معرفی بهترین روش برای کشت اولیه‌ی سلول‌های کبدی ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)

نگین درخشش[۱]، عبدالعلی موحدی‌نیا*[۱و۲]، نگین سلامات[۱]، محمود هاشمی‌تبار[۳] و وحید بیاتی[۳]

۱. گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خوزستان، خرمشهر
۲. گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه مازندران، بابلسر، مازندران
۳. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی جندی‌شاپور، اهواز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۶

شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22113/jmst.2017.50586

چکیده

کبد یکی از مهم‌ترین اندام‌های بدن مهره‌داران محسوب می شود که نقش مهمی در سم‌زدایی دارد. این اندام در بسیاری از مطالعات فیزیولوژیک و سم‌شناسی به عنوان اندام هدف مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی تاثیر نوع هضم آنزیمی، میزان درصد سرم جنین گاوی و دمای انکوباتور در کشت اولیه‌ی سلول‌های کبدی ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) از ماهیان مناطق گرمسیری، متعلق به خانواده‌ی Serranidae بود. برای انجام این مطالعه، از ۵ عدد ماهی هامور معمولی استفاده شد. ابتدا بدن ماهی توسط الکل اتانول ۷۰٪ ضدعفونی و پس از جدا کردن بافت کبد، توسط قیچی به قطعات ریز تقسیم شد و با استفاده از روش‌های متفاوت هضم آنزیمی توسط کلاژناز (تیپ ۱ و ۴)، تریپسین و استفاده از مواد مغذی و افزودنی در محیط کشت، سلول‌های آن جداسازی شد. سپس سلول‌های کبدی جداسازی شده به مدت ۲ هفته در محیط کشت L-15 Lebowitz به سه روش استفاده از هضم آنزیمی توسط تریپسین، هضم آنزیمی توسط کلاژناز (تیپ ۱ و ۴) و استفاده از مواد و افزودنی‌های مغذی، کشت داده شد. اثر شرایط متفاوت به لحاظ میزان دمای انکوباتور (۲۰، ۲۵، ۲۸، ۳۰ و۳۲ درجه سانتیگراد) و میزان سرم جنین گاوی (۰٪، ۱۰٪ و ۲۰٪ و ۲۰٪+ITS) بر رشد سلول‌ها بررسی شد. براساس نتایج به دست آمده، تعداد سلول‌ها با استفاده از سیستم کشت هضم آنزیمی توسط آنزیم کلاژناز تیپ ۴ در مقایسه با سایر روش‌ها بیشتر بود. با همین روش، اغلب سلول‌ها مورفولوژی فیبروبلاستی داشتند. در مجموع با بررسی حاضر، مناسب ترین روش برای کشت سلول‌های کبدی ماهی هامور معمولی، استفاده از مواد مغذی ITS، سرم جنین گاوی به میزان ۲۰٪ و دمای انکوباتور ۳۰°C تشخیص داده شده است.

واژگان کلیدی: کشت اولیه سلول، سلول کبدی، ماهی هامور معمولی، *Epinephelus coioides*

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: amovahedinia@yahoo.com

۱. مقدمه

استفاده از روش‌های کشت سلولی و تکنیک‌های کشت سلول علم جدیدیست که برای مطالعه‌ی سلول‌های جانوری در بیشتر کشورهای توسعه‌یافته و برخی کشورهای در حال توسعه به سرعت رو به گسترش می- باشد. در سال‌های اخیر توجه به کشت سلولی در زمینه‌ی آبزیان (به‌ویژه در زمینه‌ی ماهی‌ها) به میزان زیادی گسترش یافته و به نظر می رسد که در آینده ای نه چندان دور، چشم انداز این علم در گروه آبزیان پیشرفته تر از کشت سلولی در گروه پستانداران شود (Abdul Majeed *et al.*, 2013; Taju *et al.*, 2012).

روش کشت سلولی، بیشتر در مورد سلول‌های جانوران پرسلولی کاربرد دارد و به طورکلی، کشت سلولی به کشت کنترل شده سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی در شرایط آزمایشگاهی و محیط کشت اطلاق می گردد. روش کشت سلولی آسان بوده و قابلیت تکرارپذیری بالایی دارد. در نتیجه تفسیر نتایج حاصل از مطالعات انجام گرفته توسط آن اغلب قطعی تر از نتایج حاصله از مطالعه‌ی حیوانات در شرایط آزمایشگاهی است. مهم ترین دلیل استفاده از این روش به علت کاهش استفاده از جانداران و عدم آلودگی آن‌ها در محیط‌های آزمایشگاهی می‌باشد. ضمن اینکه در این روش مواد سمی کم تری در محیط تولید می گردد و نتایج با سرعت بیشتر و هزینه‌ی کم تری صورت می گیرد (Fent, 2001). علاوه بر این از این روش، در زمینه‌های تحقیقاتی متفاوت مربوط به ماهیان استفاده فراوانی می شود. به عنوان مثال می توان از روش‌های کشت سلولی در مطالعات مربوط به مکانیسم‌های سلولی و مولکولی، فرآیندهای فیزیولوژیک و سم‌شناسی و علومی مانند اکوتوکسیکولوژی (Fent, 2001; Castano *et al.*, 2003; Schimer, 2006)، ویروس‌شناسی (Wolf, 1988)، زیست‌شناسی سرطان (Clem *et al.*, 1996; Bolts *et al.*, 2001; Abdul Majeed *et al.*, 2013; Taju *et al.*, 2012)، آثار زیستی پرتوها (Babich and Borenfreund, 1991)، آبزی‌پروری و مطالعات ژنتیکی و بیان ژن (Bols, 1991) استفاده نمود. در سال‌های اخیر نیز در بیشتر کشورهای توسعه یافته، استفاده از سلول‌های ماهی در زیست فنآوری، تولید واکسن و داروهایی مانند آنتی‌بادی، اینترفرون و نیز هورمون‌های انسانی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (Montero *et al.*, 1996; Blos *et al.*, 2005; Hernandez-Garcia *et al.*, 2014).

