1976). در پاساژ سلول‌ها، از پاساژ شماره ۴ به بعد آنتی‌بیوتیک از محیط کشت حذف شد. با توجه به اندازه نسبتاً بزرگ سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر، این سلول‌ها تا تراکم ۳۰ هزار عدد درون فلاسک ۱۲/۵ cm^۲، از ۳۰ هزار تا ۱۰۰ هزار درون فلاسک ۲۵ cm^۲ و از ۱۰۰ هزار تا ۵۰۰ هزار درون فلاسک ۷۵ cm^۲ کشت داده شدند. به صورت یک قاعده‌ی کلی در فلاسک ۱۲/۵ cm^۲، ۳ میلی‌لیتر محیط کشت، در فلاسک ۲۵ cm^۲، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت و در فلاسک ۷۵ cm^۲، ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شد. این سلول‌ها، ۲۲ بار مورد پاساژ قرار گرفته‌اند.

مطالعات سیتوژنتیک

به منظور بررسی محتوی ژنتیکی سلول از آن‌ها در پاساژ شماره ۴ کارپوتیپ تهیه شد. به این ترتیب که ابتدا ۲۴ ساعت قبل از شروع کار، محیط کشت سلول‌ها به طور کامل تعویض شد. محلول کلسمید با غلظت ۲ μL/mL به فلاسک اضافه شد و فلاسک به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. کلسمید مانع از تشکیل دوک‌های میتوز شده، از عبور سلول‌ها از مرحله متافاز جلوگیری می‌کند و

سلول‌ها را در این فاز نگه می‌دارد. بدین ترتیب باعث هم‌فاز شدن سلول‌ها می‌شود. بعد از سپری شدن زمان کافی، سلول‌ها توسط آنزیم تریپسین از کف فلاسک جدا شده، در دور ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پلت سلولی در ۱۰ میلی‌لیتر محلول هیپوتونیک به آهستگی به صورت سوسپانسیون درآمد و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از این مدت ۳ میلی‌لیتر محلول فیکساتیو کارنوی خنک به آهستگی به محلول اضافه شد و دوباره با دور و زمان فوق‌الذکر سانتریفیوژ شد. پلت سلولی حاصل به صورت قطره قطره و با پیپتاژ آهسته توسط ۱۰ میلی‌لیتر محلول فیکساتیو خنک دوباره به صورت سوسپانسیون درآمد و با همان دور و زمان سانتریفیوژ شد. این مرحله دو بار تکرار شد. محلول فیکساتیو با خارج کردن آب سلول و جلوگیری از چروک خوردن دیواره آن، سلول را فیکس می‌کند. بعد از مرحله نهایی فیکس، ۱ میلی‌لیتر محلول فیکساتیو خنک بر روی سلول‌ها ریخته شد و سلول به روش لام‌گیری مرطوب لام‌گیری شد. در نهایت کروموزوم‌ها توسط گیمسا در دمای محیط رنگ‌آمیزی شدند و سپس با آب شیر شسته شدند (Imajoh et al., 2007) و در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

ذخیره‌سازی سلول‌ها

ظرف کشت سلولی روزانه در زیر میکروسکوپ بررسی شد و رشد سلول‌ها مشاهده شد. زمانی که سلول‌ها حدود ۷۰٪ کف را پوشانده بودند (زمانی که سلول‌ها در فاز رشد فعال بودند) فریز شدند.

مراحل جداسازی سلول‌ها از ظرف کشت طبق روش توضیح داده شده در قسمت پاساژ پیش رفت با این تفاوت که سانتریفیوژ این سلول‌ها در دمای ۴°C انجام شد. در این مرحله سلول‌ها مورد شمارش قرار گرفتند و تعداد ۵۰۰ هزار سلول به ازای هر ویال در نظر گرفته شد. به منظور محاسبه تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر از رابطه ۳ استفاده شد (Freshney, 2005). پلت سلولی حاصل در ۹۰۰ μL محیط مخصوص فریز (۸۰٪ محیط کشت به همراه ۲۰٪ FBS) به صورت سوسپانسیون درآمد.

