کشت سلولی اولیه از بافت باله دمی ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*)

منا هادی فر[۱]، سمیه حقیقی کارسیدانی*[۱]، محدث قاسمی[۲]

*haghighikarsidani@yahoo.com

۱ ـ گروه شیلات، واحد بندرانزلی، دانشگاه آزاد اسلامی، بندر انزلی، ایران
۲ـ پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۷

چکیده

در این مطالعه رده‌های اولیه سلولی از طریق کشت قطعاتی از باله‌ی دمی ماهی سفید دریای خزر به روش کاشت با دو تیمار (بدون آنزیم و تیمار با آنزیم تریپسین) انجام شد. بدین منظور قطعات (۱ میلی‌متر مکعب) بافت باله دمی در شرایط استریل از ۱۰ عدد ماهی جوان و سالم با میانگین وزن ۱±۱۲ گرم و میانگین طولی ۱±۱۱ سانتی متر جدا شده و در محیط کشت L-15 (Leibovitz L-15) دارای سرم جنین گاوی (۱۰ و ۲۰ درصد) و آنتی بیوتیک پنی سیلین استرپتومایسین با pH ۶/۸ و ۷/۲ کاشته شد و در دمای ۲۱ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. مخلوطی از انواع سلول‌ها از روز دوم بصورت پراکنده و متصل به فلاسک کشت مشاهده گردیدند، اما لایه سلولی یکنواخت شامل سلول‌ها با مورفولوژی ناهمگن اپیتلیالی و شبه فیبروبلاستی پس از ۱۴-۱۲ روز تشکیل گردید. کشت مجدد سلول‌ها با استفاده از آنزیم تریپسین انجام شد. در کشت‌های مجدد، تک لایه سلولی شامل سلول‌هایی با مورفولوژی همگن اپیتلیالی تشکیل شد. تاکنون این سلول‌ها ۲۱ بار پاساژ داده شدند و این نتایج نشاندهنده امکان تولید رده سلولی دائمی از بافت باله دمی ماهی سفید دریای خزر می‌باشد.

لغات کلیدی: کشت بافت، باله دمی، ماهی سفید دریای خزر

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.2.12.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119011]

مقدمه

بسیاری از سلول‌های موجودات مختلف تحت شرایط خاص قادرند در خارج از اندام و یا بافت اصلی خود به رشد و تکثیر ادامه دهند. سلول‌های ایزوله شده، بافت‌ها یا اندام‌ها را می‌توان در ظروف پلاستیکی یا شیشه‌ای با یک محیط حاوی مواد مغذی و فاکتورهای رشد سلولی و درجه حرارت‌های تعریف شده نگهداری و تکثیر نمود (Bulter, 2004). کشت اندام‌ها، بافت‌ها و سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی تحت عنوان کشت بافت نامیده می‌شود که در بسیاری از شاخه‌های علمی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Aschner *et al*., 2012). کشت سلول و تولید تیره‌های سلولی ماهی به عنوان یک مدل آزمایشگاهی برای تکثیر و مطالعه ویروس‌ها، اثرات داروهای ضد ویروسی، تولید واکسن‌های تجربی (Rathore *et al*., 2007)، کنترل بیماری‌ها (Villena, 2003)، بیوتکنولوژی و آبزی‌پروری (Bols *et al*., 1992)، آلاینده‌های محیط زیست (Wolf and Quimby, 1962)، کاربردهای تراریخته (Fan and Collodi, 2002)، بیوشیمی (Hightower and Renfro, 1988) و حفظ ذخایر (Zhou *et al*., 2008) مفید هستند. تیره‌های سلولی ایجاد شده توسط کشت‌های اولیه برای تولید مکمل‌های غذایی نظیر امگا ۳ استفاده می‌شوند. ترکیب و متابولیسم اسیدهای چرب اشباع نشده (n-3) و (n-6) و پلی اسیدهای چرب (PUFA) مکمل شده بر تیره سلولی (AS) ماهی سالمون آتلانتیک مورد مطالعه قرار گرفته است (Tocher and Dick, 1990). بافت‌های خاصی وجود دارند که کشت آنها نسبت به سایر بافت‌ها آسان‌تر است. سلول‌های جنین و باله‌ها از فراوان ترین موارد فهرست شده به عنوان منبعی از بافت‌های بکار رفته در کشت اولیه می‌باشند. بافت باله به علت نمونه‌برداری آسان، قدرت‌ترمیم زیاد و عدم نیاز به کشتن ماهی (Mauger *et al*., 2006; Moritz and Labbe, 2008) اغلب برای کشت استفاده می‌گردد. محققان بسیاری هستند که از بافت باله ماهیان مختلف برای کشت سلول و تهیه تیره سلولی استفاده می‌کنند. مطالعات انجام شده در جهان شامل کشت باله در مورد ماهی کپور آینه‌ای *Cyprinus carpio* (Zhou *et al*., 2013)، ماهی طلایی *Carassius auratus* (Shima *et al*., 1980؛ Choresca *et al*., 2012؛ Mauger *et al*., 2006)، ماهی کپور علفخوار *Ctenopharygodon idella* (Yuanan Ly,1987)، ماهی شانک سرطلایی Sparus *aurata* (Bejar *et al*., 1997)، ماهی‌کپورکوی *Cyprinus carpio koi* (Dong *et al*., 2008)، ماهی‌کپوربارب *Puntius schwanenfeldi* (Karunasagr *et al*., 1998)، ماهی کپور سربزرگ، *Aristichthys nibilis* (Liu *et al*., 2002)، ماهی کپور روهو، *Labeo rohita* (Lakra *et al*., 1996)، ماهی هامور، *Epinephelus coioides* (Chi *et al*., 1999)، ماهی شانک قرمز، *Pagrosomus major* (Tong *et al*., 1998)، ماهی‌خاویاری سفید، *Acipenser transmontanus* (Wang *et al*., 2003)، ماهی‌خاویاری، *Acipenser sinensis* (Zhou *et al*., 2008) و ماهی‌هامورزرد، *Epinephelus awoara* (Lai *et al*., 2003) می‌باشد. همچنین کشت تک لایه از بافت باله دمی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) (نوروزفشخامی و همکاران، ۱۳۹۶)، کشت اولیه و تولید تیره سلولی از ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) (نوروزی و همکاران، ۱۳۹۳)، جداسازی، کشت و شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی مغزی تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) (کشیری و همکاران، ۱۳۹۳)، بررسی عملکرد سلول‌های فولیکولی تخمک تاس ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) (نوروزفشخامی و همکاران، ۱۳۹۴) و کشت سلول کبدی ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) (درخشش و همکاران، ۱۳۹۶) در ایران انجام شده است. به دلیل اهمیت حفظ ذخایر ژنتیکی آبزیان در ایران و نیز لزوم تهیه کشت‌های سلولی جانوران بومی برای مطالعات کاربردی، امکان تولید کشت سلولی اولیه از گونه ارزشمند ماهی سفید دریای خزر مورد توجه قرار گرفته است.

