جداسازی، کشت و شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی مغز تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

- **حدیثه کشیری***: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق‌پستی:۱۵۷۳۹ –۴۹۱۳۸
- **علی شعبانی**: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق‌پستی:۱۵۷۳۹ –۴۹۱۳۸
- **کامران حیدری**: دانشگاه علوم پزشکی گرگان، صندوق‌پستی: ۶۱۹
- **محمدرضا ایمانپور**: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق‌پستی:۱۵۷۳۹ –۴۹۱۳۸
- **محسن سعیدی**: دانشگاه علوم پزشکی گرگان، صندوق‌پستی: ۶۱۹

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۲

چکیده:

در بررسی حاضر، تلاش شد تا از بخش‌های مختلف مغز تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*, chondrostei) به‌عنوان یک ماهی غضروفی–استخوانی کشت سلول بنیادی عصبی تهیه گردد. بدین منظور، بخش‌های تلن سفالن، مزن سفالن و متن سفالن مغز تاسماهی ایرانی جداسازی، در محیط DMEM/F12 غنی شده با سرم گاوی جنینی (20% FBS) کشت داده شده و در دمای ۲۵^{0}C با ۵٪CO2 نگهداری شدند. محیط کشت هر سه روز یک‌بار تعویض و با محیط تازه جایگزین گردید. سلول‌های حاصله پس از گذشت ۳–۲ هفته متلاقی و پاساژ داده شدند. سلول‌های کشت متن سفالن (مخچه) مغز تاسماهی ایرانی (CPS) پس از طی بیش از ۷ ماه و ۹ پاساژ هم‌چنان زنده بوده و ذخایر آن در آزمایشگاه موجود است. کشت‌های سلولی به‌دست آمده، با استفاده از ازت مایع منجمد شدند. میزان بازمانی سلول‌ها پس از انجماد زدایی ٪۷۰ بود. در بررسی ایمنوسیتوشیمیایی، سلول‌های موجود در کشت (کشت CPS)، واکنش مثبت به آنتی بادی ضد نستین به‌عنوان یک مارکر سلول‌های بنیادی عصبی نشان دادند. با توجه به پایداری کشت‌های به‌دست آمده به‌ویژه کشت CPS می‌توان آن را به‌عنوان یک کشت طولانی مدت پایدار در نظر گرفت.

کلمات کلیدی: آنتی بادی، تاسماهی ایرانی، سلول بنیادی، کشت، مغز

* پست الکترونیک نویسنده مسئول : hadiskashiri@gmail.com

مقدمه

ظرفیت خودنوزایی[1] و توانایی بازسازی مجدد یک بافت را می‌توان به‌عنوان تعریف کلاسیکی از سلول‌های بنیادی بیان نمود (Servilia و همکاران، ۲۰۰۸). در واقع، سلول‌های بنیادی دارای دو ویژگی اساسی یعنی توانایی تقسیم و تولید سلول‌هایی با ویژگی‌های یکسان (خود نوزایی) و ایجاد انواع سلول‌های تمایزیافته می‌باشند (بهاروند، ۱۳۸۶). مشخص شده که سلول‌های بنیادی در اغلب بافت‌های ماهیان استخوانی از جمله مغز وجود داشته (Chapouton و همکاران، ۲۰۰۷؛ Hinsch و Zupanc، ۲۰۰۶) و ماهیان توانایی رشد نامحدودی در مقایسه با رشد محدود پستانداران دارا می‌باشند. در واقع، با رشد ماهی، سلول‌های جدید در تمامی بافت‌ها از جمله بافت عصبی تولید می‌شود.