$$\text{رابطه ۳: } \frac{\text{تعداد کل سلول‌های شمارش شده}}{۴} \times \text{عکس نسبت رقت} \times ۱۰^۴ = \text{تعداد سلول‌های شمارش شده (در هر میلی‌لیتر)}$$

پس از آن $100\mu\text{L}$ دی‌متیل‌سولفواکساید (DMSO)^۱ آرام و به صورت قطره قطره بر روی سوسپانسیون سلولی چکانده شد. در نهایت کل محلول به تیوب مخصوص فریز منتقل شد و بعد از چسباندن برچسب حاوی مشخصات سلول، ویال سلولی به مدت ۱ ساعت در فریزر -20°C و یک شبانه روز در فریزر -70°C نگهداری شد و در نهایت به فاز بخار نیتروژن، که دمای -196°C دارد، منتقل شد (Wolf and Quimby, 1969).

یخ‌زدایی و ذوب سلول‌ها

بعد از گذشت یک ماه، به منظور ذوب سلول‌ها، کرایوتیوب از تانک ازت خارج شد و درون بن‌ماری 37°C قرار داده شد تا کمی ذوب شود و تکه‌های کوچک یخ در آن دیده شود. سوسپانسیون سلول از داخل کرایوتیوب به درون لوله آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری استریل دارای ۱۲ میلی‌لیتر محیط کشت L-15 حاوی ۲۰٪ FBS منتقل شد. سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور 300g سانتریفیوژ شد. پلت سلولی توسط 4mL محیط کشت حاوی ۲۰٪ FBS به صورت سوسپانسیون درآمد و بعد از محاسبه درصد بقا (با استفاده از رابطه ۲) به فلاسک کشت $12/5\text{cm}^2$ منتقل شد و در انکوباتور قرار گرفت. محیط کشت این فلاسک بعد از ۱۸ الی ۲۲ ساعت به صورت کامل با محیط کشت حاوی ۲۰٪ FBS تعویض شد. این سلول‌ها بعد از ۱۰ تا ۱۲ روز کف ظرف کشت را پوشاندند و آماده پاساژ شدند.

نحوه پردازش آماری داده‌ها

به منظور بررسی مطالعات آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها توسط تست Kolmogorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از آزمون Leven نیز به منظور ارزیابی برابری واریانس‌ها استفاده شد. برای محاسبه اختلاف میان داده‌های مختلف از آزمون One Way ANOVA و پس‌آزمون دانکن استفاده شد.