علاوه بر" مزایای ذکر شده در قسمت بالا، کشت سلول‌های آبزیان دارای مزایای بیشتری نسبت به کشت سایر گروه‌های جانوری دارد که به برخی از آن‌ها در قسمت زیر اشاره شده است: به عنوان مثال: سلول‌های ماهیان در دامنه‌ی وسیع دمایی (۲۰ تا ۳۵ درجه سانتیگراد) قادر به رشد می باشند و می توانند به طور مستقیم در معرض نمونه‌های زیست محیطی با اسمولاریته‌ی مختلف قرار بگیرند که این امر به منجر به تسهیل جمع آوری اطلاعات در ارزیابی سمیت سلولی می شود. همچنین با توجه به اینکه سلول‌های ماهی فعالیت سوخت و ساز کم تری نسبت به سایر گروه‌های پستانداران دارند، آن‌ها را می توان با کمی دقت برای مدت زمان طولانی تری نگه داری نمود (Wolf and Quimby, 1976).

در این مطالعه به منظور تعیین روش بهینه کشت سلول‌های کبدی و بررسی عوامل تاثیر گذار بر آن مثل هضم آنزیمی، درصد سرم جنین گاوی (FBS) و دمای انکوباتور از ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) استفاده شد. این گروه از ماهیان از خانواده هامورماهیان (Serranidae) و جز ماهیان غالب و اصلی خلیج فارس محسوب می شوند که غالب صید در منطقه را به خود اختصاص داده اند. هامور ماهیان، ماهیان کم تحرک بوده که در کف مناطق صخره ای، اعماق اقیانوس‌ها و... زیست می کنند و بنابراین در معرض ترکیبات زنوبیوتیک محیطی قرار دارند (Randall, 1995). بافت کبد نقش مهمی در تنظیم متابولیسم گلوکز، تولید پروتئین‌های پلاسما و سم زدایی ترکیبات سمی درون و برون سلولی دارد.

بنابراین، استفاده از کشت سلول‌های کبدی در مقایسه با دیگر سلول‌های کشت داده شده آشکار می گردد. علاوه بر این، کشت سلول‌های کبدی نشان دهنده‌ی یک مدل سلولی برای تجزیه و تحلیل مکانیسم‌های درگیر در سم زدایی و تنظیم بیان ژن‌های مختلف در بدن گروه‌های مختلف جانوری و ابزاری برای اندازه گیری سمیت کبدی و متابولیسم داروها می باشد. درواقع، سلول‌های کبدی به منظور انجام سایر مطالعات نظیر ارزیابی فعالیت‌های اکسیداتیوی و آنتی اکسیدانی امری ضروری به نظر می رسد (Hinton and Lauren, 1990; Gernhofer *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2006; Van Dyk *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008).

تا کنون در داخل کشور، مطالعه‌ی جامعی در زمینه‌ی کشت سلول‌های سایر ماهیان دریایی از جمله ماهی هامور معمولی گزارش نشده است و کلیه‌ی مطالعات صورت گرفته در زمینه‌ی کشت سلول‌های آبزیان متعلق به ماهیان آب شیرین می باشد که از آن جمله می توان به مطالعه‌ی انجام گرفته، توسط Salamat (2008)، در زمینه‌ی کشت سلول‌های تخمدان ماهی کپور معمولی اشاره نمود. بنابراین، با توجه به عدم وجود چنین مطالعاتی و اهمیت این اندام از نظر فعالیت سمیت زدایی در زمان مواجهه با استرس آلاینده‌های محیطی، لزوم انجام تحقیق در این زمینه‌ی بخصوص در ماهیان بومی دریایی خلیج فارس و دریای عمان امری ضروری به نظر می رسد.

۲. مواد و روش

در این مطالعه، مطابق با مقالات موجود (Ellesat *et al.*, 2011)، تعداد ۵ قطعه ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) بالغ و سالم به وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۳۰۰ گرم، از موسسه تحقیقات علوم شیلاتی واقع در شهرستان ماهشهر (استان خوزستان) گرفته و به صورت زنده به آزمایشگاه تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی (جندی شاپور) اهواز منتقل گردید. در مرحله‌ی اول ماهی‌ها به وسیله‌ی ۲-فنوکسی اتانول (۰/۲درصد) بیهوش شده و به طور کامل توسط الکل اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شدند (Wen *et al.*, 2008).