نوروژنزیز در مهره داران بالغ (تولید نورون‌های جدید طی دوره بزرگسالی) پدیده‌ای است که در مغز تمامی مهره‌دارانی که تاکنون مورد بررسی قرار گرفته‌اند، وجود دارد. این گونه‌ها شامل ماهیان استخوانی حقیقی(Zupanc و Zupanc، ۲۰۰۶؛ Zupanc، ۲۰۰۶؛ Otteson و Hitchkock، ۲۰۰۳)، دوزیستان (Polenov و Chetverukhin، ۱۹۹۳)، خزندگان (Font و همکاران، ۲۰۰۱)، پرندگان (Nottebohm، ۲۰۰۲) وپستانداران (Taupin و Gage، ۲۰۰۲؛ Gage، ۲۰۰۲) می‌باشد. علی‌رغم وجود نوروژنزیز در مهره داران، تفاوت‌های آشکاری بین رده‌های مختلف مهره داران وجود دارد. بررسی‌ها نشان داده که نوروژنزیز در مغز پستانداران تنها در ناحیه محدودی از تلن سفالن رخ می‌دهد (Ming و Song، ۲۰۰۵). مکانیزم‌های مولکولی تنظیم‌کننده این پدیده نیز تا حد زیادی ناشناخته می‌باشد (Alvarez-Buylla و Lim، ۲۰۰۴). برخلاف پستانداران، سلول‌های تکثیر شونده در مغز ماهیان استخوانی حقیقی در خارج از تلن سفالن نیز وجود داشته (Kaslin و همکاران، ۲۰۰۸؛ Chapouton و همکاران، ۲۰۰۷) و مغز به رشد خود در دوران بلوغ نیز ادامه می‌دهد (Kaslin و همکاران، ۲۰۰۸؛ Hinsch و Zupanc، ۲۰۰۶). تحقیقات نشان داده که ماهیان ظرفیت بالایی در ترمیم بافت عصبی پس از جراحت دارند (Udvaia، ۲۰۰۸؛ Chapouton و همکاران، ۲۰۰۷). این ویژگی ماهیان، موجب عملکرد بهینه آن‌ها جهت بهبود ناحیه آسیب دیده بوده (Larner، ۱۹۹۵) که دلیل آن به عوامل مختلفی هم‌چون پایداری نواحی تکثیر شونده حاوی سلول‌های بنیادی عصبی در ماهی نسبت داده می‌شود (Hinsch و Zupanc، ۲۰۰۶؛ Grandel و همکاران، ۲۰۰۶).

درک پروسه‌های فیزیولوژیک در گونه‌های مختلف ماهیان به‌ویژه گونه‌هایی با ارزش تجاری بالا هم‌چون ماهیان خاویاری، نیازمند انجام بررسی‌های پایه و کاربردی روی بافت‌های عصبی می‌باشد (Moles و همکاران، ۲۰۰۷؛ Gonzalez-Martinez و همکاران، ۲۰۰۴؛ Bayarri و همکاران، ۲۰۰۴). پایداری سلول‌های تکثیر شونده مغز در سیستم عصبی مرکزی ماهیان امکان ایجاد کشت‌های سلولی پایداری از مغز را فراهم می‌سازد (Servilia و همکاران، ۲۰۰۸). این سلول‌ها می‌توانند دارای پتانسیل بالقوه‌ای جهت کاربرد در بررسی واکنش‌های مختلف به مواد سمی، نوترینت‌ها و فاکتورهای رشد بوده و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان مدلی برای ترمیم عصبی پس از جراحت و هم‌چنین نمایان ساختن مکانیزم‌های نوروتوکسوسیتی، نوروفیزیولوژی و نوراندوکرینولوژی استفاده نمود. با وجود این که نوروژنزیز در سطح بالایی در نواحی گسترده‌ای از سیستم عصبی مرکزی ماهیان استخوانی حقیقی ادامه می‌یابد، اما متاسفانه تاکنون کارهای تحقیقاتی کمی در خصوص امکان کشت سلول‌های عصبی ماهیان صورت گرفته و لاین‌های سلول مغزی بسیار کمی وجود دارد. در این راستا، هیچ‌گونه اطلاعاتی در مورد ماهیان خاویاری به‌عنوان گروه شاخصی از ماهیان غضروفی-استخوانی وجود نداشته و کارهای صورت گرفته در این راستا محدود به بررسی امکان کشت سلولی بخش‌هایی هم‌چون قطعه‌ای از باله سینه‌ای *Acipenser mikadoi* (Vishnyakova و همکاران، ۲۰۰۹)، بخش قدامی کلیه *Acipenser baerii* (Cibea و همکاران، ۲۰۰۸) و یا بخش کاردیاک *Acipenser oxyrhynchus* (Vivian Marrayatt و همکاران، ۱۹۸۵) بوده و تاکنون گزارشی در خصوص امکان ایجاد کشت‌های پایدار از سلول‌های مغز این ماهیان ارزشمند منتشر نشده است. با توجه به اهمیت ماهیان خاویاری و هم‌چنین اهمیت و نیاز به ایجاد لاین‌های سلولی حاصل از مغز، در بررسی حاضر تلاش گردید تا از بخش‌های مختلف مغز تاسماهی ایرانی به‌عنوان نماینده‌ای از ماهیان غضروفی-استخوانی، کشت‌های سلولی طولانی مدت تهیه شود.

[1] Self renewal

مواد و روش‌ها

ماهیان

تاسماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*, chondrostei) از کارگاه شهید مرجانی گرگان، ایران، تهیه و به مرکز آبزی پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شدند. ماهیان در تانک‌های ۲۰۰۰ لیتری در درجه حرارت ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد، میزان اکسیژن ۶/۵ میلی‌گرم در لیتر و pH تقریبا ۸ نگهداری شدند. تاسماهیان روزانه دوبار با غذای بیومار تغذیه شدند.