1- Dimethyl Sulfoxide

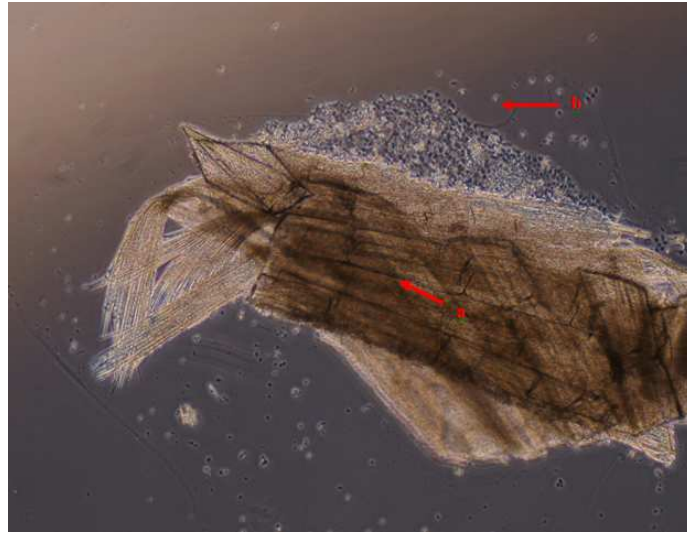
نتایج

درصد رشد سلول از باله‌های مختلف

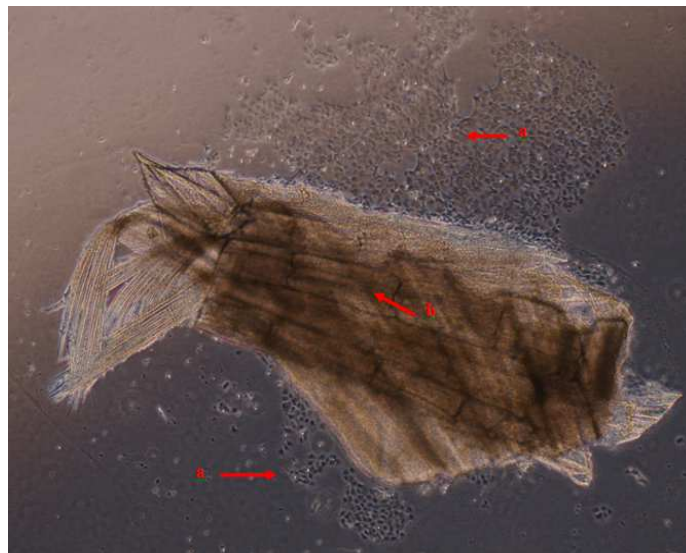
آزمون نرمالیتی برای درصد مهاجرت سلول‌ها از هر بافت نشان داد که توزیع داده نرمال است ($P < 0/05$). همچنین آزمون Leven نیز نشان دهنده برابری واریانس‌ها بود ($P > 0/05$). رشد سلول از باله‌های مختلف در چهار گروه در شش بار تکرار با آزمون ANOVA با یکدیگر مقایسه شدند و نتیجه این آزمون نشان داد در سطح معنی‌داری ۹۹٪، رشد سلول از باله‌های مختلف در چهار گروه با هم تفاوت دارد ($P < 0/01$). برای یافتن این اختلاف پس‌آزمون Duncan انجام شد.

نتیجه نشان داد رشد سلول از باله‌های مخرجی و پشتی با هم تفاوتی نداشت اما بین رشد سلول از باله سینه‌ای با باله‌های پشتی و مخرجی و باله دمی با باله‌های مخرجی، پشتی و سینه‌ای اختلاف معنی‌داری وجود داشت. باله سینه‌ای با میانگین ۷۱/۳۱٪ بیش‌ترین درصد رشد سلول از بافت را نشان داد. بعد از آن باله دمی با میانگین ۵۲٪ قرار داشت و در آخر باله‌های پشتی و مخرجی به ترتیب با میانگین‌های ۳۶/۸۶٪ و ۳۵/۹۵٪ کم‌ترین میزان رشد سلول از بافت را نشان دادند.

مهاجرت سلول از باله سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر در دو زمان ۱۵ ساعت و ۳۶ ساعت بعد از کاشت بافت به ترتیب در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱: مهاجرت سلول از باله سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر ۱۵ ساعت بعد از کاشت بافت. a: سلول‌های مهاجرت کرده از بافت؛ b: بافت باله سینه‌ای.

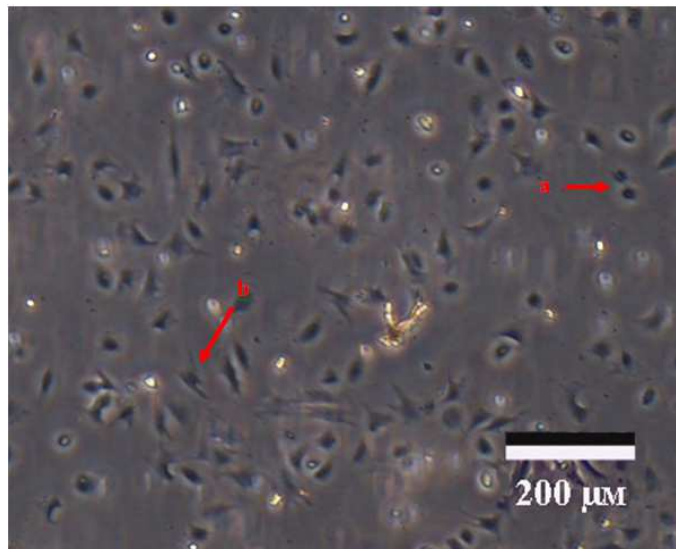


شکل ۲: مهاجرت سلول از باله سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر ۳۶ ساعت بعد از کاشت بافت. a: سلول‌های مهاجرت کرده از بافت؛ b: بافت باله سینه‌ای.