ماهی سفید دریای خزر از خانواده کپور ماهیان یکی از گونه‌های بومی دریای خزر است و در بیشتر سواحل ایرانی دریای خزر وجود دارد (بذرکار و آقامعالی، ۱۳۹۳). این ماهی دارای ارزش‌های اکولوژیک، اقتصادی و غذایی است که در سال بیش از نیمی از صید ماهیان استخوانی دریای خزر را بخود اختصاص می‌دهد (یعقوب زاده و همکاران، ۱۳۹۲). با توجه به اهمیت و کاربردهای کشت بافت و همچنین ارزش اقتصادی و غذایی ماهی سفید دریای خزر در ایران، سلول‌های باله دمی این ماهی کشت داده شد تا بتوان در آینده اقدام به تهیه تیره سلولی از بافت بالهی دمی ماهی مذکور اقدام نمود.

مواد و روش کار

ماهی و جمع آوری بافت باله دمی برای کشت سلولی اولیه

نمونه‌برداری، جداسازی و کشت بافت از بالهی دمی ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) سالم و ترجیحاً جوان

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.2.12.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119011]

(وزن متوسط ۱۲ گرم) صورت گرفت. در ابتدا ۱۰ عدد ماهی در مخلوط آب سرد و یخ بیهوش گردیدند و به مدت ۵ دقیقه در محلول وایتکس ۵ درصد غوطه‌ور شدند و با الکل ۷۰ درصد پاکسازی انجام گرفت (Kamalendra *et al*., 2010; Parameswaran *et al*., 2006)، در انتها بوسیله آب مقطر استریل آبکشی گردیدند. باله دمی در شرایط استریل بریده شده و با قیچی استریل، به اندازه حدود ۱ میلی‌متر مکعب قطعه قطعه شدند، سپس اقدام به تهیه کشت سلولی اولیه به دو روش شد.

محیط کشت و مکمل‌ها

محیط کشت پایه Leibovitz(L-15) (L-15; Gibco) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. برای کشت سلولی، ۲۳/۸ گرم پودر L-15 همراه با ۲۰ یا ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Gibco) به منظور تحریک رشد سلول و ایجاد خاصیت بافری، ۱۰ سی سی پنی سیلین استرپتومایسین (Gibco) برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی ناخواسته ناشی از استریل نامناسب و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر آمفوتریپسین B به عنوان ضد قارچ به یک لیتر آب مقطر ۲ بار تقطیر دیونیزه اضافه شد و پس از حل شدن کامل استریل گردید (خرمی‌زاده و فلک، ۱۳۸۸). فرآیند استریل کردن محیط کشت با استفاده از فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرون ساخت شرکت Milipore در زیر هود لامینار کلاس II ساخت شرکت ژال تجهیز ایران انجام پذیرفت (Kamalendra *et al*., 2010; Rathore *et al*., 2007).

کشت سلول

کشت سلولی اولیه از قطعات بافتی جدا شده به دو روش کاشت بافت تیمار بدون آنزیم تریپسین و کاشت بافت تیمار با آنزیم تریپسین تهیه شد.

تهیه کشت اولیه به روش کاشت بافت بدون تیمار با آنزیم تریپسین

قطعات بافتی پس از شستشو با محلول بافر نمکی فسفات (PBS) حاوی (۵۰۰ واحد میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر استرپتومایسین و ۲/۵ میلی‌گرم ضد قارچ)، به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۵۰rpm در محیط کشت L-15 همراه با ضد قارچ سانتریفیوژ (یخچالدار مدل ۸۵۱۰ ساخت شرکت Eppendorf آلمان) گردید، پس از اتمام مراحل شستشو فالکون های حاوی قطعات بافتی به زیر هود استریل منتقل گردیدند و مقداری محیط کشت به ظرف مورد نظر اضافه و سپس قطعات بافت بوسیله پیپت خارج و در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع کاشته شد و به انکوباتور با دو دمای ۲۱ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند (Moritz and Labbe, 2008).