جمع‌آوری بافت

به‌منظور تهیه اولین کشت سلولی، تاسماهیان ایرانی با وزن متوسط ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم با قرار گرفتن در آب حاوی پودر گل میخک (۰/۵گرم در لیتر) بی‌هوش و پس از سرزنی، مغز آنان تحت شرایط استریل از جمجمه جدا گردید. نمونه‌های بافتی به‌دست آمده از بخش‌های تلن سفالن (لوب بویایی)، مزن سفالن (لوب بینایی) و متن سفالن (مخچه) پس از یک بار شستشو با محلول نمکی بالانس شده Hank (HBSS) (Bio idea)، در لوله‌های آزمایش استریل حاوی HBSS، آنتی‌بیوتیک (AB) (Gibco) و آنتی میکوتیک (AM) (Gibco) (پنی‌سیلین/ استرپتومایسین و آمفوتریسین) (AB/AM×۲) قرار داده شدند (Servilia و همکاران، ۲۰۰۸).

کشت سلولی

بدین منظور از روش مورد استفاده توسط Servilia و همکاران (۲۰۰۸) با اندکی تغییر استفاده شد. نمونه‌های بافتی به‌دست آمده به‌صورت مکانیکی از طریق پیپتینگ با استفاده از پیپت‌های پاستور استریل، هموژنیزه گردیدند. سپس سلول‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در معرض محلول آنزیمی Tripsin-EDTA (Gibco) قرار گرفتند. پس از آن، به سلول‌ها محیط کشت DMEM/F12 (Bio idea) غنی شده با سرم گاوی جنینی ٪۲۰ (FBS) و آنتی‌بیوتیک و آنتی میکوتیک (AB/AM ×۲) به‌منظور توقف فعالیت آنزیمی قبل از سانتریفیوژ (۳۰۰۰rpm، ۵ دور دقیقه)، اضافه گردید. سلول‌های پلت شده با افزودن محیط کشت DMEM/F12 و پیپتینگ به حالت تعلیق در آمدند. سپس سوپ سلولی به دست آمده به فلاسک‌های کشت فیلتردار ۱۲/۵ سانتی‌مترمربع حاوی DMEM/F12، 20% FBS و (×۲) AB/AM انتقال داده شد. محیط کشت فلاسک‌ها هر ۲ روز یک بار تغییر و با محیط جدید جایگزین شدند. هنگامی که سلول‌ها متلاقی[1] گشتند، پاساژ داده شدند.

به‌منظور پاساژ سلولی، پس از تخلیه مایع درون فلاسک‌های کشت، به سلول‌های چسبیده به کف فلاسک‌ها Trypsin-EDDTA افزوده شد. سپس با افزودن محیط کشت مورد نظر، و انتقال به لوله‌های فالکون، سانتریفیوژ (۳۰۰۰ rpm، ۵ دور دقیقه) انجام گرفت. پس از دور ریختن مایع رویی، به پلت سلولی حاصله محیط کشت تازه افزوده و پس از پیپتاژ به فلاسک‌های کشت حاوی محیط مورد نظر انتقال یافتند. فلاسک‌ها مجدداً به انکوباتور (دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد، ٪5CO2) انتقال داده شدند (Servilia و همکاران، ۲۰۰۸).

انجماد و نگهداری در ازت مایع

جهت حفظ کشت سلول‌های مغزی به‌دست آمده، سلول‌ها تحت شرایط انجماد قرار گرفتند. بدین منظور، سلول‌های کشت CPS مربوط به بخش متن سفالن مغز تاسماهی ایرانی پس از تخلیه محیط داخل فلاسک کشت و شستشو با PBS، در معرض Tripsin-EDTA قرار گرفتند. سپس مقداری FBS به آن اضافه گردید. پس از سانتریفیوژ (۳۰۰۰rpm، ۵ دور دقیقه) و تخلیه مایع رویی، محیط حاوی ٪۹۰ FBS و دی متیل سولفکساید-DMSO ٪۱۰ (Sigma) افزوده، محتویات داخل لوله وارد کرایوویال‌ها گشتند. کرایوویال‌ها ابتدا به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد و در نهایت در تانک حاوی ازت مایع قرار داده شدند. به‌منظور انجمادزدایی، محتویات داخل کرایوویال‌ها به لوله‌های استریل انتقال یافته و با PBS شستشو داده شدند. سپس، سانتریفیوژ (۳۰۰۰rpm، ۵ دور دقیقه) انجام گرفت. پس از دور ریختن مایع رویی، پلت در محیط رشد تازه به حالت تعلیق در آمده و سوپ سلولی حاصله به فلاسک‌های کشت انتقال یافت. با استفاده از رنگ تریپان بلو (Bio idea) نیز میزان زنده ماندن سلول‌ها پس از انجماد زدایی بررسی گردید(Servilia و همکاران، ۲۰۰۸).

شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی با استفاده از روش ایمنوسیتوشیمیایی

به‌منظور شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی مغز تاسماهی ایرانی، از روش ایمنوسیتوشیمیایی استفاده شد. بدین منظور، سلول‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت بر لامل‌های استریل

[1] confluent

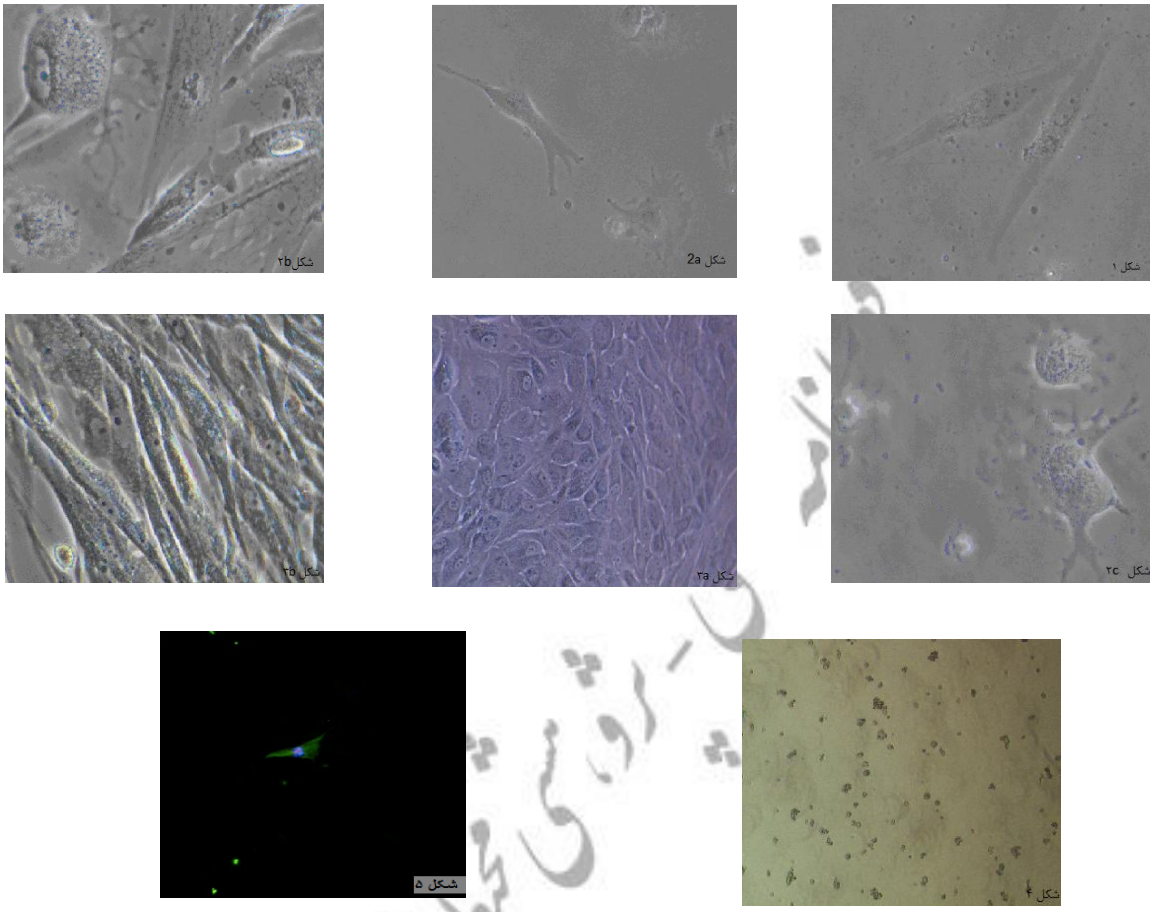
پوشیده با پلی-ال-لایزین رشد داده شده، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با پارافرمالدئید فیکس و با PBS حاوی Triton X-100 شستشو داده شدند. از آنتی بادی ضد نستین به‌دست آمده از موش (تولید شده توسط پژوهشگاه ابن سینا) به‌عنوان مارکر سلول‌های بنیادی عصبی استفاده گردید. آنتی بادی مذکور در PBS x-100 تریتون ٪۳، رقیق سازی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سلول‌ها با آنتی بادی ثانویه (Rabbit anti-mouse Ig همراه با FITC) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. سپس سلول‌ها با PBS شستشو و با استفاده از محیط Gel Mount aqueous Mounting، با میکروسکوپ اینورت فلورسنت مشاهده شدند. در تیمار شاهد نیز از سرم نرمال به جای آنتی بادی اولیه یا ثانویه استفاده گردید.

