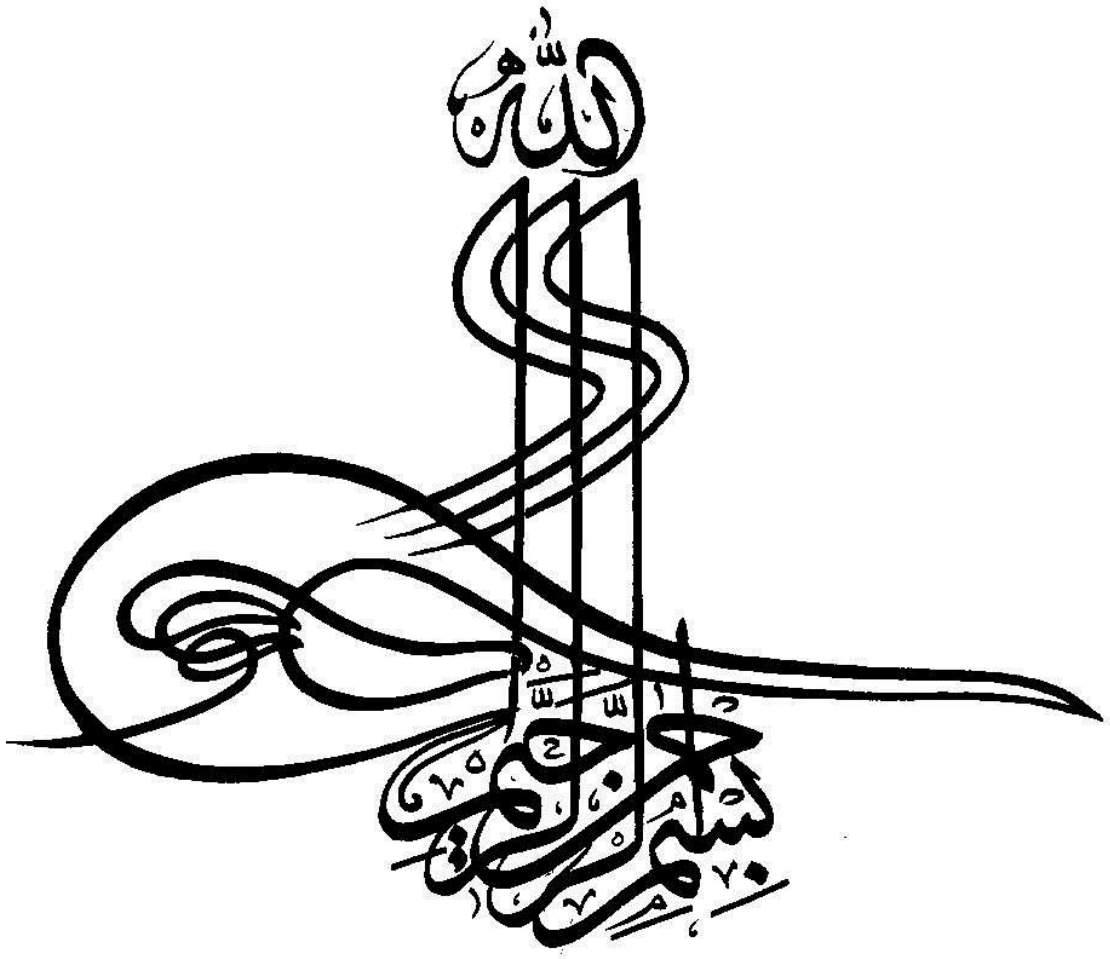

الله
بسم الله الرحمن الرحيم

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

نام و نام خانوادگی : کاوه نوروزی

تاریخ و امضا :

۹۱/۱۱/۱۵

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً «به طور کتبی به» دفتر نشر آثار علمی «دانشگاه اطلاع دهید.».

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کنید:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته مهندسی منابع طبیعی- تکثیر وپرورش آبزیان است که در سال ۱۳۹۱ در دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی اساتید محترم جناب آقای دکتر محمدرضا کلباسی و سرکار خانم دکتر پروانه فرزانه از آن دفاع شده است. ».