پس از آن، بافت کبد هر یک از ماهیان به صورت جداگانه و در شرایط کاملا استریل از بدن جاندار جدا و به لوله‌ی فاکلن ml ۵۰ که حاوی PBS[1] (بافر فسفات نمکی) (واحد در میلی لیتر ۴۰۰ پنی سیلین و ۴۰۰ واحد در میلی لیتر استرپتومایسین) بود، منتقل شد. پس از شست و شو اولیه‌ی نمونه‌ها در بافر، سلول‌های کبدی با استفاده از روش‌های مختلف هضم آنزیمی، جداسازی و کشت داده شدند.

در روش کشت با استفاده از هضم آنزیمی توسط تریپسین، پس از شست و شو نمونه‌ها در بافر، کلیه‌ی نمونه‌ها توسط قیچی استریل به قطعات $1cm^2$ تقسیم شدند و سپس در لوله فالکنی که حاوی ۴ml آنزیم تریپسین بود قرار داده شدند. سپس لوله فالکون حاوی سلول‌های کبدی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تکان داده شدند تا کلیه‌ی قطعات بافت هضم گردد. سپس به منظور جدا سازی آنزیمی از سلول‌ها، بافت‌های نرم شده به همراه محیط کشت L-15 [2] (حاوی ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین، ۱۰۰میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین) از طریق فیلتر با منافذ ۷۰ میکرونی عبور داده شدند و بدین طریق دستجات سلولی آسپیره شده و محیط همگنی ایجاد شد. سپس پلیت‌های سلولی به مدت ۷ دقیقه و در دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفوژ شدند. پس از جدا کردن مایع رویی و اضافه کردن محیط کشت عمل سانتریفوژ سلولی به مدت ۵ دقیقه و در دورrpm ۱۵۰۰ تکرار شد. به منظور چسبیدن بهتر سلول‌ها از محلول ۱/۵ میلی مولار $CaCl_2$ استفاده شد و سلول‌ها با دور پایین g ۹۰ و به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس سوسپانسیون سلولی حاصل در فلاسک ۲۵ سانتی متر مربعی به همراه محیط کشتی که

[1] phosphate- buffered saline

حاوی FBS ۲۰ ٪ بود و در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد کشت داده شدند.

در روش کشت با استفاده از هضم آنزیمی توسط کلاژناز (تیپ ۱ و ۴) نیز ابتدا نمونه‌ها در بافر فسفات نمکی شست و شو داده شده و سپس توسط قیچی به قطعات $1cm^2$ تقسیم شدند. در این مرحله به منظور هضم سلول‌ها از آنزیم کلاژناز تیپ ۱ و ۴ به صورت جداگانه استفاده شد، تا روند تاثیر هر کدام از آنزیم‌ها در هضم سلول‌ها مشاهده گردد. برای انجام این مرحله، هر یک از بافت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق با PBS که شامل ۰/۱٪ آنزیم کلاژناز بود، تکان داده شدند. سپس به منظور خنثی کردن آنزیم کلاژناز ابتدا از محیط کشت حاوی FBS استفاده شد و بعد از آن مطابق با روش قبلی به منظور جدا کردن بهتر سلول‌ها از یکدیگر از فیلتری با منافذ ۷۰ میکرون استفاده شد. پلیت‌های سلولی حاصل ۲ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفوژ شدند. در نهایت، سلول‌ها جهت تکثیر در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد و در انکوباتور فاقد گاز کربنیک انکوبه شدند.

پس از تعیین بهترین روش جداسازی هضم آنزیمی، به منظور مشاهده‌ی تغییرات حاصل در روند رشد سلول‌ها از محلول‌های مختلفی نظیر ITS (انسولین، ترانسفرین، سلنیوم) و نسبت‌های مختلف FBS (۰، ۱۰، ۲۰ و ۲۰+ITS) استفاده شد و در نهایت تغییرات روند رشد سلول‌ها در مدت زمان ۱۴ روز مورد مطالعه قرار گرفت.

به منظور ارزیابی تاثیر دما بر روند رشد سلول‌ها نیز، سلول‌ها در دمای ۲۰، ۲۵، ۲۸، ۳۰ و ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد انکوبه شدند و در نهایت شمارش سلول‌ها در روزهای (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵) مورد مطالعه قرار گرفت.

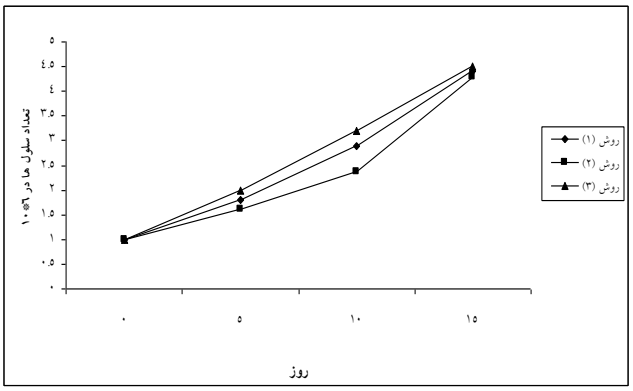
در پایان هر روز مورد مطالعه، شمارش سلولی با استفاده از لام هموسایتومر (نئوبار) انجام شد. در تمامی آزمون‌ها ابتدا درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان بلو تعیین شد. روش متداول در کشت سلولی، استفاده از نواحی مربوط به شمارش گلبول‌های سفید است. بدین منظور، ابتدا تعداد سلول‌ها در یکی از مربع‌ها شمارش شده و به عدد ۱۰۰۰۰ ضرب شد و بدین صورت تعداد سلول‌ها در هر میلی لیتر به دست آمد. جهت اطمینان از شمارش سلولی، سلول‌های موجود در خانه‌های بیشتری شمارش و تقیسم بر تعداد مربع‌ها شد و در نهایت در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب شد تا میزان سلول‌های زنده تعیین گردد.