نتایج

در این تحقیق سه بخش تلن سفالن (لوب بینایی)، مزن سفالن (لوب بینایی) و متن سفالن (مخچه) مغز تاسماهی ایرانی جداسازی و سلول‌های آن کشت داده شدند. سوپ سلولی حاصل از بخش‌های مختلف بافت مغز به‌صورت جداگانه پس از گذراندن مراحل جداسازی و کشت، در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع مخصوص کشت حاوی محیط DMEM، 20%FBS، پنی‌سیلین/استرپتومایسین و آمفوتریسین قرار داده شدند. محتویات به‌دست آمده از مغز در ابتدا به‌صورت معلق در این فلاسک‌ها قرار داشتند. سلول‌ها، ۴۸ ساعت پس از کشت با استفاده از میکروسکوپ اینورت بررسی و مشاهده شدند، مشخص گردید که سلول‌های حاصله به کف فلاسک‌ها چسبیده‌اند. سلول‌ها و اجزای بافتی که به کف نچسبیده بودند ۴۸ ساعت بعد از کشت، با تعویض محیط خارج شدند. سلول‌های چسبیده به کف فلاسک‌های کشت غالباً دوکی شکل بودند (شکل ۱)، هم‌چنین بین سلول‌های به‌دست آمده از سه بخش مغز نیز از نظر مورفولوژی تفاوت خاصی مشاهده نشد. با گذشت زمان، برخی سلول‌های چسبیده به کف، از حالت کشیده و دوکی شکل به سمت شکل سلول‌های عصبی[1] و حالت چند وجهی تمایل پیدا کردند (شکل۲a,b ,c). سلول‌ها به رشد و تکثیر خود ادامه دادند تا پس از گذشت ۳-۲ هفته از کشت، متلاقی(Confluent) و کف فلاسک‌های کشت را پر کرده و آماده اولین پاساژ سلولی شدند (شکل۳a,b). طی پاساژ سلولی با افزودن Tripsin-EDTA، سلول‌ها در فلاسک کشت به حالت معلق درآمدند (شکل ۴) که پس از طی این مرحله سلول‌ها مجدداً به کف فلاسک‌ها چسبیدند. شایان ذکر است طی مدت کشت، سلول‌ها با افزایش مقدار کمی از FBS (از ٪۱۵ به ٪۲۰) کمی تحریک شده و رشد بهتری نشان دادند، لذا در ادامه کار از میزان 20% FBS استفاده گردید. در اولین تلاش برای کشت سلولی، سلول‌های کشت داده شده از نواحی مختلف مغز به مدت تقریباً هشت هفته طی ۳ پاساژ در CO2 انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد زنده مانده و تکثیر شدند که متاسفانه پس از طی این مدت تمامی کشت‌ها دچار آلودگی شدید شده و از بین رفتند. پس از مشاهده این آلودگی، با استریل‌سازی کامل فضای آزمایشگاه و محیط داخل انکوباتور با استفاده از الکل اتیلیک و هم‌چنین استفاده از فلاسک‌های کشت فیلتردار به‌جای فلاسک‌های معمولی، مجدداً کشت سلولی از سه ناحیه مذکور مغز تاسماهی ایرانی صورت گرفت. کشت‌های سلولی حاصله از نواحی تلن سفالن و مزن سفالن مغز تاسماهی ایرانی به‌ترتیب تا مدت حدوداً ۲۶ و ۲۴ هفته طی ۷ و ۶ پاساژ زنده مانده و رشد کردند اما پس از طی این مدت، کشت‌های سلولی مربوط به این دو بخش از مغز تاسماهی ایرانی ضعیف شده و در نهایت از بین رفتند. این در حالی است که کشت سلولی حاصل از بخش متن سفالن (مخچه) مغز تاسماهی ایرانی (CPS) با گذشت بیش از ۷ ماه از زمان شروع کشت و طی ۹ پاساژ زنده مانده و تاکنون نیز این کشت در انکوباتور و هم‌چنین بخشی از آن به‌صورت منجمد در تانک ازت در آزمایشگاه موجود می‌باشد.