تهیه کشت اولیه به روش کاشت بافت پس از تیمار با آنزیم تریپسین

به منظور مقایسه‌ی تأثیر آنزیم تریپسین بر میزان مهاجرت سلولی از قطعات بافتی، این تیمار به صورت آزمایشی در نظر گرفته شد. ابتدا قطعات بافتی به مدت ۱۵ دقیقه در محلول تریپسین (Trypsin-EDTA 1X) همراه با میله مغناطیسی (magnet) روی همزن مغناطیسی (Stirrer) با سرعت کند قرار گرفت. شدت چرخش همزن مغناطیسی درون بطری بنحوی تنظیم شد که کف ایجاد نشود (Wolf and Quimby, 1976). در زیر هود لامینار آنزیم تریپسین دور ریخته شد. سوسپانسیون سلولی همراه با ۵ میلی‌لیتر محیط کشت در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع کاشته و در انکوباتور با دو دمای ۲۱ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

در هر دو روش مذکور در دو روز اول بعد از کاشت، روزانه محیط کشت بافت‌ها به صورت کامل تعویض شد تا موکوس موجود که منبع اصلی آلودگی در کشت سلولی ماهی است، خارج گردد. پس از گذشت ۲ هفته هنگامی که سلول‌ها به سطح پوششی کامل رسیدند، از آنها پاساژ مجدد تهیه گردید و کشت مجدد هر دو هفته یک بار تکرار شد.

کشت مجدد و نگهداری

هنگامی که تک لایه سلولی کامل در کشت اولیه شکل گرفت، سلول‌ها به مدت چند دقیقه تحت تأثیر آنزیم (۰/۲۵ درصد تریپسین و ۰/۲ درصد EDTA) قرار گرفتند تا کلونی‌های سلولی که به کف فلاسک چسبیدند، جدا گردند. بعد از طی زمان مورد نظر ۱ میلی لیتر محیط کشت تازه فاقد آنتی بیوتیک روی سلول‌ها ریخته شود تا اثر تریپسین خنثی گردد. سپس سلول‌های جدا شده به دو بخش تقسیم شدند و به فلاسک های کشت بافت جدید منتقل گردیدند و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.2.12.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119011]

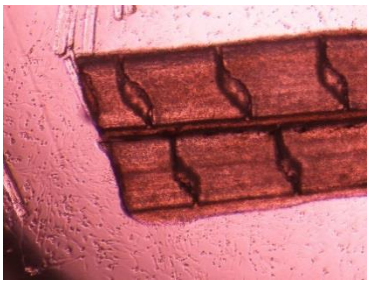
اثر دما

به منظور ارزیابی تأثیر دما بر روند رشد سلول‌ها نیز، سلول‌ها در دمای ۲۱ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در نهایت روند رشد سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری معکوس به صورت روزانه بررسی شد.

نتایج

تشکیل تک لایه سلولی

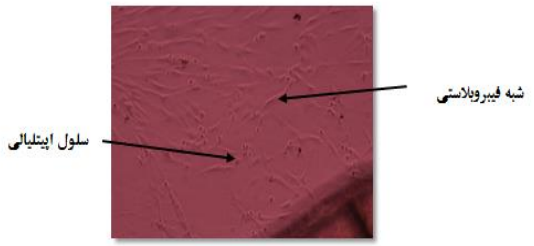
کشت سلول از بافت باله دمی ماهی سفید دریای خزر (*R. frisii kutum*) با استفاده از روش کاشت با دو تیمار (تیمار بدون آنزیم و از تیمار با آنزیم تریپسین) ایجاد شد. کاشت بافت تیمار بدون آنزیم تریپسین: ۴۸ ساعت پس از کاشت، بافت‌های کاشته شده به کف فلاسک چسبیدند. تکثیر سلولی ۷۲ ساعت بعد از کاشت بافت باله دمی شروع شد و پس از ۸ روز بتدریج کلونی‌ها بیشتر شدند و با تکثیر سریع این کلونی‌ها تک لایه سلولی در روز چهاردهم در اطراف بافت مشاهده گردید (شکل ۱).



شکل ۱ : تصاویر میکروسکوپ نوری معکوس از سلول‌های مشتق شده از باله دمی ماهی *R. frisii kutum*: تک لایه سلولی پس از ۱۰-۷ روز (بزرگنمایی ۴۰ x)

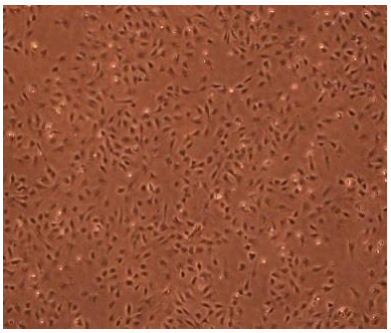
Figure 1: Reverse optical microscope images of cells derived from caudal fin of *R. frisii kutum*: Single cell cell after 7-10 days (magnification 40 x)

مورفولوژی اکثر سلول‌های تکثیر شده از کاشت باله، در روزهای ابتدایی کاشت نسبتاً نا همگن و شامل هر دو سلول اپیتلیالی و شبه فیبروبلاستی بودند (شکل ۲)، ولی پس از گذشت ۷ روز جمعیت سلول‌های ایتلیالی بیشتر از سلول‌های فیبروبلاستی شد. به منظور ازدیاد و خالص سازی سلول‌ها در روز ۱۴، کشت مجدد انجام شد. حاصل این کشت مجدد همگن شدن جمعیت سلول‌های اپیتلیالی شکل بود (شکل ۳). این سلول‌ها ۲۱ بار پاساژ داده شده بودند و مورفولوژی اپیتلیالی خود را در طول تمامی پاساژها حفظ کردند.