به منظور رسم نمودارها و جداول از نرم افزار Microsoft office Excell, 2007 استفاده شد. کلیه‌ی داده‌های موجود در مطالعه‌ی حاضر (تعداد سلول‌ها در تیمارهای مختلف) نیز با ۵ بار تکرار و به صورت میانگین در هر گروه متغییر ارائه شد.

۳. نتایج

به منظور انجام مقایسه‌ی بهتر، در ابتدا روش‌های مختلف هضم آنزیمی با یکدیگر مقایسه شدند تا در اعمال بقیه‌ی عوامل نظیر تغییر در میزان سرم جنین گاوی(FBS)، دمای انکوباتور و شرایط کشت سلول‌ها یکسان بوده و تنها فاکتورهای موردنظر مورد بررسی قرار گیرند.

در مقایسه ۳ روش کشت در مدت زمان قرار گیری در انکوباتور، عامل دما و میزان سرم جنین گاوی (FBS) ثابت (به ترتیب دما $30^{\circ}C$ و میزان سرم جنین گاوی در محیط کشت ۲۰٪) در نظر گرفته شده است.



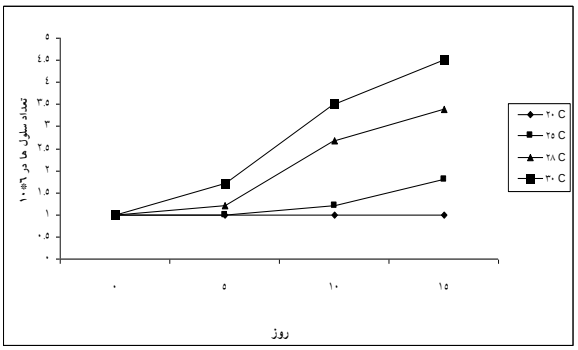
شکل ۱) استفاده از روش‌های مختلف در کشت سلول‌های کبدی در ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)- روش ۱) استفاده از آنزیم

تریپسین + $CaCl_2$. روش ۲) استفاده از آنزیم کلاژناز تیپ ۱. روش ۳) استفاده از آنزیم کلاژناز تیپ ۴+ ITS

همانگونه که در شکل۱ مشاهده می گردد، تفاوت آشکاری در تعداد سلول‌های شمارش شده در پایان دوره‌ی کشت، مشاهده نشده است. رشد سلول‌ها با استفاده از آنزیم کلاژناز تیپ ۴ به همراه ماده‌ی مغذی ITS بهتر از سایر روش‌ها گزارش شد. ضمن اینکه، در مرحله‌ی ابتدایی نیز، تعداد سلول‌های جدا شده از سلول‌ها در روش (۱) کم تر از روش‌های (۲) و (۳) می باشد.

با توجه به اینکه، سلول‌ها در روش سوم، بیشترین میزان رشد را از خود نشان دادند، از این روش در مقایسات بین دماهای مختلف انکوباتور و میزان سرم جنین گاوی (FBS) استفاده شد.

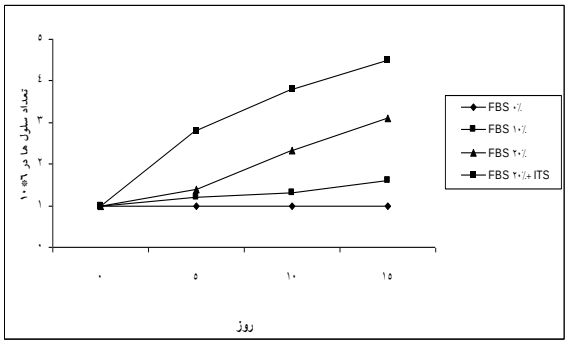
با مقایسه‌ی تعداد سلول‌ها در دماهای مختلف در مدت زمان قرارگیری در انکوباتور



شکل ۲) تاثیر دماهای مختلف انکوباتور در رشد سلول‌های کبدی در ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)

و مطابق با شکل۲ با افزایش دمای انکوباتور تعداد سلول‌ها و در نتیجه تقسیم در آن‌ها افزایش یافته است. مناسب ترین دما برای رشد سلول‌های کبدی در این گونه‌ی جانوری در دمای $30^{\circ}C$ مشاهده شد. در دمای پایین $20^{\circ}C$ رشد سلول‌ها بسیار کم بود و تعداد سلول‌ها در پایان روز پانزدهم مشابه با تعداد سلول‌ها در روز اول گزارش شد.

