بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد هفتم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۷
http://japu.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/japu.2019.6859.1221

سلول‌های بنیادی عصبی مغز تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*): تعیین درجه حرارت بهینه، کشت طولانی‌مدت و ایمنوسیتوشیمی

***حدیثه کشیری[۱]، علی شعبانی[۲]، کامران حیدری[۳]، محمدرضا ایمانپور[۲] و محسن سعیدی[۳]**

[۱]استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳]استادیار دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/٤/۲۹

چکیده

کشت سلولی مغز ماهیان دارای پتانسیل بالایی در بررسی واکنش‌های مختلف به مواد سمی، نوترینت‌ها و عوامل رشد می‌باشند. در این تحقیق، به منظور بررسی امکان تهیه کشت طولانی مدت از مغز تاس ماهی ایرانی، شناسایی سلول های بنیادی عصبی و تعیین درجه حرارت بهینه رشد سلول‌ها، بخش‌های جلویی (لوب بویایی)، میانی (لوب بینایی) و عقبی (مخچه) مغز تاس ماهی ایرانی به طور مجزا در محیط DMEM/F12 حاوی FBS ۱۵ درصد، پنی سیلین- استرپتومایسین و آمفوتریسین در انکوباتور (۲۵ درجه سانتی‌گراد، CO2 ۵ درصد) قرار داده شدند. سلول‌های به‌دست آمده غالبا دوکی شکل بودند. در بین سلول‌های کشت داده شده از بخش‌های مختلف مغز، سلول‌های بخش عقبی مغز پس از طی بیش از ۸ ماه و ۹ پاساژ همچنان به رشد و تکثیر خود ادامه می‌دهند. به منظور تعیین درجه حرارت بهینه رشد سلول‌های مغز تاس ماهی ایرانی، سلول‌ها در درجه حرارت‌های ۲۰، ۲۲، ۲۵ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و تعداد سلول ها در هر تیمار دمایی جهت ارزیابی شرایط رشد بررسی گردید. بالاترین رشد و تکثیر سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. به‌منظور حفظ ذخیره سلولی، کشت‌های به‌دست آمده در ازت مایع منجمد شدند. به‌منظور شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی، واکنش‌پذیری سلول‌های حاصل از کشت بخش عقبی مغز با مارکر آنتی نستین بررسی گردید که در این میان، ۱۱ درصد سلول‌ها واکنش مثبت نشان دادند. با توجه به پایداری بالای کشت های به‌دست آمده از ناحیه عقبی مغز، می‌توان از آن در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف همچون شناسایی ویروس، اکوتوکسکولوژی و بیان ژن استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آمفوتریسین، پاساژ، درجه حرارت بهینه، تاس ماهی ایرانی

مقدمه

آبزی پروری و به تبع آن پرورش ماهی به‌دلیل افزایش جمعیت جهان، رو به رشد می‌باشد. در این راستا، ماهیان خاویاری یکی از پر ارزش‌ترین ماهیانی هستند که در دنیا یافت می‌شوند. دریای خزر مأمن اصلی این ماهی‌ها بوده وکشورهای ایران و روسیه بزرگ‌ترین تولیدکنندگان خاویار جهان به شمار

*مسئول مکاتبه: hadiskashiri@gau.ac.ir

می‌آیند. درحال حاضر بیش از ۲۷ گونه ماهی خاویاری وجود دارد که ٦ گونهٔ آن در دریای خزر و رودخانه‌های منتهی به آن زیست نموده و بیش از ۹۰ درصد خاویار جهان را تأمین می‌نمایند. تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) یکی از گونه‌های مهم بوده که همچون سایر گونه‌های این ماهیان، در خطر انقراض نسل قرار داشته و نیاز به حفظ و مراقبت بیش از پیش دارد. به علت خطرات مختلفی که نسل این ماهیان را تهدید می‌کند، پرورش این ماهیان در تانک‌ها، استخرها، قفس‌ها و آبگیرها مورد توجه قرار گرفته است (خباز و همکاران، ۱۳۸۷). در این خصوص، یکی از اهداف مهم، محدود ساختن عوامل منفی تأثیرگذار بر تکثیر و پرورش ماهی (همچون بیماری‌های ویروسی و باکتریایی) می‌باشد. با این وجود ممکن است در شرایط پرورش متراکم، برخی بیماری‌های عفونی تهدیدکننده سلامت ماهیان باشد (چی و همکاران، ۲۰۰۵؛ پارامسواران و همکاران، ۲۰۰٦). در این راستا، روش‌های قابل مدیریت و ساده همچون سیستم‌های ارزیابی در شرایط آزمایشگاهی از جمله کشت‌ها یا رده‌های سلولی آماده برای انجام ارزیابی‌های دقیق و سریع ضروری به‌نظر می‌رسد. طی ٤ دهه اخیر رده‌های سلولی از بخش‌های مختلف مغز ماهیان استخوانی مختلف (همچون رده سلولی حاصل از مغز ماهیان کوبیا (*Rachycentron canadum*)، سیم دریایی (*Lates cacalifer*)، تیلاپیا *Oreochromis niloticus* و غیره) در سراسر جهان گزارش گردیده است (لاکرا و همکاران، ۲۰۱۱). انجام تحقیقات پایه و کاربردی روی بافت‌های عصبی جهت درک فرایندهای فیزیولوژیکی در گونه‌های مختلف ماهیان به ویژه گونه‌هایی با ارزش تجاری بالا همچون سیم دریایی از اهمیت بالایی برخوردار است (مولز و همکاران، ۲۰۰۷). پایداری سلول‌های تکثیر شونده مغز ماهیان، امکان تولید کشت‌های پایدار سلولی را فراهم می‌سازد (سرویلیا و همکاران، ۲۰۰۸). کشت‌های سلولی طولانی مدت ماهیان دارای کاربردهای گوناگونی همچون شناسایی ویروس‌ها، اکوتوکسیکولوژی، تنظیم و بیان ژنتیکی و همچنین تکثیر و ترمیم DNA می‌باشند (بولز و لی، ۱۹۹۱؛ بولز و همکاران، ۲۰۰۵). برای کاربردهای مذکور و همچنین سایر کاربردهای این کشت‌ها، تولید مقادیر بالایی از سلول‌های حاصل از بخش‌های مختلف گونه‌های مختلف ماهیان حایز اهمیت می‌باشد.