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ نوری معکوس از ماهیت ناهمگن سلول‌های ماهی سفید دریای خزر (*R. frisii kutum*) (بزرگنمایی ۱۰۰ x)

Figure 2. Reverse optical microscope images of the heterogeneous nature of the *R. frisii kutum* (magnification 100 x)



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ نوری معکوس از سلول‌های پاساژ شده (بزرگنمایی ۴۰ x)

Figure 3. Reverse optical microscope images of passage cells (magnification 40 x)

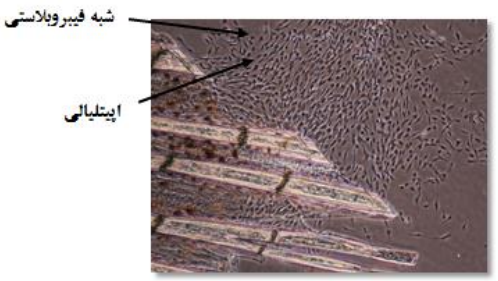
کاشت تیمار با آنزیم تریپسین

بافت‌ها در روز دوم به کف فلاسک چسبیدند و سلول‌ها شروع به تکثیر نمودند. سلول‌های رشد یافته مکعبی شکل بودند و به دلیل استفاده از آنزیم تریپسین در کاشت بافت سلول‌ها از نظر مورفولوژی از همان ابتدا جمعیت یکنواختی از سلول‌های مکعبی اپیتلیالی شکل را تشکیل دادند. در روز ۷، تمایز سلول‌ها قابل مشاهده شد (شکل ۴). رشد گسترده سلولی ادامه یافت و یک تک لایه کامل در روز ۱۲ تشکیل شد و پس از آن اقدام به کشت مجدد سلول‌ها گردید (شکل ۵).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.2.12.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119011]

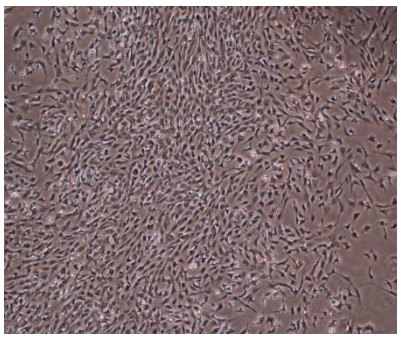
اثر دما بر سلول‌ها

کشت سلولی اولیه پیوستگی و تکثیر سلولی مختلفی را در دماهای مختلف ۲۱ و ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نشان داد. دمای مطلوب برای رسیدن به حداکثر رشد ۲۴ درجه سانتی‌گراد بود و به عنوان دمای مطلوب برای تمام آزمایش‌ها تا پایان کار در نظر گرفته شد (شکل ۶). با این حال، رشد در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد نیز مشاهده شد، با این تفاوت که رشد سلول‌ها در این دما کندتر بود (شکل ۷).



شکل ۴ : تصاویر میکروسکوپ نوری معکوس از سلول‌های مشتق شده از باله دمی ماهی (*R. frisii kutum*): تک لایه سلولی پس از ۱۰-۷ روز (بزرگنمایی x ۱۰۰)

Figure 1: Reverse optical microscope images of cells derived from caudal fin of *R. frisii kutum*: Single cell cell after 7-10 days (magnification 100 x)

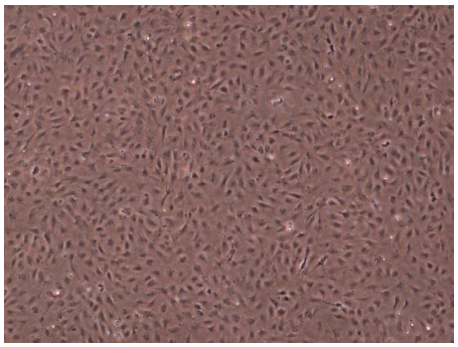


شکل ۵: تصاویر میکروسکوپ نوری معکوس از سلول‌های پاساژ شده باله دمی ماهی سفید دریای خزر (*R. frisii kutum*) (بزرگنمایی x ۴۰)

Figure 5: Reverse Optical Microscope Images of Passage Cells from caudal fin of *R. frisii kutum* (magnification 40 x)

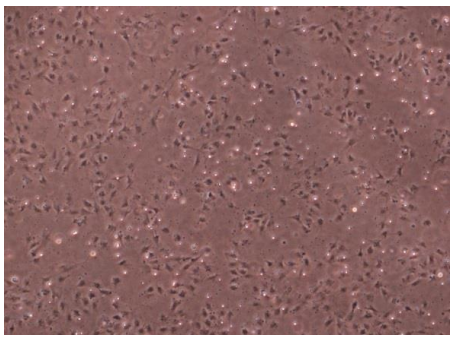
شرایط رشد سلول

پارامتر تکثیر و چسبندگی سلول‌ها در حضور ۳ متغیر دما، pH و غلظت سرم جنین گاوی مورد بررسی قرار گرفت. پارامترهای مذکور شامل دمای ۲۱ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد، pH ۶/۸ و ۷/۲ و غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصدی سرم جنین گاوی بود. طبق بررسی‌های بعمل آمده کشت‌های سلولی تحت شرایط دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد، pH ۶/۸ و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی دارای کمترین میزان رشد و چسبندگی بودند و به دلیل اسیدی شدن محیط سلول‌ها پس از ۳ روز شروع به ریزش کرده و از بین رفتند. افزایش میزان رشد و بازماندگی سلول‌ها در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد، pH ۷/۲ و ۲۰ درصد سرم جنین گاوی در طول فرآیند کشت سلول و پاساژ به عنوان شرایط بهینه در این مطالعه در نظر گرفته شد.