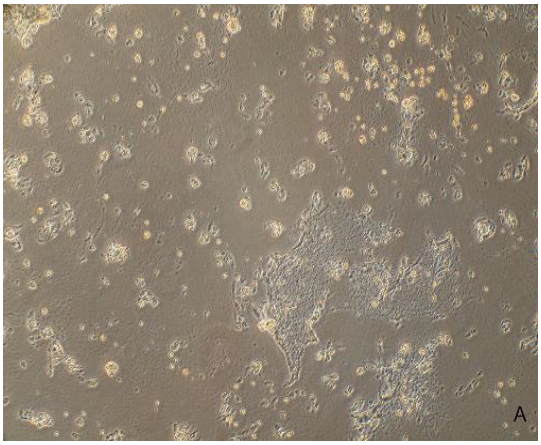
در بررسی وضعیت سلول‌ها در محیط‌های کشت، سلول‌های مرده به صورت توده ای و به رنگ روشن دیده شد. این سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده‌اند. افزایش مرگ سلولی و کاهش تعداد سلول‌ها در نتیجه دمای نامناسب مشاهده شد. این حالت در سه دمای ۲۰، ۲۵ و ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد مشاهده شد.

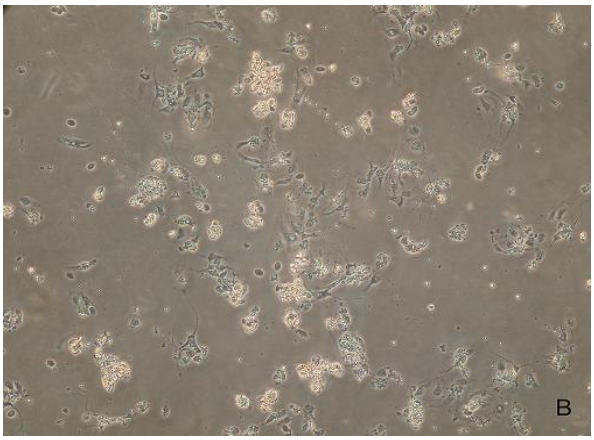


شکل ۳) تاثیر تغییرات میزان سرم جنین گاوی (FBS) در رشد سلول‌های کبدی در ماهی هامور معمولی(*Epinephelus coioides*)

با مقایسه‌ی تعداد سلول‌ها در FBS مختلف و مطابق با شکل۳، هنگامی‌که میزان میزان سرم جنین گاوی (FBS) در محیط کشت ۰٪ می باشد، هیچگونه رشدی در سلول‌ها مشاهده نمی شود. اما با افزایش میزان این سرم در محیط کشت، میزان رشد سلول‌ها به میزان چشم گیری افزایش یافته است. علاوه بر این افزایش قابل توجهی در رشد و تعداد سلول‌ها در محیط کشتی که دارای مواد مغذی ITS است، مشاهده می شود.

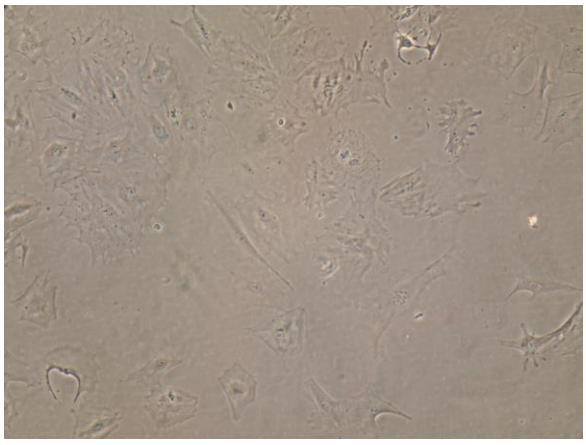
در شکل۴، سلول‌های حاصل از محیط کشتی که فاقد میزان سرم جنین گاوی (FBS) است، نشان داده شده است. وجود سلول‌های گرد، روشن و عدم چسبیدن سلول‌ها به فلاسک و در نتیجه عبور نور میکروسکوپ از آن‌ها نشان دهنده‌ی مرگ سلولی و عدم وجود شرایط مطلوب در محیط کشت می باشد.





شکل۵) A: استفاده از سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪ در پایان روز پنجم. B: استفاده از سرم جنین گاوی (FBS) ۲۰٪ در پایان روز پنجم

در شکل۵A، تغییر شکل سلول‌ها در اثر کمبود مواد مغذی و سرم جنین گاوی (FBS) در محیط کشت در روز پنجم، منجر به ایجاد حالت توده ای در سلول‌ها شده است. تعداد سلول‌های چسبیده به فلاسک نیز بسیار محدود شده و شکل سلول‌ها نیز از حالت طبیعی خود خارج شده اند. در شکل۵B، نیز در ابتدا سلول‌ها با میزان سرم جنین گاوی (FBS) ۲۰٪ رشد کردند و در نتیجه در مدت زمان ۵ روز تغییرات قابل توجهی در رشد سلول‌ها نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده شد. سلول‌های دوکی شکل و کشیده نشان دهنده‌ی سلول‌های وجود سلول‌های فیبروبلاستی غالب وچسبیده به فلاسک می باشد.