سلول‌های بنیادی، سلول‌هایی با دو ویژگی اساسی توانایی تقسیم و تولید سلول‌هایی با ویژگی‌های مشابه و ایجاد انواع سلول‌های تمایز یافته می‌باشند (هینچ و زوپانک، ۲۰۰٦). به‌نظر می‌رسد این سلول‌ها در اغلب بافت‌های ماهیان از جمله مغز وجود دارد (کاسلین و همکاران، ۲۰۰۸) و ماهیان توانایی رشد بالایی در مقایسه با رشد محدود پستانداران دارند که پایداری بالای نواحی تکثیر شونده را می‌توان عاملی مهم در این راستا دانست (گراندل و همکاران، ۲۰۰٦). با رشد ماهی، سلول‌های جدید در تمامی بافت‌ها از جمله بافت عصبی تولید شده و مغز به به رشد خود در دوران بلوغ نیز ادامه می‌دهد (هینچ و زوپانک، ۲۰۰٦). کشت‌های سلولی مغز پستانداران طی دهه‌های گذشته در بررسی مراحل تکاملی مغز و نوروژنزیز (نوهاوس و فدوروف، ۱۹۹٤؛ یانگ و همکاران، ۱۹۹۳)، نوروتوکسیکولوژی (ورونسی، ۱۹۹۲؛ تانگ و همکاران، ۱۹۹٦)، جداسازی سلول‌های بنیادی (گرج و همکاران، ۲۰۰۲)، واکنش به فاکتورهای رشد (پیچفورد و همکاران، ۱۹۹۵) و ارزیابی سیستم‌های تحویل دارو (ریزک و همکاران، ۲۰۰٤) مورد استفاده قرار گرفته‌اند. علی رغم کشت‌های سلولی حاصل از مغز پستانداران، تولید کشت‌های سلولی مغز ماهیان و به کارگیری آن در مطالعات نوروبیولوژیکی بسیار محدود بوده و کاربرد آن‌ها بیشتر در مطالعات

ویروس‌شناسی (همچون بررسی اثر ویروس IPN، جداسازی آلفاویروس-۱ و غیره) بوده است (سرویلیا و همکاران، ۲۰۰۸). لذا رده‌های سلول عصبی بسیار کمی تا به امروز گزارش شده است. در این خصوص می‌توان به تحقیق انجام شده توسط سرویلیا و همکاران (۲۰۰۸) اشاره داشت که طی آن محققین توانستند سلول‌های زنده از بخش‌های مختلف مغز ماهی استخوانی سیم دریایی (*Dicentrarchus labrax*) را در شرایط آزمایشگاهی کشت دهند که در میان کشت‌های حاصل از بخش‌های مختلف مغز این ماهی، کشت سلولی حاصل از بخش مخچه و تگمنتوم مغز را به مدت طولانی (۲٤ پاساژ) حفظ نموده و آن را به‌عنوان یک رده سلولی پایدار معرفی نمودند. تولید رده سلولی حاصل از مغز ماهی بیمار *Epinephelus awoara* (لای و همکاران، ۲۰۰۳) و رده سلولی حاصل از بافت مغز *L. calcalifer* (چی و همکاران، ۲۰۰۵)) برای بررسی نوداویروس‌های در حال رشد و همچنین رده سلولی حاصل از مغز *Epinephelus coicoides* (ون و همکاران، ۲۰۰۸) برای بررسی ویروس های اثر گذار بر سیستم عصبی نیز نمونه‌هایی از این مورد بوده‌اند.

به‌طور کلی، تولید رده‌ها و کشت‌های طولانی مدت سلولی از ماهیان مختلف از اهمیت بالایی در بررسی‌های پایه و کاربردی می‌باشد. کشت سلول‌های عصبی حاصل از مغز ماهیان که دارای پایداری بالا باشند می‌تواند در بررسی‌های مربوط به ترمیم عصبی قابلیت بالایی داشته باشد. همچنین این سلول‌ها دارای پتانسیل بالقوه‌ای در مطالعات مربوط به نوروتوکسین‌ها، تغییرات سلول‌های مغز با افزایش سن، مطالعات نوروبیولوژیکی و مکانیزم‌های کنترل کتتده فرآیندهای زیستی که مغز نقش عمده‌ای در این راستا ایفا می‌کند، می‌باشند (سرویلیا و همکاران، ۲۰۰۸). متأسفانه علی‌رغم اهمیت تولید کشت سلولی از ماهیان و کاربرد آن در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف، بررسی‌های محدودی در خصوص امکان کشت سلول‌های بنیادی عصبی مغز و تعیین شرایط بهینه کشت صورت گرفته و رده‌ها و کشت‌های سلولی طولانی مدت کمی گزارش شده که همگی محدود به ماهیان استخوانی (همچون تهیه کشت طولانی مدت از مغز ماهی *Dicentrarchus labrax* (سرویلیا و همکاران، ۲۰۰۸) و جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی از نواحی مختلف مغز *Apteronotus leptorhinchus* (هینچ و زوپانک، ۲۰۰٦) بوده است. در این راستا، هیچ‌گونه اطلاعاتی در خصوص امکان کشت طولانی مدت و تعیین شرایط بهینه‌رشد سلول‌های مغز ماهیان غضروفی- استخوانی وجود ندارد. لذا با در نظر گرفتن اهمیت ایجاد کشت‌های پایدار و همچنین اهمیت بالای تاس‌ماهیان، در تحقیق حاضر امکان تهیه کشت از بخش‌های جلویی، میانی و عقبی مغز تاس ماهی ایرانی، میزان پایداری و درجه حرارت بهینه رشد سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق می تواند زمینه مناسبی برای ورود و گسترش علوم سلولی در رشته شیلات فراهم آورد.