شکل ۶ : تأثیر دما بر چسبندگی و تکثیر سلول‌ها از باله دمی ماهی سفید دریای خزر (*R. frisii kutum*) در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی گراد (بزرگنمایی x ۴۰)

Figure 6: Temperature effect on adhesion and cell proliferation from caudal fin of *R. frisii kutum* in the 24 ° C (magnification 40 x)



شکل ۷: تأثیر دما بر چسبندگی و تکثیر سلول‌ها از باله دمی ماهی سفید دریای خزر (*R. frisii kutum*) در دمای ۲۱ درجه‌ی سانتی گراد (بزرگنمایی x ۴۰)

Figure 7: Temperature effect on adhesion and cell proliferation from caudal fin of *R. frisii kutum* in the 21 ° C (magnification 40 x)

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.2.12.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119011]

بحث

تاکنون تلاشی برای تهیه کشت سلول اولیه از ماهی سفید دریای خزر (*R. frisii kutum*) در کشور انجام نشده است. مزیت استفاده از باله دمی این است که دارای ظرفیت بازسازی بالایی است و می‌تواند به عنوان مدل خوبی برای توسعه تیره سلولی استفاده شود. علاوه بر این، نمونه‌گیری غیرکشنده بدون قربانی کردن ماهی را می‌توان با استفاده از باله دمی انجام داد (Mauger *et al*., 2006). در مراحل ابتدایی کشت سلولی اولیه، جمعیت سلولی متشکل از سلول‌های شبه فیبروبلاستی و سلول‌های اپیتلیالی بودند. همانطوریکه کشت سلولی پیشرفت می‌کرد، تعداد سلول‌های شبه فیبروبلاستی کاهش یافت، ولی جمعیت سلول‌های اپیتلیالی شکل بسرعت در حال افزایش بود که تک لایه سلولی تشکیل شد و با یافته نوروزی و همکاران (۱۳۹۳) مطابقت دارد.

خطر ابتلا به آلودگی باکتریایی و قارچی یکی از موانع عمده در تهیه کشت سلولی اولیه می‌باشد. این امر را می‌توان با استفاده از ماهی سالم و استفاده مؤثر از آنتی بیوتیک ها در محیط کشت رفع کرد (Kamalendra *et al*., 2010; Mauger *et al*., 2006). با این حال، استفاده از دوزهای بالای آنتی بیوتیک ها می‌تواند رشد و تکثیر سلول‌های کشت داده شده را کند یا حتی متوقف نماید. در این مطالعه استفاده از پنی سیلین (۱۰۰۰واحد میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰۰واحد میلی‌لیتر) و آمفوتریسین B (۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در ترکیب محیط کشت برای از بین بردن آلودگی باکتریایی و قارچی مناسب بود. در مطالعات انجام گرفته در سر تا سر جهان Mauger و همکاران (۲۰۰۶)، برای کشت باله دمی ماهی طلایی از جنتامایسین (۱۰۰۰ واحد میلی‌لیتر) و آمفوتریسین B (۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده کردند. Rathore و همکاران (۲۰۰۷) برای کشت ماهی روهو پنی سیلین (۲۰۰ واحد میلی لیتر)، استرپتومایسین (۲۰۰ واحد میلی‌لیتر) و آمفوتریسین B (۵۰ واحد میلی‌لیتر) استفاده نمودند و سرانجام Kamalendra و همکاران (۲۰۱۰) برای کاشت باله ماهی Tor mahseer (*Tor tor*) از پنی سیلین (۱۰۰۰ واحد میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و آمفوتریسین B (۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده نمودند.