به‌منظور حفظ ذخیره کشت سلولی به‌دست آمده، سلول‌های CPS با استفاده از محیط 90%FBS و 10% DMSO منجمد و در تانک حاوی ازت مایع نگهداری شدند. میزان بازمانی سلول‌های CPS پس از انجمادزدایی و قرارگیری در محیط کشت تازه در فلاسک‌های کشت جدید، ٪۷۰ بود. به‌منظور شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی در کشت نیز از روش ایمنوسیتوشیمیایی با به‌کارگیری آنتی بادی ضد نستین (anti-N) به‌دست آمده از موش استفاده شد. ٪۱۱ سلول‌های موجود در کشت CPS پس از ششمین پاساژ واکنش مثبت به anti-N به‌عنوان یک مارکر سلول‌های بنیادی عصبی نشان دادند (شکل ۵).

[1] Neuron-like



شکل ۱: سلول‌های به‌دست آمده از بافت مغز تاسماهی ایرانی ۴۸ ساعت پس از کشت، سلول‌ها دوکی شکل و به کف فلاسک کشت چسبیده‌اند. شکل ۲(a,b,c): سلول‌های حاصل از بافت مغز تاسماهی ایرانی، برخی سلول‌ها با گذشت زمان از حالت دوکی شکل به سمت سلول‌های عصبی شکل (neuron-like) تغییر یافتند (a-c). شکل ۳(a,b): سلول‌های متلاقی به‌دست آمده از بافت مغز تاسماهی ایرانی، سلول‌ها متلاقی و آماده پاساژ می‌باشند (a: بزرگنمایی10X ، b: بزرگنمایی40X). شکل ۴: سلول‌های به‌دست آمده از بافت مغز تاسماهی ایرانی طی اولین پاساژ، سلول‌ها از کف فلاسک کشت جدا و به صورت معلق در فلاسک در آمده‌اند. شکل ۵: آنالیز ایمنوسیتوشیمیایی سلول‌های جدا شده از بخش متن سفالن مغز تاسماهی ایرانی، سلول با آنتی‌بادی ضد نستین واکنش مثبت نشان داده است.

بحث

کشت لاین‌های سلولی ماهیان در شرایط آزمایشگاهی، دارای اهمیت ویژه‌ای در تحقیقات پایه و کاربردی بوده و تقاضا و نیاز به لاین‌های سلولی قابل رشد و تکثیر در دوره‌های طولانی مدت، رو به افزایش است (Ciba و همکاران، ۲۰۰۸). این موضوع به‌ویژه برای گونه‌هایی هم‌چون ماهیان خاویاری که از ارزش تجاری بالایی برخوردارند حائز اهمیت می‌باشد. در بررسی حاضر، سلول‌های مربوط به بخش‌های تلن سفالن (لوب بویایی)، مزن سفالن (لوب بینایی) و متن سفالن (مخچه) مغز گونه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus* , chondrostei) با استفاده از محیط کشت DMEM/F12 و سرم گاوی جنینی (20%FBS) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (5٪CO2) کشت داده شده و سلول‌های بنیادی عصبی حاصله با استفاده از مارکر آنتی نستین شناسایی شدند. تاکنون کارهای تحقیقاتی کمی در این راستا صورت پذیرفته که تمامی آن‌ها محدود به گونه‌های ماهیان استخوانی (هم‌چون ماهی *Dicentrarchus labrax* (Servilia و همکاران، ۲۰۰۸) و *Apteronotus leptorhynchus* (Hinsch و Zupanc، ۲۰۰۶) بوده و تا به امروز هیچ‌گونه گزارشی در خصوص امکان کشت و شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی مغز ماهیان غضروفی و غضروفی-استخوانی صورت نگرفته است. لذا در این تحقیق از مغز تاسماهی ایرانی

(*Asipenser persicus*) به‌عنوان نماینده‌ای از ماهیان غضروفی-استخوانی استفاده گردید.

در بررسی حاضر مشخص گردید که سلول‌های عصبی مغز تاسماهی ایرانی را می‌توان هم‌چون گونه‌های ماهیان استخوانی گزارش شده تا به امروز، در شرایط آزمایشگاهی کشت داد. این تحقیق موفق شد تا کشت‌های حاصله از بخش‌های مختلف مغز تاسماهی ایرانی را به‌مدت بیش از پنج ماه حفظ نماید. از این کشت‌ها می‌توان در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف استفاده نمود.