مواد و روش کار

نگهداری تاس ماهیان ایرانی: تاس ماهیان ایرانی (٤٥ عدد) از کارگاه شهید مرجانی گرگان (۱۳۹۰) با قرار گرفتن در کیسه‌های پلاستیکی حاوی اکسیژن، انتقال و در تانک‌های ۲۰۰۰ و ٤۰۰ لیتری مرکز آبزی پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (دما: ^{0}C ۱±۲۳، اکسیژن: ٦/٥ و پی اچ تقریبا ۸) طی مدت تقریبا ۲ سال جهت انجام آزمایشات نگهداری شدند. هوادهی به‌طور دائم از طریق سنگ‌های هوای موجود در هر تانک صورت گرفت و آب هر تانک از طریق سیفون کردن به‌صورت روزانه تعویض گردید.

ماهیان یک بار در روز با غذای بیومار تغذیه شدند. وزن ماهیان مورد استفاده برای انجام مراحل مختلف کشت و تعیین دمای بهینه به‌ترتیب، ٤٠٠-٣٥٠ و ٢٥٠ گرم بود.

جداسازی و شستشوی بافت مغز: به‌منظور جمع‌آوری نمونه‌های بافت مغز، پس از بی‌هوشی (پودر گل میخک به میزان ۰/۵گرم در ۱ لیتر آب) تاس ماهیان ایرانی (۳ ماهی برای هر بار بررسی) سر آن‌ها از بدن جدا گردید. پس از جدا نمودن مغز از جمجمه، بخش‌های جلویی، میانی و عقبی مغز شناسایی (بانی و همکاران، ۱۳۸۷) و جداسازی شدند. نمونه‌های حاصله به‌طور مجزا و تحت شرایط استریل، در میکروتیوب‌های حاوی محلول نمکی متعادل هنکز (Bio idea) دو بار شستشو داده شدند. به منظور همگن ساختن بافت‌ها، نمونه های بافتی شسته شده پس از انتقال به لوله‌های فالکون استریل حاوی محلول نمکی متعادل هنکز، پنی سیلین- استرپتومایسین (P-E) (Gibco) و آمفوتریسین (AP) (Gibco) (۲×P-E/AP) با استفاده از پیپت پاستور به روش مکانیکی هموژنیزه شدند (سرویلیا و همکاران، ۲۰۰۸).

پس از افزودن تریپسین-EDTA (Gibco) (۵ دقیقه) جهت هضم آنزیمی، سلول‌ها و قطعات بافتی به‌دست آمده در محیط کشت حاوی DMEM/F12 (Bio idea) غنی شده با سرم FBS (۱۵ درصد) برای تحریک رشد، پنی سیلین- استرپتومایسین و آمفوتریسین (۲×P-E/AP) جهت استریل ساختن محیط کشت قرار داده شدند. سپس به منظور جداسازی نمونه، سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰rpm به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از دور ریختن مایع رویی، سلول‌ها با افزودن محیط کشت DMEM/F12 و پیپتینگ با پیپت پاستور استریل به حالت تعلیق در آمدند (سرویلیا و همکاران، ۲۰۰۸).

کشت سلولی اولیه: سوپ سلولی حاصل از بخش‌های مختلف مغز به‌طور جداگانه در فلاسک‌های کشت استریل حاوی محیط کشت DMEM/F12، سرم FBS (۱۵ درصد) و ۲×P-E/AP در انکوباتور (درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد با CO2 ۵ درصد) قرار گرفتند. محیط کشت فلاسک‌ها هر ۳ تا ٤ روز یک بار تخلیه و با محیط جدید جایگزین می‌شدند. سلول ها و قطعات بافتی که به کف فلاسک‌ها نچسبیده بودند با تعویض محیط کشت و شستشو با PBS از محیط خارج شدند (هینچ و زوپانک، ۲۰۰٦). شایان ذکر است سلول های کشت داده شده هر بار هنگام تعویض محیط کشت، با استفاده از میکروسکوپ اینورت (بزرگنمایی X ۱۰ و X ٤٠) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

پاساژ سلول‌های متلاقی: پس از متلاقی شدن سلول‌ها و پر نمودن کف فلاسک‌های کشت، جهت پاساژ سلولی، سلول‌ها با استفاده از تریپسین-EDTA از کف فلاسک‌ها کنده شده و پس از افزودن محیط رشد DMEM/F12 در دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از تعلیق مجدد پلت سلولی با استفاده از DMEM/F12 و پیپتینگ، محتویات لوله‌های فالکون به فلاسک‌های حاوی محیط رشد مربوطه انتقال و در انکوباتور قرار داده شدند (سرویلیا و همکاران، ۲۰۰۸).