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به « دفتر نشر آثار علمی » دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ٤: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتاب‌های عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ٦: کاوه نوروزی دانشجوی رشته مهندسی منابع طبیعی-شیلات مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی :کاوه نوروزی

تاریخ و امضا :

۹۱/۱۱/۱۵

دانشکده علوم دریایی
گروه تکثیر و پرورش آبزیان
پایان نامه کارشناسی ارشد

تولید، نگهداری، ارزیابی صفات و ذخیره کشت سلولی اولیه از ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

کاوه نوروزی

اساتید راهنما:

دکتر محمدرضا کلباسی

دکتر پروانه فرزانه

زمستان ۱۳۹۱

دانشکده منابع طبیعی

باسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه

بدین وسیله گواهی می شود آقای **کاوه نوروزی** دانشجوی رشته **شیلات گرایش تکثیر و پرورش آبزیان** در تاریخ **۱۳۹۱/۱۱/۱۵** از پایان نامه ٦ واحدی خود با عنوان: **تولید، نگهداری، ارزیابی صفات و ذخیره کشت سلولی اولیه از ماهی آزاد دریای خزر** (*Salmo trutta caspius*) ،دفاع کرده است. اعضای هیأت داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا بررسی کرده و پذیرش آنرا برای دریافت درجه کارشناسی ارشد تائید می‌نمایند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
استاد راهنمای اول	دکتر محمدرضا کلباسی	دانشیار	
استاد راهنمای دوم	دکتر پروانه فرزانه	استادیار	
استاد ناظر (داخلی)	دکتر صابر خدابنده	دانشیار	
استاد ناظر (خارجی)	دکتر محدث قاسمی	استادیار	
نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر صابر خدابنده	دانشیار	

تقدیم به پدرم

که با نگاهش درس زندگی، با دستانش استقامت و

با رفتارش آزاد مرد بودن را به من آموخت.

تقدیم به مادرم

که قلبش وسعت بی انتهای صبر و مهربانی است،

و چشم های پرفروغش سرچشمه احساس و گذشت است.

تقدیر و تشکر

به حکم ادب و احترام بر خود لازم می دانم تا از کسانی که مرا در طی مراحل مختلف این تحقیق یاری نموده اند کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم.

از زحمات بی دریغ جناب آقای **دکتر محمدرضا کلباسی و خانم دکتر پروانه فرزانه** که راهنمایی این پایان نامه را پذیرا بودند و با بصیرت علمی، آگاهی و دقت نظر همواره در طول این تحقیق یاری ام نمودند، کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

از جناب آقای دکتر **سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی، رئیس مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران** به خاطر همکاری و مساعدت زیاد، قدردانی می نمایم. همچنین از آقای مهندس **احمد نسیمیان، خانم ها مریم فرقدان، مهرناز ایزدپناه، سپیده آشوری، شیوا محمدی، زهرا مرادمند و آقای محمد سلیمی و ناصر فرزانه** که در مراحل مختلف با کمک شان انجام این پایان نامه را ممکن کردند، تشکر می نمایم.

از آقایان دکتر **صابر خدابنده و محدث قاسمی**، اساتید محترم ناظر پایان نامه تشکر می نمایم.

از دوستان خوبم آقایان **مهدی ال بوقیله، یامین پوریوسف، آرام شاهی، محسن بهرامی**، **حمید سالاری** به خاطر کمک های بسیار زیادشان کمال تشکر و قدردانی را دارم.

با توجه به انجام طرح مشترک دانشگاه تربیت مدرس و مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بخشی از حمایت مالی این پایان نامه بر مبنای قرارداد شماره ---- ------ مورخ ---------- توسط مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران صورت گرفته است.