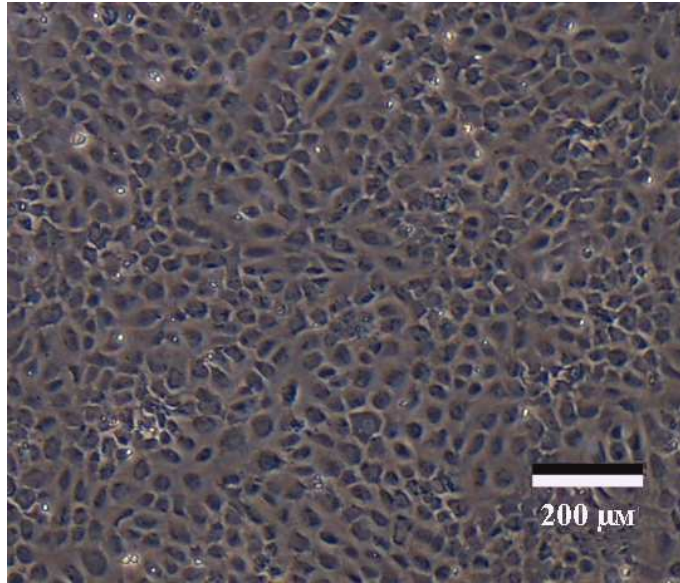
درصد بازماندگی در زمان‌های مختلف تیمار با آنزیم تریپسین

درصد بقا سلول‌ها در سه گروه (سه زمان مختلف تیمار با آنزیم) در سه بار تکرار با روش آنالیز واریانس با یکدیگر مقایسه شد. نتیجه این آزمون با ۹۹٪ اطمینان نشان داد، درصد بقا سلول‌ها در ۳ گروه (زمانهای مختلف تیمار با آنزیم)، حداقل در دو گروه با هم متفاوت بودند ($P=0/001$). برای یافتن اختلاف گروه‌ها پس‌آزمون دانکن انجام شد.

نتایج پس‌آزمون دانکن نشان داد درصد بقا سلول‌ها در سه تکرار در زمان اول تیمار با آنزیم، با دو زمان دیگر تفاوت دارد اما بین زمان دوم و سوم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. سلول‌های کشت یافته ماهی آزاد دریای خزر بعد از گذشت دو روز از کشت اولیه به روش جداسازی آنزیمی در شکل ۳ و بعد از گذشت پنج روز در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۳: دو روز بعد از کشت اولیه ماهی آزاد دریای خزر با روش جداسازی آنزیمی. a: سلول‌های اپیتلیالی شکل؛ b: سلول‌های فیبروبلاستی شکل.



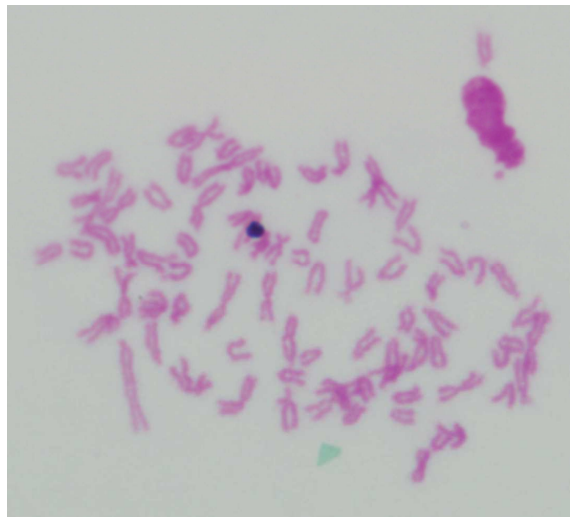
شکل ۴: سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر پنج روز بعد از کشت اولیه با روش جداسازی آنزیمی

درصد بقا بعد از یخ‌زدایی

میانگین درصد بقا بعد از یخ‌زدایی سلول‌ها در ۵ تکرار معادل ۸۴/۴٪ بود.