تعیین درجه حرارت بهینه: به‌منظور تعیین درجه حرارت بهینه، سلول‌های کشت داده شده از بخش مخچه مغز ماهی تاس ماهی در فلاسک‌های کشت (DMEM/F12 و FBS ۱۵ درصد) ($۱۰^{٦} \times ۱$ سلول در هر فلاسک ۱۲ cm^2) در درجه حرارت‌های ۲۰، ۲۲، ۲۵ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (هینچ و زوپانک، ۲۰۰٦؛ گرونو و همکاران، ۲۰۱۱). برای هر درجه حرارت مورد بررسی، سه فلاسک کشت

(سه تکرار برای هر تیمار دمایی) آماده‌سازی گردید. پس از ۷۲ ساعت سلول‌های چسبیده با افزودن تریپسین-EDTA جداسازی شدند. فعالیت آنزیمی با اضافه نمودن DMEM/F12 و FBS ۱۵ درصد متوقف و سلول‌ها با استفاده از لام هموسیتومتر در روزهای ۰، ۳، ٦ و ۹ شمارش شدند (گرونو و همکاران، ۲۰۱۱).

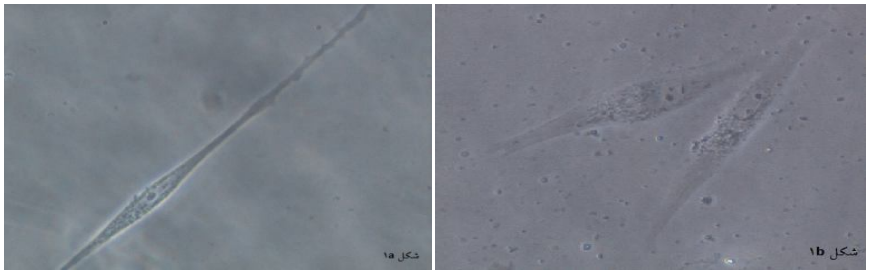
انجماد سلول‌ها: به‌منظور انجماد و نگهداری کشت‌های به‌دست آمده، از روش مورد استفاده توسط سرویلیا و همکاران با اندکی تغییر استفاده شد. در این راستا، سلول‌ها پس از جدا شدن از کف فلاسک با استفاده از تریپسین-EDTA و افزودن سرم FBS سانتریفیوژ شدند. از محیط حاوی FBS ۹۰ درصد و دی متیل سولفوکساید ۱۰ درصد به عنوان محیط انجماد استفاده گردید. پس از انتقال محتویات به درون کرایوویال‌های استریل، سلول‌ها ابتدا به مدت ۳ ساعت در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتی‌گراد، سپس به مدت ٢٤ ساعت در درجه حرارت ۸۰- درجه سانتی‌گراد و در نهایت در تانک حاوی ازت مایع قرار داده شدند.

انجمادزدایی: محتویات داخل کرایوویال‌ها جهت انجمادزدایی با PBS شستشو داده شده و سپس سانتریفیوژ گشتند. پس از تعلیق مجدد پلت سلولی با استفاده از محیط رشد مربوطه و پیپتینگ، سوپ سلولی به داخل فلاسک‌های کشت استریل منتقل و بازمانی سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو (Bio idea) ارزیابی گردید (سرویلیا و همکاران، ۲۰۰۸).

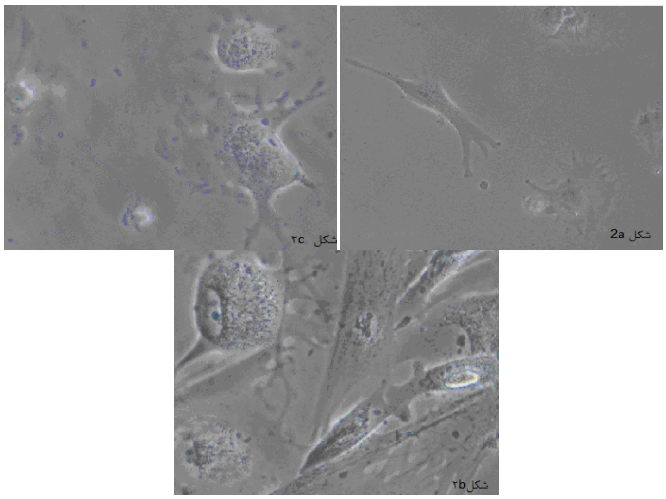
شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی: جهت شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی مغز ماهی تاس ماهی ایرانی، از روش ایمنوسیتوشیمیایی استفاده گردید. بدین منظور، سلول‌های حاصل از مخچه بر لامل‌های استریل پوشیده شده با poly-l-lysin قرار داده شدند. پس از فیکس نمودن سلول‌ها با پارافرمالدهید از PBS حاوی تریتون برای شستشو استفاده شد. در این تحقیق از آنتی بادی ضد نستین که به طور معمول جهت شناسایی سلول های بنیادی عصبی کاربرد دارد به عنوان مارکر انتخابی استفاده گردید (الکساندر و همکاران، ۲۰۰٤). بدین منظور آنتی نستین حاصل از موش در PBS حاوی حاوی تریتون رقیق و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. از آنتی بادی خرگوش ضد موش همراه با FITC به‌عنوان آنتی بادی ثانویه استفاده گردید. در نهایت، واکنش پذیری سلول‌ها با مارکر مربوطه با استفاده از میکروسکوپ اینورت فلورسنت بررسی گردید (سرویلیا و همکاران، ۲۰۰۸).