چکیده

امروزه کشت سلول ابزار بسیار مفیدی جهت پاسخ به بسیاری از سوالات در زمینه‌ی بیولوژی، ویروس‌شناسی، مطالعات سم‌شناسی و انتقال ژن محسوب می‌شود و کاربرد رده‌های سلولی روز به روز در حال افزایش است.در این بررسی امکان تولید کشت اولیه از باله‌های مخرجی، پشتی، سینه‌ای و دمی ماهی آزاد دریای خزر *(Salmo trutta caspius)* به سه روش جداسازی آنزیمی، کاشت بافت و کاشت بافت بعد از تیمار با آنزیم تریپسین مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تاثیر استفاده از سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به تنهایی و در ترکیب با سرم جنین گوساله جهت رشد و چسبندگی بهتر سلول‌های ماهی آزاد مورد ارزیابی قرار گرفت و از شاخص سیتوژنتیک جهت سلامت سلول‌ها در پاساژهای متوالی استفاده شد. نتایج نهایی نشان داد که بهترین باله به منظور تولید رده سلولی، باله‌ی سینه‌ای و بهترین روش کاشت بافت، کاشت بافت بعد از تیمار با آنزیم تریپسین است. در مقایسه کلی بین روش‌های تولید کشت اولیه، روش جداسازی آنزیمی توسط آنزیم تریپسین بیشترین موفقیت را نشان داد. بعلاوه سرم ماهی قزل‌آلا تاثیر مثبت و معنی داری بر رشد و چسبندگی سلول-های ماهی آزاد دریای خزر داشت و بیشترین رشد در محیط کشت L-15 به همراه ٪۱۵ FBS و ٪۱ FS حاصل شد. در نهایت با توجه به اینکه این سلول‌ها تا حداقل ۱۰ نوبت پاساژ و فریز و دفریز متوالی، از قابلیت رشد بسیار خوبی برخوردار بوده و عدد کروموزومی آنها در پاساژ شماره چهار بصورت پایدار و معادل ۸۰ حفظ گردیده است، می توان از آنها به عنوان رده سلولی ماهی آزاد دریای خزر استفاده نمود. لذا رده مذکور در بانک سلولهای جانوری مرکز ذخایرژنتیکی کشور با نام CS2-2 و شماره دستیابی IBRC C10190 ثبت و نگهداری می شود.

کلید واژه: ماهی آزاد دریای خزر، کشت اولیه سلول، رده سلولی، سرم ماهی

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه و اهداف پژوهش	
۱-۱- مقدمه	۱
۱-۲ مزایای کشت‌های سلولی ماهیان	۴
۱-۲-۱ برخورداری از گستره دمایی وسیع در زمان انکوباسیون سلولی	۵
۱-۲-۲ قابلیت نگهداری طولانی مدت به دلیل پائین بودن نرخ متابولیکی سلول‌ها	۵
۱-۲-۳ سهولت تولید، نگهداری و دستکاری رده‌های سلولی ماهیان در مقایسه با دیگر مهره داران	۵
۱-۳ کاربردهای رده‌های سلولی ماهی	۵
۱-۳-۱ مطالعات ویروس‌شناسی	۶
۱-۳-۲ مطالعات بیولوژی	۶
۱-۳-۳ مطالعات ژنتیک و مولکولی	۶
۱-۳-۴ مطالعات زیست‌شناسی تکوینی	۷
۱-۳-۵ جایگزینی رده سلولی در برخی مطالعات به جای موجود کامل	۷
۱-۳-۶ مطالعات سم‌شناسی	۸
۱-۴ علت استفاده از سرم	۸
۱-۴-۱ علت استفاده از سرم جنین گوساله	۸
۱-۴-۲ علت استفاده از سرم ماهی	۹
۱-۵ اهداف	۱۰
۱-۶ سوالات تحقیق	۱۰
۱-۷ فرضیات	۱۰
فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده	
۲-۱ سابقه اولین مطالعات کشت سلول	۱۲
۲-۲ استفاده از سرم ماهی در کشت سلول	۱۳
۲-۳ آنزیم‌های مورد استفاده به منظور استخراج سلول از بافت	۱۵
۲-۴ محیط کشت‌های رایج در کشت سلول‌های ماهی	۱۶
۲-۵ استفاده از آنتی‌بیوتیک در کشت سلول	۱۷
۲-۶ اولین کشت سلول از ماهیان الاسموبرانش	۱۷
۲-۷ اولین رده سلولی ماهی	۱۸
۲-۸ رده‌های سلولی تولید شده از ماهیان آب شور	۱۸
۲-۹ رده‌های سلولی تولید شده از ماهیان آب شیرین و رودکوچ	۲۰
فصل سوم: مواد و روش‌ها	