شکل ۶) استفاده از سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪ در پایان روز پانزدهم، میزان بزرگنمایی ۱۰۰*

همانگونه که در شکل۶ نشان داده شده است در این حالت فاصله‌ی سلول‌ها از یکدیگر زیاد بوده و سلول‌ها حالت شش ضلعی پیدا کرده اند و بدون رسیدن به تراکم لازم و ایجاد ارتباطات سلولی، سلول‌ها پیر شده و در نهایت این روند منجر به کاهش تعداد آن‌ها در پایان روز مورد مطالعه شده است.

۴- بحث و نتیجه گیری

با توجه به کمبود اطلاعات در زمینه‌ی کشت سلول‌های کبدی ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) امکان مقایسه‌ی این مطالعه با سایر مطالعات فراهم نبود و تنها مطالعه‌ی صورت گرفته در این زمینه، توسط Lai و همکاران (2000) در رابطه با تولید رده‌های سلول‌های کبدی و کلیوی گونه ای از هامور ماهیان (*Epinephelus awoara*) در اندازه‌ی لاروی صورت گرفته است.

در مجموع، انواع متفاوتی از آنزیم‌های کلاژناز برای هضم سلول‌های کبدی در نظر گرفته می شود (Clement *et al*., 1986)، که احتمالا به دلیل نوع ساختمان بافتی و گلیکوپروتیئنی موجود در آن می باشد. با توجه به اینکه ماهی هامور معمولی، ماهی مقاومی می باشد، جنس بافت کبد نیز در این گونه بسیار مقاوم بوده و لذا با استفاده از آنزیم تریپسین، هضم آنزیمی در این گونه به خوبی صورت نمی گیرد.

بنابراین کاملا طبیعی به نظر می رسد که از همان ابتدای کار هضم بافتی به خوبی صورت نگیرد و تعداد سلول‌های جدا شده از بافت کبد جاندار کم تر از سایر روش (استفاده از آنزیم کلاژناز) باشد. در سایر مطالعات صورت گرفته توسط محقیقین دیگر نظیرSoftelandو همکاران (2010) در ماهی کاد و Zhou و همکاران (2006) در گونه‌ی ماهی تیلاپیا نیز از روش هضم آنزیمی به وسیله‌ی آنزیم کلاژناز استفاده شده است.

غالب رده‌های سلولی ماهیان گرمسیری در دامنه‌ی دمایی ۲۰ تا ۳۵ درجه‌ی سانتیگراد رشد می کنند (Wen *et al*., 2008). این دامنه‌ی دمایی در سایر گونه‌های جانوری نظیر: ماهی کپور علفخوار (Lu *et al*., 1990) و لاک پشت سبز نیز گزارش شده است (Koment and Haines, 1982). با توجه به این دامنه‌ی دمایی، در مطالعه‌ی حاضر نیز دامنه‌ی تغییرات بین ۲۰ تا ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد در نظر گرفته شد، که به نظر می رسد دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد بهترین دما برای رشد سول‌های کبدی محسوب می شود. سلول‌های کبدی نسبت به تغییرات دمایی بسیار حساس بوده و تغییرات قابل توجهی را از لحاظ میزان رشد و تقسیم سلولی از خود نشان داده اند. در مطالعه‌ی صورت گرفته توسط Lai و همکاران (2000) در گونه‌ی ماهی(*Epinephelus awoara*) از هامور ماهیان، دامنه‌ی دمایی مناسب بین ۲۸ تا ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد گزارش شده است.

محققینی نظیر: Jefferson و همکاران (1984) و Fraslin و همکاران (1985) معتقد هستند که استفاده از مواد افزودنی نظیر انسولین و گلوکوپروتئین‌ها نقش مهمی در بیان ژن‌های خاص در سلول‌های کبدی ایفا می کند. این مواد هنگامی که با مواد مغذی دیگر نظیر: سلنیوم ترکیب می شوند، نقش مهمی در رشد سلول‌های کبدی دارند. هم چنین، مطابق با گزارشات موجود با افزودن مواد مغذی نظیر انسولین، میزان تقسیم سلول‌ها و در نهایت تعداد سلول‌ها در ماهی قزل آلای رنگین کمان نسبت به عدم استفاده از این ماده، تا ۸۰٪ افزایش یافته است (Babich and Borenfend, 1987) که این موضوع احتمالا به دلیل افزایش فعالیت mRNA سلول‌های کبدی ماهی می باشد که کمی بیشتر از میزان فعالیت mRNA سلول‌های سایر جانوران نظیر موش است که باعث شده نقش مهمی در میزان رشد سلول‌های کبدی ماهی ایفا کند.

در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شد که عدم وجود FBS مانع از رشد و چسیدن سلول‌ها به کف فلاسک می شود. اما با افزایش میزان FBS رشد سلول‌ها در مدت زمان مورد مطالعه به میزان قابل توجهی افزایش یافت. مطابق با تحقیقات صورت گرفته توسط Kocal و همکاران (1985)، بیان شده است که استفاده از سایر مواد مغذی نظیر سرم ماهی نیز منجر به افزایش میزان چسبندگی و رشد سلول‌ها در کشت اولیه‌ی سلول‌های ماهی می گردد. این روند به صورت کاملا واضح در سلول‌های کبدی ماهی نشان داده شده است. در شرایط مطلوب، سلول‌های کبدی ۵ روز پس از قرار گرفتن در محیط کشت، شروع به رشد و ایجاد سلول‌های فیبروبلاست و چسبیده به فلاسک می کنند و در مدت زمان ۱۵ روز بیش از ۸۰٪ سطح سلول را احاطه می کنند، که مطابق با نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر می باشد. این نتایج توسط محققینی نظیر: Salvo and Malucelli (2000)، نیز تایید شده است. در مجموع، با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، مناسب ترین دما برای رشد سلول‌های کبدی در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد و میزان ۲۰٪ FBS به همراه ۱٪ ITS به دست آمد که پیشنهاد می گردد در مطالعات بعدی صورت گرفته در رابطه با این گونه مورد استفاده قرار بگیرد.