در اکثر کشت‌های سلولی و بافتی ماهیان از محیط کشت EMEM[1]، MEM[2]، محیط ۱۹۹ و Leibovitz (L-15) استفاده می‌شود. تفاوت عمده آنها در میزان نمک‌ها، نوع و مقدار اسیدهای آمینه است. در سال‌های اخیر برای کشت سلول ماهی بیشتر از محیط L-15 استفاده شده است، زیرا این محیط کشت فاقد بیکربنات سدیم و حاوی پیروات می‌باشد و در صورت استفاده از این محیط کشت نیاز به افزودن گاز Co_2 به محیط کشت و در نتیجه انکوباتور Co_2 دار نیست. سلول‌های ماهی بخوبی در محیط کشت L-15 رشد می‌کنند (Leibovitz, 1963) همچنین برخی از محققان دریافتند که این محیط به طور مؤثر pH را در شرایط طبیعی محیطی حفظ می‌کند (Wolf and Quimby, 1969) و این محیط کشت بهترین محیط کشت برای رشد سلول‌های ماهی است (Tung *et al*., 1991; Fernandez *et al*., 1993a; Kumar *et al*., 2001). در این مطالعه از محیط کشت Leibovitz (L-15) برای کشت سلول‌های ماهی سفید دریای خزر استفاده گردید و تشکیل تک لایه‌ی سلولی پس از ۱۴- ۱۲ روز اتفاق افتاد بررسی‌هایی که بر زمان تشکیل تک لایه سلولی در محیط کشت L-15 در بین سایر محققان انجام گردید، نشان داد که زمان تشکیل تک لایه در گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. تشکیل تک لایه سلولی از بافت باله ماهی *Labeo rohita* در مطالعه Rathore و همکاران (۲۰۰۷) پس از ۲۰ روز انجام پذیرفت. زمان تشکیل تک لایه سلولی باله ماهی Tor mahseer (*Tor tor*) در مطالعه Kamalendra و همکاران (۲۰۱۰)، ۱۰ روز بود. در مطالعه Filice و همکاران (۲۰۱۴) بر ماهی *Oreochromis esculentus*، تشکیل تک لایه از باله این ماهی پس از ۸ روز انجام شد و در مطالعه‌ای که نوروزی و همکاران (۱۳۹۳) بر ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) انجام دادند، تشکیل تک لایه از بافت باله پس از ۱۰ روز انجام پذیرفت. این تفاوت در مدت زمان تشکیل تک لایه سلولی می‌تواند به دلیل تفاوت در گونه‌های ماهیان مورد مطالعه باشد.

دما در کشت سلول ماهی یک عامل بسیار مهم است (Bols *et al*., 1992). بسیاری از تیره‌های سلولی می‌توانند با طیف گسترده‌ای از درجه حرارت سازگار باشند (Wolf and Quimby, 1976). انتخاب دمای مطلوب برای کشت سلول‌های ماهی اغلب به دمای منحصربفرد ماهی نزدیک است. برای مثال، دمای مطلوب سلول‌های باله ماهی Turbot، ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد و دمای مطلوب برای رشد سلول‌های باله ماهی

[1] Eagles Minimum Essential Medium

[2] Minimum Essential Medium

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.2.12.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119011]

Flounder کمتر از ۲۰ درجه سانتی گراد می‌باشد (Kang *et al.*, 2003). در بررسی که توسط نوروزفشخامی و همکاران (۱۳۹۶) صورت گرفت کشت تک لایه از بافت باله دمی تاسماهی ایرانی در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نوروزی و همکاران (۱۳۹۳) اقدام به کشت اولیه و تولید تیره سلولی از ماهی آزاد دریای خزر در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نمودند. نوروزفشخامی و همکاران (۱۳۹۶) به منظور بررسی عملکرد سلول‌های فولیکولی تخمک تاس ماهی استرلیاد بافت تخمدان را در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد کشت دادند و دمای مطلوب در این مطالعه ۲۴ درجه سانتی گراد بود که بنظر می‌رسد این تفاوت‌ها به دلیل تفاوت دمای رشد و پرورش ماهیان مختلف باشد.

این تحقیق اولین مطالعه در زمینه کشت سلولی ماهی سفید دریای خزر در ایران می‌باشد. رشد و تکثیر سلول‌ها، تشکیل تک لایه سلولی کامل و یکنواختی در روش تیمار با آنزیم تریپسین بهتر از روش تیمار بدون آنزیم تریپسین بود. نتایج نشان داد که امکان تهیه کشت سلولی اولیه از باله دمی این ماهی در شرایط آزمایشگاهی در محیط کشت حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاوی و pH =۷/۲ در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد وجود دارد و روش کاشت تیمار با آنزیم تریپسین دارای بیشترین میزان چسبندگی و تکثیر می‌باشد.

منابع

بذرکار، و. و آقا معالی، م.ر.، ۱۳۹۳. تعیین خصوصیات بیوشیمیایی لیزوزیم ماهی سفید دریای خزر *Rutilus frisii kutum*، فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان،۲(۴): ۱-۱۲.

خرمی‌زاده، م.ر و فلک، ر.، ۱۳۸۸. مبانی و اصول مقدماتی تکنیک‌های کشت سلولی. دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۶۷-۶۰.

درخشش، ن.، موحدی نیا، ع.ا.، سلامات، ن.، هاشمی تبار، م. و بیاتی، و.، ۱۳۹۶. معرفی بهترین روش برای کشت اولیه‌ی سلول‌های کبدی ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*). مجله علوم و فنون دریایی، ۱۶(۱): ۱۱۱-۱۰۲.

کشیری، ح.، شعبانی، ع.، حیدری، ک و ایمانپور، م.ر.، ۱۳۹۳. شناسایی و کشت طولانی مدت سلول‌های بنیادی عصبی متن سفالن مغز تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، اولین همایش ملی پدافند غیر عامل در علوم دریایی، بندرعباس، وزارت کشور و اداره کل پدافند غیرعامل.۲۸ آبان. بندرعباس.

نوروزفشخامی، م.ر.، سوداگر، م.، بهمنی، م.، سلامات، ن.، مازندرانی، م و یزدانی ساداتی، م.ع.۱۳۹۴. مجله علوم محیطی خزر، ۱۴(۱): ۶۸-۵۵.

نوروزفشخامی، م.ر.، پورکاظمی، م.، حسن زاده صابر، م.، بهمنی، م.، برادران نویری، ش.، دلیری، م. و غروقی، ا. ۱۳۹۶. کشت بافت باله دمی تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus*. مجله پژوهش‌های جانوری. انجمن زیست شناسی ایران، ۳۰(۴): ۴۷۶-۴۶۵.