۳-۱- مواد	۲۳
۳-۱-۱مواد مصرفی	۲۳
۳-۱-۱-۱ آماده سازی محیط‌های کشت	۲۳
۳-۱-۱-۱-۱ محیط کشت Leibovitz's L-15	۲۳
۳-۱-۱-۱-۲ ساخت محیط کشت اولیه	۲۴
۳-۱-۱-۱-۳ محیط کشت مصرفی	۲۴
۳-۱-۱-۱-۴ محیط کشت حاوی سرم ماهی به همراه سرم جنین گوساله	۲۴
۳-۱-۱-۱-۵ محیط کشت حاوی سرم ماهی	۲۴
۳-۱-۱-۲ محلول نمکی فسفات استریل	۲۴
۳-۱-۱-۳ محلول شستشوی نمکی	۲۵
۳-۱-۱-۴ آنزیم تریپسین -۱X EDTA	۲۵
۳-۱-۱-۵ سرم جنین گوساله	۲۵
۳-۱-۱-۶ محیط مخصوص فریز	۲۵
۳-۱-۱-۷ ظروف کشت و ظروف پلاستیکی	۲۵
۳-۱-۱-۸ محلول تریپان بلو	۲۶
۳-۱-۱-۹ محلول کلسمید	۲۶
۳-۱-۱-۱۰ محلول هایپوتونیک	۲۶
۳-۱-۱-۱۱ محلول فیکساتیو کارنوی	۲۶
۳-۱-۱-۱۲ رنگ گیمسا	۲۷
۳-۱-۲ مواد غیر مصرفی	۲۷
۳-۱-۲-۱ هود بیولوژیک	۲۷
۳-۱-۲-۲ سانتریفیوژ بدون یخچال	۲۸
۳-۱-۲-۳ سانتریفیوژ یخچال دار	۲۸
۳-۱-۲-۴ میکروسکوپ نوری معکوس	۲۸
۳-۱-۲-۵ انکوباتور	۲۸
۳-۱-۲-۶ استیرر	۲۸
۳-۱-۲-۷ شیکر	۲۸
۳-۱-۲-۸ مگنت کوچک استریل	۲۹
۳-۲ روش کار	۲۹
۳-۲-۱ گونه ماهی مورد بررسی	۲۹
۳-۲-۲ تهیه سرم ماهی	۳۱
۳-۲-۳ نمایش مراحل کار به صورت خلاصه	۳۲

۳-۲-۴ کشت اولیه	۳۳
۳-۲-۴-۱ کاشت بافت از باله‌های مختلف	۳۳
۳-۲-۴-۲ کاشت بافت بعد از تیمار با آنزیم تریپسین	۳۴
۳-۲-۴-۳ استخراج سلول از بافت با کمک آنزیم تریپسین	۳۵
۳-۲-۵ نگهداری و پاساژ کشت‌های اولیه	۳۶
۳-۲-۵-۱ پاساژ کشت‌های باله	۳۶
۳-۲-۵-۲ پاساژ کشت‌های آنزیمی	۳۷
۳-۲-۵-۲-۱ تراکم سلول‌ها در ظرف کشت	۳۷
۳-۲-۵-۲-۲ مقدار محیط کشت لازم در هر ظرف کشت	۳۷
۳-۲-۶ ذخیره‌سازی سلول‌ها (فریز و دفریز)	۳۸
۳-۲-۶-۱ فریز سلول ها	۳۸
۳-۲-۶-۲ دفریز سلول ها	۳۹
۳-۲-۷ شمارش سلول‌ها و تعیین درصد بقا	۳۹
۳-۲-۸ بررسی مهاجرت سلول از قطعات باله کاشته شده	۴۰
۳-۲-۹ بررسی چسبندگی سلول‌ها در تیمارهای مختلف سرم	۴۱
۳-۲-۱۰ مطالعات سیتوژنتیک	۴۱
۳-۲-۱۱ نحوه آنالیز داده‌ها	۴۳
فصل چهارم: نتایج	
۴-۱ درصد رشد سلول از باله های مختلف	۴۵
۴-۲ میزان مهاجرت سلول از باله‌ی سینه‌ای در حالت تیمار شده با آنزیم تریپسین و بدون تیمار با آنزیم	۴۸
۴-۳ نگهداری کشت‌های سلولی	۵۰
۴-۴ درصد بازماندگی در زمان‌های مختلف تیمار	۵۰
۴-۵ کلونیهای تشکیل شده در ترکیب سرم‌های مختلف	۵۴
۴-۶ مطالعات سیتوژنتیک	۵۵
۴-۷ درصد بقا بعد از دفریز	۵۵
فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری و پیشنهادها	
۵-۱ رشد سلول از باله‌های مختلف	۵۹
۵-۲ مقایسه کاشت بافت باله‌ی سینه‌ای تیمار شده و تیمار نشده با آنزیم تریپسین	۶۱
۵-۳ مقایسه سلول‌های حاصل از روش کاشت بافت با روش آنزیمی	۶۲
۵-۴ درصد بقا در زمان‌های مختلف تیمار با آنزیم تریپسین	۶۳
۵-۵ کلونیهای تشکیل شده در ترکیب‌های مختلف سرم	۶۵