سپاسگزاری

از مسئولین و پرسنل آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، به‌ویژه آقای مهندس صارمی بابت همکاری موثر

در انجام فعالیت هـای آزمایشـگاهی در زمینـه کشـت سلول، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Abdul Majeed, S., Nambi, K. S. N., Taju, G., Sundar Raj, N., Madan, N. and Sahul Hameed, A. S., 2013. Establishment and characterization of permanent cell line from gill tissuse of *Labeo rohita* (Hamilton) and its application in gene expression and toxicology. Cell Biology Toxicology, 29, 59-73.

Babich, H., Borenfreund, E., 1987. Aquatic pollutants tested: in vitro with early passage fish cells. ATLA. V. 15. p. 116-22.

Babich, H. and Borenfreund, E., 1991. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: a review. Toxicology In Vitro, 5, 91-100.

Bols, N. C., 1991. Biotechnology and aquacuture: the role of cell cultures Bitechnol, Adv. 9, 31-49.

Bols, N. C., Brubacher, J. L., Ganassin, R. C. and Lee, L. E. J., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Developmental Computational Immunolgiae, 25, 853-873.

Blos, N. C., Dayeh, V. R., Lee, L. E. J. and Schirmer, K., 2005. Use of fish cell lines in the toxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochemistry and Molecular Biology of Fishesh, Vol, 6.

Castano, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L. E., Mothersill, C., Part, P., Repetto, G., Sintes, J. R., Rufli, H., Smith, R., Wood, C. and Senger, H., 2003. The use of fish cells in ecotoxicology, ATLA31 (3), 317-351.

Clem, L. W., Bly, J. E., Wilson, M., Chinchar, V. G., Stuge, T., Baker, K., Luft, C., Rycyzyn, M., Hogan, R. J., van Lopik, T. and Miler, N. W., 1996. Fish immunology: the utility of immortalized lymphoid cells-a mini review, Vet. Immunopathol. 54.

Clement, B., Grimaud, J. A., Campion, J. P., Deugnier, Y., Guillouzo, A., 1986. Cell types involved in collagen and fibronectin production in normal and fibrotic human liver. Hepatology 6: 225-234.

Ellesat, K. S., Yazdani, M., Holth, T. F., Hylland, K., 2011. Species-dependent sensitivity to contaminants: An approach using primary hepatocyte cultures with three marine fish species. Marine Environmental Research. 72: 216-224.

Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Rocha, E. and Salgado, M. A., 2008. Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos, Portugal: liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. Environmental Monitoring and Assessment, 145: 315-322.

Fent, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. Txicology in Vitro, 15: 477- 488.

Fraslin, J. M., Kneip, B., Vaulint, S., Glaise, D., Munnich, A., Guguen-Guillouzo, C., 1985. Dependence of hepatocyte-specific gene expression on cell-cell interactions in primary culture. EMBO J. 4: 2487-2491.

Gernhofer, M., Pawet, M., Schramm, M., Muller, E. and Triebskorn, R., 2001. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. Journal of Aquatic Ecosystem. Stress and Recovery, 8: 241-260.

Hernandez-Garcia, A., Romero, D., Gomez-Ramirez, P., Maria-Mojica, P. and Martinez-Lopez, E., 2014. In vitro evaluation of cell death induced by cadmium, lead and their binary mixtures on erythrocytes of common buzzard (*Buteo buteo*). Toxicology in vitro, 28: 300-306.

Hinton, D. e. and Lauren, D. J., 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: Adams, S. M. (Ed.), Biological Indicators of Stress in Fish: American Fisheries Symposium 8. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 51-66.

Kocal, T., Quinn, B. A., Smith, J. R., Ferguson, H. W., Hayes, M. A., 1987. Use of trout serum to prepare primary attached monolayer cultures of hepatocytes from rainbow trout (Salmo gairdneri). In Vitro Cellular & Develompent Biology. 24: 304-308.

Koment, R. W., Haines, H., 1982. Characterization of a reptilian epitheloid skin cell line derived from the green sea turttle, *Chelonia mydas*. In Vitro. 18, 227- 232.

Lai, Y-S., Murali, S., Ju, H- Y., Wu, M- F., Guo, I- C., Chen, S-C., Fang, K., Chang, C-Y., 2000. Two iridovirus-susceptible cell lines established from kidney and liver of grouper, Epinephelus awoara (Temminck & Schlegel), and partial characterization of grouper

iridovirus. Journal of Fish Diseases. 23: 379-388.

Lu, Y., Lannan, C. N., Rohovec, J. S. and Fryer, J. L., 1990. Fish cell lines: establishment and characteriza of three new cell lines from grass carp (*Ctenopharygodon idella*). In Vitro Cellular and Development Biology. 26: 275-279.