مطالعات سیتوژنتیک

در مجموع، ۱۷ مجموعه کروموزومی شمارش شد. برای یکی از مجموعه کروموزوم‌های متافازی ۷۴ عدد کروموزوم، سه مجموعه کروموزوم‌های متافازی ۷۶ عدد، دو مجموعه کروموزوم‌های متافازی ۸۴، یک مجموعه کروموزوم‌های متافازی ۸۱ و ده مجموعه کروموزوم‌های متافازی دیگر ۸۰ عدد کروموزوم شمارش شد (شکل ۵).



شکل ۵: نمونه‌ای از کروموزوم‌های متافازی طبیعی ماهی آزاد دریای خزر حاصل از کشت اولیه سلول‌های باله سینه‌ای $2n=80$ (رنگ آمیزی گیمسا؛ درشت‌نمایی ۱۰۰۰)

بحث

نتایج به دست آمده در این بررسی در رابطه با شناسایی بهترین باله، هم‌سو با مطالعه انجام شده بر روی ماهی طلایی در سال ۲۰۰۶ است. در آنجا نشان داده شد بهترین باله به منظور کاشت، بافت باله سینه‌ای با ۷۰٪ مهاجرت سلول از بافت است، بعد از آن باله‌های مخرجی و دمی به ترتیب با ۶۵٪ و ۴۲٪ و در نهایت باله پشتی تنها با ۷٪ مهاجرت سلول از بافت ثبت شد (Mauger et al., 2006). در هر دو مطالعه باله سینه‌ای مناسب‌ترین باله به منظور کاشت بافت بود. علاوه بر این چون هر ماهی دو عدد باله سینه‌ای دارد در مقایسه با باله مخرجی و دمی در دسترس‌تر است و با جداکردن یکی از باله‌ها مشکل جدی در زندگی ماهی به وجود نمی‌آید. از طرف دیگر در صورت از بین رفتن یکی از باله‌ها، باله دیگر در دسترس است.

زمان تیمار با آنزیم به عوامل مختلفی از جمله بافت، سن جاندار، دمایی که در آن آزمایش انجام می‌پذیرد و غلظت آنزیم مورد استفاده بستگی دارد. در مطالعات انجام شده زمان‌های متنوعی با توجه به پارامترهای بیان شده مورد استفاده قرار گرفته است ولی در اغلب آن‌ها غلظت آنزیم

تریپسین ۰/۲۵٪ درصد گزارش شده است (Lai et al., 2003; Montero et al., 1996). Bodian در سال ۱۹۵۶ بیان کرد زمانی که کلیه میمون در معرض آنزیم قرار می‌گیرد، سلول‌هایی که در ۱۵ دقیقه اول تیمار با تریپسین از بافت جدا می‌شوند، با وجود این که درصد بقا بالایی دارند ولی قابلیت چسبیدن و رشد در محیط کشت را ندارند و علت این مساله آزاد شدن مواد سمی در اثر تماس سلول با آنزیم تریپسین است. وی بیان کرد که اگر سلول‌های تیمار اول دور ریخته شوند و دوباره آنزیم تازه بر روی بافت ریخته شود، سلول‌های حاصل قابلیت رشد و چسبندگی خواهند داشت (Bodian, 1956). در گزارش‌های منتشر شده، مجموعه سلول‌های به دست آمده در زمان‌های مختلف آنزیمی با یکدیگر مخلوط شده‌اند (Chi et al., 2001; Part et al., 1993; Lester, 2007) و درصد بقا به صورت تک به تک برای هر زمان محاسبه نشده است. در مطالعه حاضر سعی شد تا تفاوت درصد بقا این سلول‌ها بررسی شود تا مناسب‌ترین زمان به دست آید. نتایج حاصل بیان کرد که سلول‌های به دست آمده از تیمار ۱۵ دقیقه اول با دو گروه ۱۵ دقیقه دوم و سوم تفاوت معنی‌داری دارد. این تفاوت را می‌توان این‌گونه توضیح داد که زمانی که بافت در معرض آنزیم تریپسین قرار می‌گیرد ابتدا سلول‌هایی که در مقایسه با سایر سلول‌ها سست‌تر هستند جدا می‌شوند. این سلول‌ها که به صورت عمده سلول‌های سطحی هستند، در مقایسه با سلول‌های عمقی‌تر بیش‌تر در معرض تماس با آنزیم قرار می‌گیرند و احتمالاً پروتئین سطحی آن‌ها بیش‌تر دچار آسیب می‌شود. این امر سبب می‌شود تا در زمان محاسبه درصد بقا، این سلول‌ها زنده‌مانی نسبتاً بالایی را نشان دهند ولی زمانی که به محیط کشت منتقل می‌شوند نتوانند به ظرف کشت چسبیده، آن را پر کنند و به مرحله پاساژ برسند. در طی آزمایش‌ها نیز این امر روشن شد که گرچه تعداد سلول‌های به دست آمده در تیمار ۱۵ دقیقه اول در مقایسه با سایر تیمارها بیش‌تر بود ولی این سلول‌ها پاساژپذیر نبودند و منجر به تولید رده سلولی نشدند.