۵-۶ بررسی کاریوتایپ	۶۹
۵-۷ درصد بقا بعد از دفریز	۶۹
۵-۸ نگهداری رده سلولی حاصل از ماهی آزاد دریای خزر در مرکز ملی ذخایر ژنتیک و زیستی ایران	۷۰
۵-۹ نتیجه گیری نهایی	۷۰
۵-۱۰ آزمون فرضیات	۷۱
۵-۱۱ پیشنهادها	۷۱
منابع	۷۳

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل۱-۲ رشد سلول بعد از ترانسفورماسیون	۴
شکل۳-۱ نمایی از هود بیولوژیک در هنگام کار	۲۷
شکل ۳-۲ ساخت مگنت شیشه‌ای	۳۰
شکل ۳-۳ ماهی آزاد دریای خزر	۳۰
شکل ۳-۴ سرم ماهی (سمت راست) در کنار FBS (سمت چپ)	۳۱
شکل ۳-۵ جداسازی و شستشوی باله‌های پشتی، مخرجی، دمی و سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر	۳۴
شکل ۳-۶ سلول حاصل از باله‌ی سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر در پاساژ شماره پنج در مرحله تقسیم	۴۵
شکل ۳-۷ سلول‌های متورم شده‌ی حاصل از باله‌ی سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر در پاساژ شماره پنج بعد از مرحله هایپوتونیک	۴۴
شکل ۴-۱ مقایسه درصد کارآیی کاشت بافت برای باله‌های مختلف ماهی آزاد دریای خزر	۴۶
شکل ۴-۲ مهاجرت سلول از باله سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر ۱۵ ساعت بعد از کاشت بافت	۴۷
شکل ۴-۳ مهاجرت سلول از باله سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر ۳۶ ساعت بعد از کاشت بافت	۴۷
شکل ۴-۴ مقایسه درصد کارآیی کاشت بافت تیمار شده و تیمار نشده با آنزیم تریپسین باله‌های سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر	۴۸
شکل ۴-۵ مهاجرت سلول از کاشت بافت باله‌ی سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر تیمار شده با آنزیم تریپسین بعد از یک هفته	۴۹
شکل ۴-۶ مهاجرت سلول از کاشت بافت باله‌ی سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر تیمار نشده با آنزیم تریپسین بعد از یک هفته	۴۹
شکل ۴-۷ مقایسه درصد زنده‌مانی سلول‌های استخراج شده از ماهی آزاد دریای خزر در زمان‌های مختلف تیمار با آنزیم تریپسین	۵۱
شکل ۴-۸ سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر در پاساژ شماره ۱۰	۵۲
شکل ۴-۹ دو روز بعد از کشت اولیه ماهی آزاد دریای خزر با روش جداسازی آنزیمی	۵۲
شکل ۴-۱۰ سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر پنج روز بعد از کشت اولیه با روش جداسازی آنزیمی از ماهی آزاد دریای خزر	۵۳
شکل ۴-۱۱ سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر پنج روز بعد از کشت اولیه با روش جداسازی آنزیمی	۵۳
شکل۴-۱۲ مقایسه درصد ایجاد کلونی سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر در پاساژ شماره ۵ در سه تیمار سرم	۵۴
شکل ۴-۱۳ کلونی‌های سلولی حاصل از باله سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر تشکیل شده بعد از ۱۲ روز در تیمار L-15 + 15%FBS	۵۶