نوروزی، ک.، کلباسی، م.ر.، فرزانه، پ.، شاهزاده افضلی، س.ا.ح.، فرقدان، م.، نسیمیان، ا.، ایزدپناه، م.، آشوری موثق، س.، محمدی، ش.، مرادمند، ز و فرهنگ نیا، م.،۱۳۹۳. تولید و ارزیابی رده‌ی سلولی اپیتلیالی شکل از بافت باله ماهی آزاد دریای خزر، فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۲(۳): ۸۸-۶۹.

یعقوب زاده، ی.، حسین نژاد، م.، اسدی شیرین، گ. و پورعلی، م.۱۳۹۲. بررسی غلظت سرب در ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) سواحل دریای خزر (مطالعه موردی: بندرانزلی و رودسر). مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۲۲(۱۱۰): ۱۰۸-۱۰۲.

Aschner, M., Sunol, C and Bal-price, A., 2012. Cell Culture Techniques.In:Bal-price,A.,(ed) Guidance on Good Cell Culture Practice (GCCP). New York Dordrecht Heidelberg London pp. 3-18.

Bejar, J., Borrego, J. and Carmen Alvarez, M., 1997. A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture, 150: 143-153. DOI:10.1016/S0044-8486(96)01469-X.

Bols, N.C., Mosser, D.D and Steels, G.B., 1992. Temperature studies and recent advances with fish cells in vitro. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 103(1): 1-14. DOI: 10.1016/0300-9629(92)90235-I.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.2.12.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119011]

Bulter, M., 2004. Animal cell culture and technology, bios scientific publishers, tylor and francis group, london and new york, 299P. DOI:10.4324/9780203427835.

Chi, S.C., Hu, W.W. and Lo, B.J., 1999. 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 of Fish Diseases, 22: 173-182. DOI: 10.1046/j.1365-2761.1999.00152.x.

Choresca, C.H., kang, J. T., Han, J. E., Kim, J.H., Shin, S.P., Jun, J.W., Lee, B. C. and Park, S.C., 2012. Effect of storage media and time on fin explants culture in the goldfish *Carassius auratus*. African Journal of Biotechnology, 11 (24): 6599-6602. DOI: 10.5897/AJB11.3544.

Dong, C., Weng, S., Shi, X., Shi, N. and He, J., 2008. Development of a mandarin fish Siniperca chuatsi fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). Virus Res 135: 273-281. DOI: 10.1016/j.virusres.2008.04.004.

Fan, L. and Collodi, P., 2002. Progress towards cell-mediated gene transfer in zebrafish. Brief Funct Genomics, 1(2): 131-138. DOI: 10.1093/bfgp/1.2.131.

Fernandez, R.D., Yoshimizu, M., Ezura, Y. and Kimura, T., 1993a. Comparative growth response of fish cell lines in different media, temperatures and sodium chloride concentrations. Fish Pathology, 28: 27-34.DOI:10.1007/BF01404816.

Filice, M., Lee, C. and Mastromonaco, G.F., 2014. Conditions for initiating Lake Victoria haplochromine (*Oreochromis esculentus*) primary cell cultures from caudal fin biopsies. In vitro cellular and developmental biology-animal, 50: 807-810. DOI:10.1007/s11626-014-9790-x.

Hightower, L.E., and Renfro, J.L., 1988. Recent applications of fish cell culture to biomedical research. Journal of Experimental Zoology, 248: 290−302. DOI:10.1002/jez.1402480307.

Kamalendra, Y., Lakra, W.S., Sharma, J., Goswami, M. and Sharma, B.S., 2010. Devel opment of cell culture from caudal fin and heart of tor tor (*hamilton-buchanan*). 37: 37-43.

Kang, M.S., Oh, M.J., Kim, Y.J., Kawai, K. and Jung, S.J., 2003. Establishment and characterization of two cell lines derived from flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). Journal of fish diseases. 26: 657-665. DOI: 10.1046/j.1365-2761.2003.00499.x.

Karunasagr, I., Miller, S.D. and Frerichs, G.N., 1998. A new cell line from *Puntius schwanenfeldi* sensitive to snakehead fish cell line C-type retrovirus. Asian Fish Sci, 8: 151-157.

Kumar, G.S., Bright, I.S. and Philip, R., 2001. Development of a cell culture system from the ovarian tissue of African catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture, 194: 51–62. DOI:10.1016/S0044-8486(00)00509-3.

Lai, Y.S., John, J.A.C., Lin, C.H., Guo, C., Chen, S.C., Fang, K., Lin, C.H. and Chang, C.Y., 2003. Establishment of cell lines from a tropical grouper, *Epinephelus awoara* (Temmink and Schlegel), and their susceptibility to grouper irido- and nodaviruses.Journal of fish diseases.26: 31-42. DOI: 10.1046/j.1365-2761.2003.00434.x.

Lakra, W. and Bhonde, R., 1996. Development of primary cell culture from the caudal fin of an Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). Asian Fish Sci, 9: 52-149.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.2.12.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119011]

Leibovitz, A., 1963. The Growth and Maintenance of Tissue-Cell Cultures in Free Gas Exchange with the Atmosphere. Am J Hyg 78: 173-180. DOI:10.1093/oxfordjournals.aje.a120336.

Liu, T.M., Yu, X.M., Ye, Y.Z., Zhou, J.F., Wang, Z.W., Tong, J.G., and Wu, C.J., 2002 .Factors affecting the efficiency of somatic cell nuclear transplantation in the fish embryo, Journal Experimental Zoology, 293(7): 719–725. DOI: 10.1002/jez.10177.