روش Explant در مقایسه با روش آنزیمی مزایایی دارد از جمله سریع‌تر بودن عملیات کشت، جلوگیری از آسیب به سلول‌ها به علت تماس زیاد با آنزیم (Avella et al., 1994)، ساده بودن روش کشت و قابل اعتماد بودن در مورد مهاجرت سلول، در مقابل در کاشت بافت، تکه‌های بافت در محیط کشت باقی می‌مانند که این مساله پاساژ سلول‌های مهاجرت کرده را سخت می‌کند. نکته اساسی در مورد پاساژ این سلول‌ها این است که طی چندین پاساژ اول (معمولاً تا ۱۰ پاساژ اول)

نیمی از محیط قدیمی به همراه نیمی از محیط جدید به سلول‌ها اضافه شد تا غلظت پیام‌های سلولی در محیط به حدی باقی بماند که رشد و تقسیم سلول‌ها را تحریک کند (Lu et al., 1990). از طرف دیگر با کمک کشت آنزیمی می‌توان تعداد زیادی سلول در زمان کم به دست آورد. کشت‌های آنزیمی از یک‌دست بودن بیش‌تری از نظر نوع سلول برخوردار هستند که این مساله نیز قابل توجه است. بالا بودن میزان زنده‌مانی این سلول‌ها بیانگر قابلیت ذخیره‌سازی آن‌ها است.

در آزمایش‌های انجام شده بر روی سلول‌های به دست آمده مشخص شد که عدد کروموزومی دیپلوئید این سلول‌ها ۸۰ است که این عدد با گزارش Kalbassi و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد. این مساله بیانگر آن است که این سلول‌ها حداقل از نظر تعداد کروموزوم طبیعی بوده‌اند و ترانسفورماسیون در آن‌ها ایجاد نشده است. از همین رو، اگر از این رده‌ها به منظور مطالعات *in vitro* استفاده شود نتایج حاصل به واقعیت نزدیک‌تر خواهد بود.

در این بررسی سلول‌های به دست آمده از روش Explant از لحاظ ریخت‌شناسی بیش‌تر مخلوط فیبروبلاستی- اپیتلیالی شکل را نشان دادند در صورتی که سلول‌های به دست آمده با روش آنزیمی عموماً اپیتلیالی شکل بودند. این مساله در منابع نیز ذکر شده است که جداسازی آنزیمی باعث یکنواخت‌تر شدن کشت می‌شود (Freshney, 2005). به نظر می‌رسد علت این مساله این باشد که زمان کاشته شدن بافت، تمامی سلول‌ها اعم از اپیتلیالی یا فیبروبلاستی فرصت مهاجرت از بافت و رشد را دارند ولی زمانی که بافت در معرض آنزیم قرار می‌گیرد سلول‌هایی بیش‌تر جدا می‌شوند که اثر تریپسین بر روی آن‌ها یکسان است. به عنوان مثال زمانی که بافت ۱۵ دقیقه در معرض آنزیم قرار می‌گیرد بیش‌تر سلول‌هایی جدا می‌شوند که کم‌تر از ۱۵ دقیقه برای جداسازی آن‌ها زمان لازم است و سلول‌هایی که زمان بیش‌تری برای جدا شدن نیاز دارند، وارد محلول نمی‌شوند. در نتیجه اگر هدف از کشت اولیه به دست آوردن نوع خاصی از سلول (اپیتلیالی یا فیبروبلاستی) باشد بهتر است از روش جداسازی آنزیمی استفاده شود.