شکل ۴-۱۴ کلونی‌های سلولی حاصل از باله سینه‌ای ماهی آزاد دریای خزر تشکیل شده بعد از ۱۲ روز در تیمار L-15 + 15%FBS + 1%FS	۵۶
جدول۴-۱۵ کروموزوم‌های شمارش شده از سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر در پاساژ شماره چهار	۵۷
شکل ۴-۱۶ مجموعه‌ی کروموزوم‌های متافازی حاصل از سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر در پاساژ شماره چهار	۵۷
شکل ۴-۱۷ دو ساعت بعد از دفریز سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر-سلول‌ها در حال چسبیدن	۵۸
شکل ۴-۱۸ یک روز بعد از دفریز سلول‌های ماهی آزاد دریای خزر پس از تعویض محیط	۵۸

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مقدمه

کشت سلول مزایای زیادی در رابطه ابزارهای آزمایشی در اختیار ما قرار می‌دهد. در اکثر تحقیقات 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 می-شوند.

امروزه کشت سلول ابزار بسیار مفیدی جهت پاسخ به بسیاری از سوالات در زمینه‌ی بیولوژی و علوم پزشکی محسوب می‌شود. کشت سلول آبزیان همانند سایر جانوران به دو نوع کشت اولیه[1] و رده سلولی[2] تقسیم می‌شود. این دو به هم وابسته‌اند زمانی که منبع اولیه نگهداری سلول در حالت *in vitro* مستقیم از بافت یا اندام ماهی به دست آمده باشد به آن کشت اولیه، و در حالتی که منبع اولیه سلول از کشت اولیه تهیه شود به آن رده سلولی گویند (Schaffer، ۱۹۹۰). عمده‌ترین تفاوت این دو کشت طول عمر آنها می‌باشد. کشت‌های اولیه معمولا بیشتر از چند روز عمر نمی‌کنند در حالی که رده‌های سلولی چندین سال قابلیت زندگی دارند (Bols و همکاران، ۲۰۰۵).

[1] Primary culture
[2] Cell line

کشت‌های اولیه به علت شباهت بیشتر با جاندار در مقایسه با رده‌های سلولی مدل‌های مناسب-تری برای مطالعات *in vivo* می‌باشند (Lakra وSwaminathan ، ۲۰۱۱)؛ (Freshney، ۲۰۰۵).

به صورت یک قاعده کلی، کشت‌های اولیه در مقایسه با رده‌های سلولی نامیرای همان گونه رنج بیشتری از حساسیت به ویروس‌های مختلف را نشان می‌دهند. در واقع یک رده‌ی سلولی زمانی که توسعه می‌یابد حساسیت خود را به برخی ویروس‌ها از دست می‌دهد (Wolfو Quimby ، ۱۹۶۹). از طرف دیگر کشت‌های اولیه ممکن است از اهدا کننده‌ای گرفته شده باشند که خود ناقل ویروس بوده است، در این موارد اغلب کشت سلولی از بین می‌رود (Malsberger وCerini ، ۱۹۶۳). تنها راه جلوگیری از این مساله این است که از سلامت موجود اهدا کننده مطمئن شد.

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 وLannan ، ۱۹۹۴).

یکی از بیشترین کاربردهای رده‌های سلول در رابطه با جداسازی و مطالعه ویروس‌های ماهیان است و از آنجا که برخی از ویروس‌ها در میزبان خاص و حتی در بافت خاص رشد می‌کنند، نیاز به رده‌های سلولی از بافت‌های متنوع مساله‌ی اجتناب ناپذیری می‌باشد (Lakra و Swaminathan، ۲۰۱۱).