نتایج و بحث

بررسی‌ها نشان داده که ایجاد کشت‌های طولانی مدت سلولی از ماهیان استخوانی نسبت به پستانداران ساده‌تر و سریع‌تر می‌باشد (سرویلیا و همکاران، ۲۰۰۸). در این تحقیق نیز مشخص گردید که ایجاد کشت‌های طولانی مدت از مغز تاس ماهی ایرانی به‌عنوان گونه مهمی از ماهیان غضروفی- استخوانی به‌دلیل توانایی بالای تکثیر کشت‌های حاصله نسبت به پستانداران ساده‌تر و سریع‌تر می‌باشد. در بررسی حاضر، مشخص گردید که سلول‌های بخش‌های مختلف مغز ماهی تاس ماهی ایرانی را می‌توان به خوبی همچون گونه‌های ماهیان استخوانی گزارش شده تا به امروز، در شرایط آزمایشگاهی کشت داد. از نظر مورفولوژی، سلول‌های چسبیده به کف فلاسک‌های کشت غالبا دوکی شکل بودند (شکل ۱a,b). همچنین بین سلول‌های تکثیر شونده حاصل از بخش‌های مختلف مغز نیز تفاوت مورفولوژیکی خاصی مشاهده نشد. با گذشت زمان برخی سلول‌های چسبیده به کف، از حالت کشیده و دوکی شکل به سمت شکل سلول‌های عصبی و حالت چند وجهی تمایل پیدا کردند (شکل ۲a, b, c).



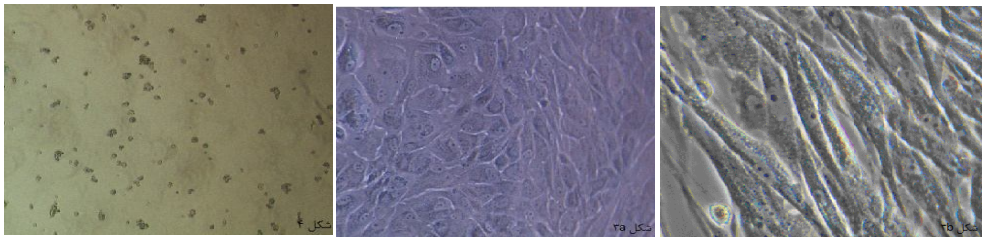
شکل ۱- سلول‌های کشت داده شده دوکی شکل و چسبنده مغز تاس ماهی ایرانی دو روز پس از کشت اولیه.



شکل (a-c) ۲- سلول‌های کشت داده شده از مغز تاس ماهی ایرانی، برخی سلول‌ها با گذشت زمان به سمت سلول‌های عصبی شکل تغییر یافتند.

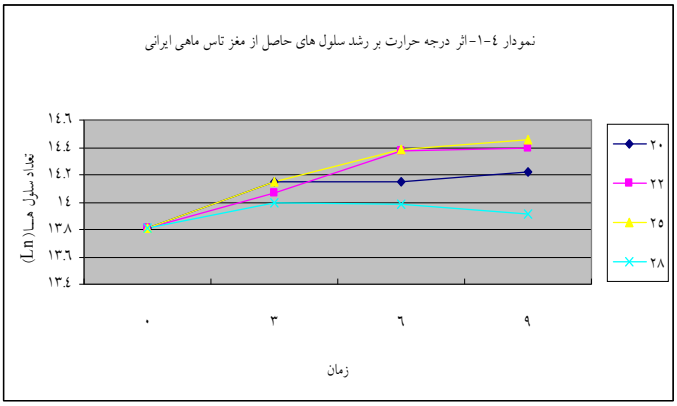
سلول‌ها به رشد و تکثیر خود ادامه دادند تا پس از گذشت ۲ تا ۳ هفته از آغاز کشت اولیه، متلاقی و کف فلاسک‌های کشت را پر کرده (شکل ۳a, b) و آماده اولین پاساژ سلولی شدند (شکل ٤). شایان ذکر است اولین کشت‌های سلولی تهیه شده در تحقیق حاضر به‌دلیل آلودگی ایجاد شده طی آزمایشات پس از مدت ۸ هفته از دست رفتند اما در دومین تلاش صورت گرفته نتیجه خوبی در این راستا به دست آمد. کشت‌های سلولی حاصل از نواحی جلویی و میانی مغز تاس ماهی ایرانی، به‌ترتیب تا مدت حدودا ۲٦ و ۲٤ هفته طی ۷ و ٦ پاساژ زنده مانده و رشد کردند اما پس از طی این مدت سلول‌های مذکور ضعیف شده و در نهایت از بین رفتند. این در حالی بود که کشت سلولی حاصل از بخش عقبی (مخچه) مغز رشد متداومی داشته و با گذشت بیش از ۸ ماه از زمان شروع کشت و طی ۹ پاساژ زنده ماندند. سلول های مذکور قابلیت رشد و تکثیر بالایی نشان دادند به‌طوری که می توان این سلول‌ها را برای طولانی مدت پاساژ داده و حفظ نمود و از آن‌ها در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف استفاده نمود. این موضوع می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که مغز تاس ماهی ایرانی به‌عنوان یک ماهی غضروفی- استخوانی دارای ظرفیت تکثیر شوندگی بالایی می‌باشد. قابلیت رشد و تکثیر بالای سلول‌های کشت داده شده در این بررسی را می‌توان به فعالیت بالای تلومراز در ماهیان نسبت داد. در واقع، در سلول‌های بنیادی آنزیمی به نام تلومراز فعالیت می‌کند که مانع کوتاه شدن طول DNA تلومری پس از هر تقسیم می‌شود. بولز و همکاران