Jefferson, D. M., Clayton, D. F., Darnell, J. E. Jrtion., Reid, L. M., 1984. posttrascriptional modulation of gene expression in cultured rat hepatocytes. Mol Cell Biol. 4: 1929-1934.

Montero, M., Le Belle, N., Vidal, B. and Dufour, S., 1996. Primary cultures of dispersed pituitary cells from estradiol-pretreated female liver eels (*Anguilla anguilla*): Immunocytochemical characterization of gonadotropic cells and stimulation of gonadotropin release. General and Comparative Endocrinology, 104 (1), pp:103-115.

Randal, J. E., 1995. Coastal fishesh of Oman. University of Hawaii, Honolulu.

Roy, S., Chattoraj, A. and Bhattacharya, S., 2006. Arsenic induced changes in optic tecal histoarchitecture and acetyleholinesterase acetylcholine profile in *Channa punctatus:* amelioration by selenium. Comparative Biochemistry and Physiology. 144(1): 16-24.

Salamat, N., 2008. Study on the histological structure, cell culture and gonadotropic secretory functions of pituitary via effects assessment of these secretions on ovary in Common Carp, *Cyprinus carpio*. Ph.D. thesis, Shahid Chamran University. 145p.

Salvo, L. M., Malucelli, M. I. C., 2000. Primary culture of hepatic cells from *Metynnis roosevelti* (Pisces, Teleostei, Characidae). Braz. J. vet. Res. Anim. Sci. v. 37. n. p. 366-371.

Schimer, K., 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to estabilish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. Txicology, 224: 163-183.

Softeland, L., Holen, E., Olsvik, P. A., 2010. Toxicological application of primary hepatocyte cell cultures Atlantic cod (Gadus morhua)- Effects of BNF, PCDD and Cd. Comparative Biochemistry and Physiology. 151: 401-411.

Tju, G., Abdul Majeed, S., Nambi, K. S. N., Sarath Babu, V., Vimal, S., Kamatchiammal, S. and Sahul Hammeed, A. S., 2012. Comparison of in vivo acute toxicity assays in Etroplus suratensis (Bloch, 1970) and its three cell lines in relation to tannery effluent. Chemosphere, 87: 55-61.

Van Dyk, J. C., Pieters, G. M. and Vuren, J. H. J., 2007. Histollogical changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. Ecotoxicology and Environmental Safety, 66: 432-440.

Wolf, K., 1988. Fish Viruses and fish viral disease. Cornell University Press, New York.

Wolf, K. and Quimby, C., 1976. Primary monolayer culture of fish cells inhibited from trypsinized tissue. TCA Manual. 2: 435-456.

Zhou, B., Liu, C., Wang, J., Lam, K. S., Wu, R. S.S., 2006. Primary cultured cells as sensitive in vitro model for assessment of toxicants-comparison to hepatocytes and gill epithelia. Aquatic Toxicology. 80: 109-118

.

Introducting the best cell culture method for primary hepatocyte from Orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides*

Derakhshesh, Negin[1]. Movahedinia, Abdolali[*1&2]. Salamat, Negin[1]. Hashemitabar, Mahmoud[3]. Bayati, Vahid[3]

1. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technolgy
2. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, University of Mazandaran, Babolsar
3. Jondi Shapour University of Medical Sciences, Ahvaz

Abstract

Liver is one of the most important organs in vertebrates that have important roles in detoxifying. This organ was used as a target organ in many physiological and toxicological aspects. The main purpose of the present study was developing appropriate methodology for the primary cultivation of hepatic cells from orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides*, a subtropical fish species of the family Serranidae. In present study, hepatocytes were isolated from five grouper individuals. Initially, the fish wiped with 70% ethanol. Liver were removed and cut into small pieces with scissors and hepatocytes were disconnected using different enzymatic digestion with collagenase (Type 1 and 4) and trypsin and additional nutrient materials in culturing mediums. Then, cells were cultured for 2 weeks in Lebowitz L-15 under 3 methods: 1. Using enzymatic digestion by trypsin, 2. Using enzymatic digestion by collagenase (type 1 and 4) and 3. Using nutrients and additives was cultured. Finally, effects of different incubation temperature (20, 25, 28, 30 and 32 degree of Celsius) and Bovine serum content (0, 10 and 20% and 20%+ITS) on cell growth were estimated. According to the results, digestion by collagenase type 4, resulted in more cell colonization and growth in comparison with other methods. At the same method, cells showed fibroblastic morphology. In conclusion, the best culture method for primary hepatocyte from orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides*, was using ITS+20%FBS under 30 degree of Celsius incubation temprature.

Keywords: Primary cell culture, hepatocyte, Orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides*

Fig1. Using of different methods for hepatocyte culture from Orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides*.

Fig2. Effects of different incubation temperatures on hepatocytes growth in Orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides*.

Fig3. Effects of different FBS on hepatocytes growth in Orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides*.

Fig4. Hepatocytes in culture medium without FBS after 15days cell culture period.

Fig5. Hepatocytes in culture medium after 5days cell culture period: A. With 10%FBS. B. With 20%FBS.

Corresponding author: amovahedinia@yahoo.com