رده‌های سلولی خود به دو دسته محدود یا سلول هایی که بعد از چند پاساژ پیر می شوند و می میرند، و نامحدود، یعنی سلول هایی که می توان آنها را به تعداد نامحدود پاساژ داد، تقسیم می شوند. سلول‌های طبیعی طول عمر مشخص(بین ۲۰ تا ۸۰ چرخه تقسیم سلولی) دارند و پس از این مدت پیر شده و می‌میرند. این مساله با نام محدودیت هایفلیک[1] شناخته می‌شود. انتهای محافظت

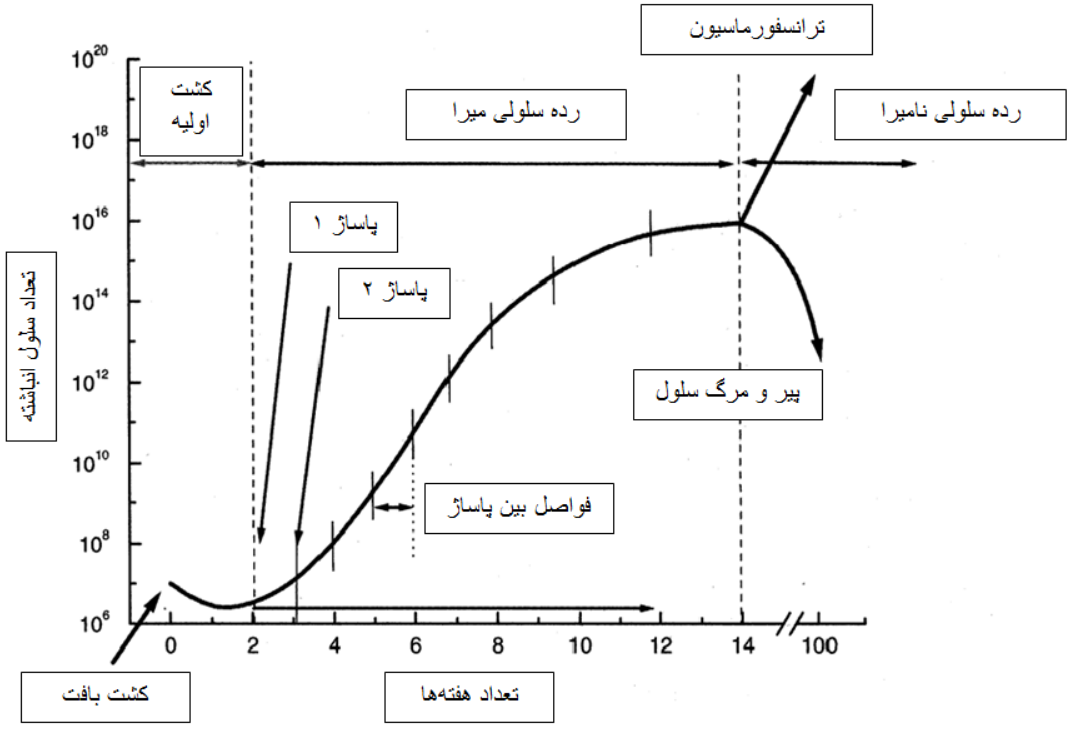
[1] Hayflick limit

کننده کروموزوم‌ها، تلومراز، با هر تقسیم کوتاه شده و زمانی که از یک اندازه‌ی مشخص کوتاه تر شود سلول قابلیت تقسیم خود را از دست خواهد داد. در این مرحله است که سلول وارد مرحله‌ی سکون می‌شود (Barker و همکاران، ۲۰۰۰). این امر خود موجب فعال شدن ژن سرکوب کننده تومو، ژن P53، می‌شود و در نهایت منجر به جلوگیری از پیشرفت سلول می‌گردد. این ژن چرخه سلولی را متوقف می‌کند تا سلول زمان داشته باشد تا صدمات وارد به DNA خود را بررسی کند. اگر DNA سالم باقی مانده باشد، چرخه سلولی از سر گرفته می‌شود (Luft و همکاران، ۱۹۹۸). این اتفاقات باعث می‌شود تا سلول از مرحله تقسیم فعال به مرحله‌ی توقف تقسیم، که همان مرحله‌ی پیری است، وارد شود.

به منظور اینکه یک رده‌ی سلولی نامحدود[1] شود باید یا نامیرا[2] شده یا دستخوش ترانسفورماسیون[3] گردد. ترانسفورماسیون به دستکاری ژنتیکی اطلاق می‌شود که یک DNA خارجی به سلول معرفی شده و ژن مورد نظر بیان گردد. البته این تعریف در کشت سلول کمی متفاوت است و بیشتر به حالتی گفته می‌شود که خصوصیات رشد سلول مثل از بین رفتن محدودیت تماس سلول‌ها با یکدیگر، نیاز به غلظت سرم کمتر، رشد ادامه‌دار، تغییر داده شود که این تغییرات می-توانند منجر به نامیرا سازی سلول گردند. این سلول‌ها محدودیت تقسیم ندارند و پیر نمی‌شوند (Freshney، ۲۰۰۵).