(۲۰۰۵) موضوع فعالیت بالای تلومرازی در ماهیان را مطرح نموده و عنوان داشتند که بررسی این نوع فعالیت آنزیمی به‌منظور درک هر چه بهتر پایداری و بازمانی بالای رده‌های سلولی می‌تواند موضوع جالبی برای تحقیقات آتی باشد. در بررسی که روی *Apteronotus leptorhinchus* صورت گرفت، سلول‌های بنیادی حقیقی از بخش‌های کورپوس سربلی، والوولا سربلی و تلن سفالن جداسازی گردید و ویژگی‌های آن در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت (هینچ و زوپانک، ۲۰۰۶).



شکل (a,b) ۳- سلول‌های متلاقی شده. سلول‌ها به کانفلوئنسی رسیده و کف فلاسک کشت را پر نموده‌اند (a: بزرگنمایی 10X، b: بزرگنمایی 40X). شکل ٤- سلول‌های مغز تاس ماهی ایرانی طی اولین پاساژ، سلول‌ها در اثر عمل آنزیم صورت معلق در آمده‌اند.

رشد سلول‌های مغزی تاس ماهی ایرانی همچون سایر سلول‌های دیگر در کشت به عوامل مختلفی از جمله درجه حرارت، مواد غذایی و غیره بستگی دارد. نتایج بیان گر آن بود که اگرچه سلول‌های کشت داده شده در دماهای ۲۰ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد قادر به رشد بودند اما رشد آهسته‌تری نسبت به سایر دماهای مورد بررسی نشان دادند به‌طوری که سلول‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد که از درجه حرارت مطلوب برای زندگی تاس ماهی ایرانی بالاتر است، پایین‌ترین رشد را داشتند (نمودار ۱).

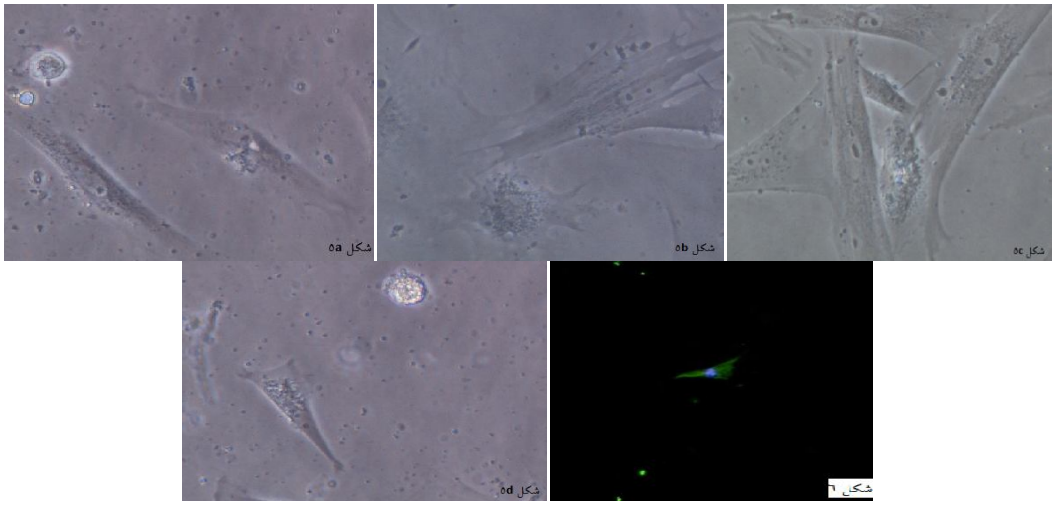


به‌نظر می‌رسد دماهای بالاتر از این حد منجر به مرگ سلول‌ها گشته و سلول‌های مغز تاس ماهی ایرانی در دماهای پایین‌تر نسبت به دماهای بالاتر از درجه حرارت‌های بهینه مقاوم‌تر می‌باشند. بررسی‌ها نشان داده که رشد بهینه سلول‌های ماهیان استخوانی در شرایط آزمایشگاهی در دماهای کمی بالاتر از دمای مطلوب آن‌ها در طبیعت رخ می‌دهد (اوت، ۲۰۰٤؛ بولز و همکاران، ۲۰۰۵). با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، به‌نظر می‌رسد که درجه حرارت‌های بین ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد (به‌ویژه

درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد) برای رشد سلول‌های مغز تاس ماهی ایرانی مناسب باشد. این در حالیست که درجه حرارت بهینه این ماهیان در طبیعت (۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد) کمی پایین‌تر از درجه حرارت به‌دست آمده در این بررسی می‌باشد. در تحقیقی که توسط گرونو و همکاران (۲۰۱۱) در راستای تعیین درجه حرارت بهینه برای کشت سلولی حاصل از لارو *Acipenser oxyrinchus* انجام پذیرفت، سلول‌های کشت داده شده در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد بالاترین رشد را نشان دادند در حالی که این ماهی به طور معمول در دماهای بین ۱۸ و ۲۳ درجه سانتی‌گراد زندگی می‌کند (گرونو و همکاران، ۲۰۱۱). در تحقیق دیگری توسط سرویلیا و همکاران (۲۰۰۸) درجه حرارت بهینه برای کشت سلول های بنیادی عصبی مغز سیم دریایی (*Dicentrarchus labrax*) در محدوده ١٦ تا ٢٢ درجه سانتی گراد مشابه با درجه حرارت بهینه برای رشد این ماهی استخوانی در طبیعت به‌دست آمد.