امروزه می‌توان نیاز به کشت و توسعه کشت‌های سلولی را به دو دسته روش‌شناسی و زیست‌شناسی تقسیم کرد. در بسیاری از موارد جدا کردن این دو از یکدیگر کار بسیار سختی است. به نظر می‌رسد مهم‌ترین مساله در رابطه با کشت سلول هر گونه مستقل، مطالعه فیزیولوژی،

متابولیسم و نیاز به مواد مغذی آن رده سلولی است. عدم وجود روش‌های سیستماتیک کشت سلول در کشور و عدم وجود رده سلولی از ماهی آزاد دریای خزر، محدودیت‌های اصلی در جداسازی و تشخیص ویروس‌های آلوده کننده این گونه است. موفقیت در تولید رده سلولی از ماهی آزاد دریای خزر علاوه بر کمک به حفظ ژنتیکی این گونه، به مطالعات ویروس شناسی، ژنتیک، سم‌شناسی و در مجموع به اصلاح شرایط تکثیر و پرورش این ماهی و نگهداری و حفاظت از آن کمک شایانی خواهد کرد.

تشکر و قدردانی

در پایان لازم است از دکتر صیاد بورانی، ریاست محترم مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی تنکابن، بابت تامین ماهی آزاد تشکر و قدردانی نمود. بخشی از حمایت مالی این پایان‌نامه توسط مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران صورت گرفته است.

منابع

- Avella M., Berhaut J. and Payan P. 1994.** Primary culture of gill epithelial cells from the sea bass *Dicentrarchus labrax*. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 30: 41-49.
- Bodian D. 1956.** Simplified method of dispersion of monkey kidney cells with trypsin. Virology, 2: 575-576.
- Butler R. and Nowak B.F. 2004.** A dual enzyme method for the establishment of long- and medium-term primary cultures of epithelial and fibroblastic cells from Atlantic salmon gills. Journal Fish Biology, 65(4): 1108-1125.
- Chi S.C., Hu W.W. and Lo B.J. 2001.** Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). Journal Fish Diseases, 22(3): 173-182.
- Freshney R.I., 1987.** Culture of animal cells: a manual of basic technique. Alan R. Liss Inco. New York, P: 397.
- Fryer J.L., Yusha A. and Pilcher K.S. 1965.** The in vitro cultivation of tissue and cells of pacific salmon and steelhead trout. Annals of the New York Academy of Sciences, 126(1): 566-586.
- Fryer J.L. and Lannan C.N. 1994.** Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fishes. Journal of Tissue Culture Methods, 16(2): 87-94.
- Imajoh M., Ikawa T. and Oshima S. 2007.** Characterization of a new fibroblast cell line from a tail fin of red sea bream, *Pagrus major*, and phylogenetic relationships of a recent RSIV isolate in Japan. Virus Research, 126: 45-52.
- Kalbassi M.R., Dorafshan S., Tavakolian T., Khazab M. and Abdolhay H. 2006.** Karyological analysis of endangered Caspian salmon, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). Aquaculture Research, 37: 1341-1347.
- Lai Y.S., John J.A.C., Lin C.H., Guo I.C. and Chen S.C., Fang K., Lin C.H. and Chang C.Y. 2003.** Establishment of cell lines from a tropical grouper, *Epinephelus awoara*, and their susceptibility to grouper irido- and nodaviruses. Journal of Fish Diseases, 26: 31-42.