اکثریت رده‌های تولید شده از ماهیان از بافت‌های طبیعی به دست آمده‌اند و به صورت خود به خودی ترانسفورم شده‌اند (Fryer وLannan ، ۱۹۹۴)؛ (Butler وNowak ، ۲۰۰۴) ولی گزارش-هایی از نامیرا کردن رده‌های سلولی توسط موتاژن، ویروس و ترانسفک کردن سلول نیز وجود دارد (Freshney، ۲۰۰۵)؛ (Takarada و همکاران، ۱۹۸۹).

[1] Infinite
[2] Immortalization
[3] Transformation



شکل۱-۲ رشد سلول بعد از ترانسفورماسیون

اقتباس شده از (Freshney، ۲۰۰۵)

در حوزه های علوم زیستی بکارگیری مدل های *in vitro* کشت سلولی به دلیل امکان ارزیابی دقیق عملکردهای خاص در محیط‌هایی با شرایط کنترل شده در مقایسه با محیط های طبیعی و همچنین کاهش اختلاف بین تیمارها جهت مطالعات مختلف، مرسوم گشته است (Lee و همکاران، ۲۰۰۹).

۱-۲ مزایای کشت‌های سلولی ماهیان

از نظر تقسیم بندی جانوری، ماهی‌ها اولین گروه مهره داران را تشکیل می دهند (۴۸٪)(Lakra و Swaminathan، ۲۰۱۱). خصوصیات فیزیولوژیک و اجزای تشکیل دهنده ی پلاسمای خون ماهیان استخوانی شبیه به موجودات خشکی زی می باشد. این مساله نشان دهنده اهمیت بالای این منبع

جهت توسعه مدل های سلولی و بافتی مهره‌داران در علوم زیستی می باشد. از آنجا که کشت سلولی آبزیان تفاوت‌هایی نسبت به جانوران خشکی زی دارد منجر به ایجاد مزایایی در مقایسه با جانوران خشکی زی شده است. از جمله این مزایا موارد ذیل قابل ذکر می باشد:

۱-۲-۱ برخورداری از گستره دمایی وسیع در زمان انکوباسیون سلولی

۱-۲-۲ قابلیت نگهداری طولانی مدت به دلیل پائین بودن نرخ متابولیکی سلول‌ها

اغلب محیط‌های کشت پستانداران پس از گذشت چند روز اسیدی می‌گردند ولی طبق گزارش‌های موجود این مساله در مورد کشت‌های آزادماهیان صادق نیست. در گزارشی بیان شده است که محیط کشت سلول‌های جنینی چینوک سالمون بعد از پاساژ کمی قلیایی می‌شود و بعد از آن pH به صورت بسیار آهسته افت می‌کند طوری که بعد از سپری شدن ۲۸ روز به محدوده‌ی pH خنثی می-رسد (Fryer، ۱۹۶۴). رشد اغلب سلول ها پس از سقوط pH از ۷ به ۶.۵ متوقف می شود و بین ۶.۵ و ۶ حیات خود را از دست می دهند(خوانساری و شمشیری،۱۳۷۴). سلول‌های ماهی در مقایسه با سلول‌های پستانداران وابستگی شدید به pH ندارند به طوری که سلول‌های قزل‌آلا به خوبی در رنج ۷/۲ الی ۷/۸ رشد می‌کنند(Wolf وQuimby ، ۱۹۶۹).

۱-۲-۳ سهولت تولید، نگهداری و دستکاری رده‌های سلولی ماهیان در مقایسه با دیگر مهره داران (Wolf و Quimby ،۱۹۷۶a)

۱-۳ کاربردهای رده‌های سلولی ماهی

کاربرد رده‌های سلولی ماهی بسیار زیاد و متنوع و روز افزون است، اما می توان به صورت خلاصه آنها را در شش گروه اصلی طبقه بندی کرد.