در بررسی‌های پیشین در خصوص ماهیان استخوانی بیان شده بود که مغز این ماهیان به ویژه بخش مخچه آن‌ها دارای ظرفیت تکثیر شوندگی بالایی می‌باشد (زوپانک و اوت، ۱۹۹۹). در تحقیق حاضر نیز کشت سلولی مربوط به بخش عقبی مغز تاس ماهی ایرانی بالاترین پایداری را نسبت به سایر نواحی نشان داد. در تحقیق صورت گرفته روی کفشک ماهی و سیم دریایی نیز تعداد و پایداری بالای سلول‌های تکثیر شونده در ناحیه مخچه مغز این ماهیان استخوانی تأیید شده است (سرویلیا و همکاران، ۲۰۰۸). محققین بیان نمودند که احتمالا سلول‌های بنیادی عصبی از نواحی تکثیر شونده در مغز ماهیان منشا می‌گیرند (زوپانک و هورکه، ۱۹۹۵). در واقع در مغز به‌ویژه بخش مخچه در ماهیان استخوانی سلول‌های بنیادی وجود دارند که مسئول نوروژنزیز در این ماهیان می‌باشند (زوپانک و کلینت، ۲۰۰۳). در این بررسی کشت سلولی به‌دست آمده قابلیت بالایی در تکثیر نشان داد لذا می‌توان بیان داشت که احتمالا سلول‌های بنیادی در کشت حضور دارند. برای تأیید این موضوع، از آنتی بادی ضد نستین به‌عنوان یک مارکر سلول‌های بنیادی عصبی استفاده گردید. متاسفانه به دلیل این که آنتی بادی اختصاصی برای این ماهیان وجود ندارد، در بررسی حاضر از آنتی بادی حاصل از پستانداران (آنتی نستین به دست آمده از موش) برای شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی استفاده گردید. در واقع تولید و توسعه آنتی بادی های اختصاصی برای این منظور مهم به نظر می‌رسد زیرا معمولا واکنش‌پذیری آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین‌های پستانداران پایین می‌باشد (گرونو و همکاران، ۲۰۱۱). در این تحقیق، بررسی ایمنوسیتوشیمیایی با استفاده از آنتی‌بادی ضد نستین واکنش مثبت برخی سلول‌ها با آنتی‌بادی مذکور را نشان داد به‌طوری که ۱۱ درصد سلول‌های موجود در کشت با آنتی‌بادی ضد نستین واکنش نشان دادند که نشان‌دهنده وجود سلول‌های بنیادی می‌باشد. یانگ و همکاران (۱۹۹۳) بیان آنتی‌بادی ضد نستین را نشان‌دهنده پتانسیل بالقوه سلول‌های بیان کننده این آنتی‌بادی به‌عنوان سلول‌های بنیادی عصبی عصبی عنوان داشتند. بنابراین با توجه به بیان آنتی‌بادی ضد نستین توسط برخی سلول‌های موجود در کشت حاصل از بخش عقبی مغز، وجود سلول‌های بنیادی عصبی در بین سلول‌های به‌دست آمده از مغز تاس ماهی ایرانی را می‌توان تأیید نمود. در تحقیقات پیشین مشخص شده که قدرت چسبندگی به سوبستراها در تمایز سلول‌های عصبی در پستانداران تأثیرگذار می‌باشد (ساها و همکاران، ۲۰۰۸). در تحقیق صورت گرفته توسط هینچ و زوپانک (۲۰۰٦) نیز این موضوع در ماهیان استخوانی مشاهده گردید. در این راستا

می‌توان در آینده بررسی‌هایی در خصوص تمایز سلول‌های کشت به‌دست آمده و عوامل تأثیرگذار بر آن انجام داد زیرا امکان تحریک یا عدم تحریک نورون‌های بالغ جهت تمایز نامشخص می‌باشد.



شکل (a-d) ۵- سلول‌های به‌دست آمده از مغز تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در درجه حرارت‌های ۲۰ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد (روز نهم)؛ (a): سلول‌های رشد یافته در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد، (b): سلول‌های رشد یافته در درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی‌گراد، (c): سلول‌های رشد یافته در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد، (d) سلول‌های رشد یافته در درجه حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد. شکل ٦- واکنش مثبت سلول‌های حاصل از بخش عقبی مغز با آنتی نستین.

نتیجه‌گیری کلی

در تحقیق حاضر درجه حرارت مطلوب برای رشد بهینه سلول‌های مغز تاس ماهی ایرانی در شرایط آزمایشگاهی ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید. با در نظر گرفتن دوام و پایداری کشت‌های سلولی حاصل از مغز تاس ماهی ایرانی می‌توان بیان داشت که مغز این ماهیان به ویژه بخش مخچه آن‌ها دارای ظرفیت تکثیر شوندگی بالایی می‌باشد. به نظر می‌رسد که بین این ماهیان و ماهیان استخوانی از نظر ظرفیت بالای تکثیر شوندگی مغز شباهت‌های زیادی وجود داشته باشد. وجود سلول‌های بنیادی عصبی نیز در کشت سلولی حاصل از مخچه مغز تاس ماهی ایرانی با به کارگیری آنتی‌بادی ضد نستین تأیید گردید. با توجه به دوام بالای سلول‌های کشت مربوطه می‌توان با انجام بررسی‌های بیشتر این ذخیره سلولی ارزشمند را به‌عنوان یک رده سلولی پایدار ثبت نموده و به کاربردهای گوناگونی در زمینه‌های تحقیقات مختلف رسانید.