- Lakra W.S., Swaminathan T.R. and Joy K.P. 2011.** Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 1–20.
- Leong J.C., Anderson E., Bootland L.M., Chiou P.W., Johnson M. Kim C., Mourich D. and Trobridge G. 1997.** Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. *Developments in Biological Standardization*, 90: 267–277.
- Lester K.A. 2007.** Primary cell cultures from cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). M.Sc. Thesis, University of Stirling, P: 64.
- Lu Y.A., Lannan C.N., Rohovec J.S. and Fryer J.L. 1990.** Fish cell lines: Establishment and characterization of three new cell lines from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *In Vitro Cellular Developmental Biology*, 26: 275–279.
- Mauger P.E., Le Bail P.Y. and Labbe C. 2006.** Cryobanking of fish somatic cells: Optimizations of fin explant culture and fin cell cryopreservation. *Comparative biochemistry and physiology B*, 144: 29–37.
- Moritz C. and Labbe C. 2008.** Cryopreservation of goldfish fins and optimization for field scale cryobanking. *Cryobiology*, 56(3): 181–188.
- Montero M., Le Belle N., Vidal B. and Dufour S. 1996.** Primary cultures of dispersed pituitary cells from estradiol-pretreated female silver eels (*Anguilla anguilla* L.): immunocytochemical characterization of gonadotropic cells and stimulation of gonadotropin release. *General and Comparative Endocrinology*, 104: 103–115.
- Part P., Norrgren L., Bergstrom E. and Sjoberg P. 1993.** Primary cultures of epithelial cells from rainbow trout gills. *The Journal of Experimental Biology*, 175: 219–232.
- Wolf K. and Quimby M.C. 1962.** Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science*, 135: 1065–1066.
- Wolf K. and Quimby M.C. 1969.** Fish Cell and Tissue Culture. In: Hoar W.S. and Randall D.J. (Eds). *Fish Physiology*, Vol 3. Academic Press, Pp: 253–305.
- Wolf K. and Quimby M.C. 1976.** Primary monolayer culture of fish cells initiated from minced tissues. *Tissue Culture Association manual*, 2(4): 445–448.

Establishment and characterization of epithelial-like cell line from Caspian trout (*Salmo trutta caspius*) fin tissues

Kaveh Noroozi¹, Mohammad Reza Kallbassi^{2*}, Parvaneh Farzaneh^{3}, Seyed Abolhasan Shahzadeh Fazeli⁴, Maryam Farghadan⁵, Ahmad Nasimian⁶, Mehrnaz Izadpanah⁷, Sepideh Ashouri Movassagh⁸, Shiva Mohammadi⁹, Zahra Moradmand¹⁰, Mansoureh Farhangnia¹¹**

1-M.Sc. in Department of Aquaculture, Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran.

2- Professor in Department of Department of Aquaculture, Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran.

3- Assistant Professor in Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran.

4- Assistant Professor in Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran.

5- B.Sc. in Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran.

6- M.Sc. in Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran.

7- M.Sc. in Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran.

8- Assistant Professor in Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran.

9- M.Sc. in Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran.

10- M.Sc. in Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran.

11- M.Sc. in Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran.

Received: August 2014

Accepted: November 2014

Abstract

Cell lines provide an important biological tool for carrying out investigations into physiology studies and their applications are more growing every day. Here we tried to establish a cell line from Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). We used Caspian salmon fry and two primary culture methods, Explant and Enzymatic disaggregation were undertaken. Cell migration from pectoral, dorsal, caudal and anal fins was studied. Leibovitz's L-15 with 20% FBS and 1% Pen-Strep was used as culture medium. Karyotyping was conducted to characterization of established cell line. Consequently cells were freezed with DMSO and stored at -196°C. Explant Efficiency was showed that the best fin for explant is pectoral fin with the average of 71.31%. In comparison between two primary culture methods, enzymatic disaggregation with trypsin was more efficient. Chromosome counts were suggested 2n=80 and viability was 84.4% after one month storage in liquid nitrogen. Consequently, these cells have been subcultured, Freezed and defreezed over 22 times since their initiation and showed reasonable growth rate, therefor they can be used as cell lines in other studies. These cell lines can be reached at Iranian Biological Resource Center (IBRC) as the first aquactic animal cell strain with short names; CS2-1, CS2-2, CSe and IBRC C10190-3 catalogue numbers.

Key words: *Caspian Salmon, Primary Culture, Epithelial Cell Line.*

*Corresponding Author: kalbassi_m@modares.ac.ir and farzaneh@ibrc.ir