کشت‌های سلولی به‌دست آمده در این تحقیق، دارای پایداری بالایی بودند که می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که مغز تاسماهی ایرانی به‌عنوان یک ماهی غضروفی-استخوانی دارای ظرفیت تکثیر بالایی می‌باشد. در این راستا، کشت‌های سلولی مربوط به بخش‌های تلن سفالن (لوب بویایی) و مزن سفالن (لوب بینایی) مغز تاسماهی ایرانی به‌مدت تقریبا ۲۶ و ۲۴ هفته به رشد خود ادامه دادند که پس از مدتی رشد این سلول‌ها کاهش یافت و به‌تدریج سلول‌های مربوط به این دو بخش از دست رفتند، این در حالی است که سلول‌های کشت CPS مربوط به بخش متن سفالن (مخچه) مغز به‌مدت بیش از ۷ ماه طی ۹ پاساژ حفظ شده و ذخایر آن نیز هم‌چنان در آزمایشگاه، هم در انکوباتور و هم به صورت منجمد در تانک ازت مایع موجود می‌باشد. در تحقیق صورت گرفته در خصوص ایجاد کشت سلولی طولانی مدت از سلول‌های بنیادی عصبی مغز ماهی سیم دریایی (*Dicentrarchus labrax*) مشخص گردید که سلول‌های زنده را می‌توان از بخش‌های مختلف مغز این ماهی به‌دست آورد (Servilia و همکاران، ۲۰۰۸). محققین در این بررسی توانستند علی‌رغم از دست دادن بخشی از کشت‌های سلولی به‌دست آمده از نواحی مختلف مغز این ماهی استخوانی، کشت SBB-W1 مربوط به بخش مخچه و تگمنتوم مغز این ماهی را طی ۲۴ پاساژ حفظ نموده و آن را به عنوان یک سل لاین پایدار معرفی نمودند. Hinscha و Zupanc (۲۰۰۶) نیز در تحقیقی در راستای جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی عصبی از مغز ماهی استخوانی *Apteronotus leptorhinchus* توانستند سلول‌های بنیادی حقیقی را از بخش‌های تلن سفالن، کورپوس سربلی و والوولا سربلی این ماهی جداسازی کرده و ویژگی‌های آن را در شرایط آزمایشگاهی بررسی نمایند. با توجه به کشت‌های سلولی به‌دست آمده در این تحقیق، می‌توان عنوان داشت که اگرچه از تمامی بخش‌های مغز تاسماهی ایرانی می‌توان کشت سلولی تهیه نمود اما از بخش متن سفالن (مخچه) مغز این ماهیان می‌توان کشت پایدارتر و بهتری به‌دست آورد به‌طوری‌که می‌توان آن را به‌عنوان یک کشت طولانی مدت پایدار در نظر گرفته و از آن در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف از جمله ویروس‌شناسی (هم‌چون نوداویروس‌ها) استفاده نمود.

در بررسی‌های پیشین در خصوص ماهیان استخوانی بیان شده که مغز این ماهیان به‌ویژه بخش مخچه آن‌ها دارای ظرفیت تکثیر شوندگی بالایی می‌باشد (Zupanc و Ott، ۱۹۹۹). در تحقیق صورت گرفته روی کفشک ماهی و سیم دریایی نیز وجود تعداد بالای سلول‌های تکثیر شونده در ناحیه مخچه مغز این ماهیان استخوانی تایید شده است (Servilia و همکاران، ۲۰۰۸). محققین بیان نمودند که احتمالاً سلول‌های بنیادی عصبی از نواحی تکثیر شونده در مغز ماهیان منشا می‌گیرند (Zupanc و Horschke، ۱۹۹۵)، در واقع در مغز به ویژه بخش مخچه در ماهیان استخوانی سلول‌های بنیادی وجود دارند که مسئول نوروژنزیز در این نوع ماهیان می‌باشند (Zupanc و Clint، ۲۰۰۳) و سلول‌های موجود در این نواحی، به رشد و تقسیم خود در مغز طی دوره بلوغ ادامه می‌دهند (Zupanc و همکاران، ۲۰۰۵؛ Zupanc و همکاران، ۱۹۹۶). در این بررسی کشت سلولی به‌دست آمده قابلیت بالایی در تکثیر نشان داد لذا می‌توان بیان داشت که احتمالاً سلول‌های بنیادی در کشت حضور دارند. برای تایید این موضوع، از آنتی بادی ضد نستین به‌عنوان یک مارکر سلول‌های بنیادی عصبی استفاده گردید. متاسفانه به‌دلیل این‌که آنتی بادی اختصاصی برای این ماهیان وجود ندارد، در بررسی حاضر از آنتی بادی حاصل از پستانداران (آنتی بادی ضد نستین به‌دست آمده از موش) برای شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی استفاده گردید. در واقع تولید و توسعه آنتی بادی‌های اختصاصی برای این منظور، مهم به‌نظر می‌رسد زیرا معمولاً واکنش پذیری آنتی بادی‌های ضد پروتئین‌های پستانداران پایین می‌باشد (Grunow و همکاران، ۲۰۱۱). در این تحقیق، بررسی ایمنوسیتوشیمیایی با استفاده از آنتی بادی ضد نستین واکنش مثبت برخی سلول‌ها با آنتی بادی مذکور را نشان داد. بنابراین با توجه به بیان آنتی بادی ضد نستین توسط برخی سلول‌های موجود در کشت (CPS)، وجود سلول‌های بنیادی عصبی در بین سلول‌های به‌دست آمده از مغز تاسماهی ایرانی را می‌توان تایید نمود. با در نظر گرفتن دوام و پایداری کشت‌های سلولی حاصل از مغز تاسماهی ایرانی می‌توان بیان داشت که مغز این ماهیان به‌ویژه بخش متن سفالن آن‌ها دارای ظرفیت تکثیر شوندگی بالایی می‌باشد. با توجه به پایداری و بقای