منابع

1. Alexander, K., Yang, H.S., and Hinds, P.W. 2004. Cellular senescence requires CDK5 repression of Rac1 activity. Molecular Cell Biology, 24: 2808–2819.
2. Bani, A., Zadbagher, F., and Jadidi, N. 2008. Brain morphology in *Acipenser stellatus* and *Acipenser persicus* brain morphology, in persian, Iranian Journal of Biology, 21(2): 341-350.
3. Bols, N.C., Dayeh, V.R., Lee, L.E.J., and Schirmer, K. 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of

fish, Piscine cell lines in environmental toxicology, Enviromental toxicology, 6: 43-84.
4. Bols, N.C., and Lee, L.E.J. 1991. Technology and uses of cell cultures from the tissues and organs of bony fish, Cyto technology, 6: 163-187.
5. Chi, S.C., Wu, Y.C., and Cheng, T.M. 2005. Persistent infection of betanodavirus in a novel cell line derived from the brain tissue of barramundi *Lates calcalifer*, Disease of aquatic organisms, 65(2): 91-98.
6. Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., and Brand, M. 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate, Development Biology, 295(1): 263–277.
7. Gregg, C.T., Chojnacki, A.K., and Weiss, S. 2002. Radial glial cells as neural precursors: the next generation, Journal of neuroscience research, 69(6): 708-713.
8. Grunow, B., Noglick, C., Kruse, C., and Gebert, M. 2011. Isolation of cells from Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus* and optimization of culture conditions, Aquatic Biology, 14: 67-75.
9. Hinsch, K., and Zupanc, G.K. 2006. Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain, Journal of Neuroscience Methods, 158: 75–88.
10. Kaslin, J., Ganz, J., and Brand, M. 2008. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain, Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biology Science, 363(1489): 101–122.
11. Khabbaz, M., Shirazi, S.H., Eric Aghaji, H., and Khabaz, M. 2008. Investigation of economic importance of Persian sturgeon and it's conservations strategies in Iranian waters, In Persian, 11th Iraniam veterinary congress, Tehran, Iranian veterinary society, http://www.civilica.com/Paper-THVC15-THVC15_249.html.
12. 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): 1-20.
13. Moles, G., Carrillo, M., Mañanos, E., Mylonas C.C., and Zanuy, S. 2007. Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*), Gene Comparative Endocrinology, 150(1): 75–86.
14. Neuhaus, J., and Fedoroff, S. 1994. Development of microglia in mouse neopallial cell cultures, Glia, 11(1): 11-17.
15. Ott, T. 2004. Tissue culture of fish cell lines; National wildlife fish health survey laboratory procedures and protocols, 2th edition, US fish and wildlife service: Washington DC, p: 1-16.
16. Parameswaran, V., Shukla, R., Bhonde, R.R., and Sahul Hameed, A.S. 2006. Splenic cell line from sea bass, Lates calcalifer: establishment and characterization, Aquaculture, 261: 43-53.
17. Pitchford, S., De Moor, K., and Glaeser, B.S. 1995. Nerve growth factor stimulates rapid metabolic responses in PC12 cells, American Journal of physiology, 268: 936-943.
18. Saha, K., Keung, A., Irwin, E., Li, Y., Little, L., Schaffer, D., and Healy, K.E. 2008. Substrate modulus directs neural stem cell behavior, Biophysics Journal. 95: 4426-4438.
19. Rizk, T., Montero-Menei, C., Jollivet, C., Benoit, J.P., and Menei, P. 2004. Pitfalls in the detection of lipid vectors in neural cell culture and in brain tissue, Journal of biomedical materials research, 68(2): 360-364.
20. Servilia, A., Bufalinoa, M.R., Nishikawac, R., Sanchez de Melod, I., Munoz-Cuetob, J., and Lea, L. 2008. Establishment of long term cultures of neural stem cells from adult sea bass, *Dicentrarchus labrax*, Comparative biochemistry and physiology Part A: Molecular and integrative physiology, 62(3): 32-36.
21. Tang, H.W., Yan, H.L., Hu, X.H., Liang, Y.X., and Shen, X.Y. 1996. Lead

cytotoxicity in primary cultured rat astrocytes and Schwann cells, Journal of applied toxicology, 16(3): 187-196.
22. Veronesi, B. 1992. In vitro screening batteries for neurotoxicants, Neurotoxicology, 13(1): 185-195.
23. Wen, C.M., Cheng, Y.H., Huang, Y.F., and Wang, C.S. 2008. Isolation and characterization of a neural progenitor cell line from tilapia brain, Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and integrative Physiology, 149(2): 167-180.
24. Yang, H.Y., Lieska, N., Shao, D., Kriho, V., and Pappas, G.D. 1993. Immunotyping of radial glia and their glia derivatives during development of the rat spinal cord, Journal of neurocytology, 22(7): 558-571.
25. Zupanc, G.K., and Clint, S.C. 2003. Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish, Glia, 43(1): 77–86.
26. Zupanc, G.K., and Horschke, I. 1995. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study, Journal of Comparative Neurology, 353(2): 213–233.
27. Zupanc, G.K., and Ott, R. 1999. Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced, Experimental Neurology, 160(1): 78–87.