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, 144: 29-37. DOI:10.1016/j.cbpb.2006.01.004.

Moritz, C. and Labbe, C., 2008. Cryopreservation of goldfish fins and optimization for field scale cryobanking. Cryobiology, 56(3): 181-188. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.02.003.

Parameswaran, V., Shukla, R., Bhonde, R.R. and Hameed, A.S.S., 2006. Splenic cell line from sea bass, *Lates calcarifer*: establishment and characterization. Aquaculture, 261: 43-53. DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.07.034.

Rathore, G., Kumar, G., Swaminathan, T., Sood, N., Singh, V., Abidi, R. and Lakra, W., 2007. Primary cell culture from fin explants of *Labeo rohita* (Ham.).Indian journal of fisheries, 54(1): 93-97.

Shima, A., Nikaido, O., Shinohara, S. and Egami, N., 1980. Continued in vitro growth of fibroblast-like cells (RBCF-1) derived from the caudal fin of the fish, *Carassius auratus* Exp. Geron, 15: 305-314. DOI: 10.1016/0531-5565(80)90035-2.

Tocher, D.R, and Dick, J.R., 1990. Polyunsaturated fatty acid metabolism in cultured fish cells: incorporation and metabolism of (n-3) and (n-6) series acids by Atlantic salmon (*Salmo salar*) cells, Fish Physiol Biochem, 8:311–319.DOI:10.1016/0305-0491(90)90344-S.

Tong, S.L., H.Z. Miao, and H. Li., 1998. Three new continuous fish cell lines of SPH, SPS and RSBF derived from sea perch (*Lateolabrax japaonicus*) and red sea bream (*Pagrosomus major*). Aquaculture, 169: 143-151.

Tung, L.C., Chen, S.N. and Kou., G.H., 1991. Three cell lines derived from spleen and kidney of black porgy *Acanthopagrus schlegeli*. Gyobyo Kenkyu, 26 (3): 109-117. DOI: 10.3147/jsfp.26.109.

Villena, A.J., 2003. Application and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. Reviews in Fish Biology Fisheries, 13: 111–140. DOI: 10.1023/A:1026304212673.

Wang, G., LaPatra, S., Zeng, L., Zhao, Z. and Lu, Y., 2003.Establishment, growth, cryopreservation and species of origin identification of three cell lines from white sturgeon,*Acipenser transmontanus*. Methods Cell Sci 25: 211-220. DOI: 10.1007/s11022-004-9120-x.

Wolf, K. and Quimby, M., 1962. Established eurythermic line of fish cells in vitro. Science 165: 6-1065.
DOI: 10.1126/science.135.3508.1065 .

Wolf, K. and Quimby, M.C., 1969. Fish cell and tissue culture. In Fish Physiology (Eds. Hoar, W.S, Randall, P.J.): 253-305. DOI:10.1016/S1546-5098(08)60115-6.

Wolf, K. and Quimby, M.C., 1976. Primary monolayer culture of fish cells initiated from minced tissues. Methods in Cell Science, 2(4): 445-448. DOI: 10.1007/BF00918338.

Yuanan, L., 1987. Establishment and Characterization of Three New Cell Lines From

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.2.12.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119011]

Zhang, D., 2013. The primary culture of mirror carp snout and caudal fin tissues and the isolation of Koi herpesvirus. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal, 49(9): 734-742. DOI: 10.1007/s11626-013-9661-x.

Zhou, G.Z., Gui, L., Li, Z., Yuan, X., and Zhang, Q., 2008. Establishment of a Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* tail fin cell line and its susceptibility to frog iridovirus. Journal of Fish Biology, 73 (8): 2058-2067. DOI:10.1111/j.1095-8649.2008.02076.x.

Zhou, J., Wang, W., Zhu, Z., Li, X., Lv, W. and Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.2.12.5]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119011]

The Primary cell culture from caudal fin tissue of Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*)

Hadifar M.[1]; Haghighi Karsidani S.[1*]; Ghasemi M.[2]

[*]haghighikarsidani@yahoo.com

1- Department of Fisheries, *Bandar Anzali Branch*, Islamic Azad University, Bandar Anzali, Iran

2 - Inland Water Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran

[Downloaded from isfj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.2.12.5]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119011]

Abstract

In the present study, the primary cell lines were derived from caudal fin explants of the Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*), using two treatments (tissue culturing without enzyme and after trypsin treatment). For this purpose, pieces of caudal fin tissue (1 millimeter cubic) were isolated from 10 healthy young fish with an average weight of 12±1 g and a mean length of 11±1cm in sterile condition then were explanted in L-15 medium (Leibovitz L-15) with fetal bovine serum (10 and 20%) and penicillin-streptomycyne at pH 6.8 and 7.2 and kept at 21 and 24 °C. From the second day, a mixture of various cell types was observed and attached to the cell culture flask, but the uniform cell layer consist of cells with heterogeneous epithelial morphology and fibroblast-like were appeared after 12 to 14 days. Subculture was performed using trypsin enzyme. In subcultures, a single cell layer consists of cells with homogeneous epithelial morphology was formed. So far, these cells have been passaged for 21 times. Results indicate the possibility of producing a permanent cell line from the fin tissue of *Rutilus frisii kutum*.

Keywords: Tissue culture, Caudal fin, *Rutilus frisii kutum*

[*]Corresponding author