طولانی مدت کشت CPS حاصل از ناحیه متن سفالن (مخچه) مغز تاسماهی ایرانی، به‌دنبال آن بوده تا بتوان این کشت ارزشمند را به‌عنوان یک سل لاین در پایگاه اطلاعاتی بین المللی سل لاین ثبت نموده و به کاربرد تجاری جهت انجام تحقیقات مختلف به‌ویژه تحقیقات نوروبیولوژی رسید.

این تحقیق موفق شد از بخش‌های تلن سفالن (لوب بویایی)، مزن سفالن (لوب بینایی) و متن سفالن (مخچه) مغز تاسماهی ایرانی کشت‌های سلولی تهیه کند که در این میان کشت حاصل از ناحیه متن سفالن (حاوی مخچه)، پایداری بالاتری نسبت به کشت‌های حاصل از سایر نواحی مغز نشان داد. این در حالی است که در بررسی‌های پیشین در خصوص ماهیان استخوانی نیز فعالیت بالای تکثیر شوندگی در بخش مخچه این ماهیان تایید شده بود. با توجه به نتایج حاصله از این تحقیق و نتایج حاصل از تحقیقات مشابه صورت گرفته روی برخی ماهیان استخوانی، به‌نظر می‌رسد بین این ماهیان و تاسماهی ایرانی به عنوان یک ماهی غضروفی-استخوانی از نظر ظرفیت بالای تکثیر شوندگی مغز شباهت‌های زیادی وجود داشته باشد. با توجه به دوام بالای سلول‌های کشت CPS مربوط به ناحیه متن سفالن مغز می‌توان از آن در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف استفاده نمود.

تشکر و قدردانی:

از کلیه عزیزان به‌ویژه کارشناسان آزمایشگاه و سالن آبزی پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به‌ویژه مهندس جافر که در این انجام این پروژه یاری رساندند سپاسگزاری می‌شود. از پروفسور هونگ عضو هیات علمی National university of Singapore به‌دلیل راهنمایی‌های علمی قدردانی می‌گردد. هم‌چنین از مرکز تحقیقاتی ابن سینای ایران، تهران، به‌ویژه آقای مهندس محمودی نیز به‌دلیل راهنمایی و کمک در بحث ایمنوسیتوشیمیایی این تحقیق نهایت سپاسگزاری به‌عمل می‌آید.

منابع

۱- **بهاروند، ح.، ۱۳۸۶.** سلول‌های بنیادی جنینی، نشر تهران، خانه زیست‌شناسی. ۲۸۰ صفحه.

2- **Alvarez-Buylla, A. and Lim, D.A., 2004.** For the Long Run: Maintaining Germinal Niches in the Adult Brain, Neuron. 41:683-686.

3- **Bayarri, M.J.; Iigo, M.; Muñoz-Cueto, J.A.; Isorna, E.; Delgado, M.J.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. and Alonso-Gómez, A.L., 2004.** Binding characteristics and daily rhythms of melatonin receptors are distinct in the retina and the brain areas of the European sea bass retina (*Dicentrarchus labrax*), Brain Res.1029:241–250.

4- **Chapouton, p.; Jagasia, R. and Bally-Cuif, L., 2007.** Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. BioEssays. vol. 29, No. 8, pp. 745–757.

5- **Ciba, p.; Schicktanz, S.; Anders, E.; Siegl, E.; Stielow, A.; Klink, E. Kruse, C., 2008.** Long- term culture of a cell population from Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) head kidney. Fish Phsiol Biochem. Vol. 34, No. 4, pp. 367-372

6- **Font, E.; Desfilis, E.; Pérez-Cañellas M.M. and García-Verdugo, J.M., 2001.** Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. Brain Behav Evol. 58:276–295.

7- **Gage, F.H., 2002.** Neurogenesis in the adult brain. J Neurosci. 22:612–613.

8- **González-Martínez, D.; Madigou, T.; Mañanos, E.; Cerdá-Reverter, J.M.; Zanuy, S.; Kah, O. and Muñoz-Cueto, J.A. 2004.** Cloning and expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in the brain and pituitary of the European sea bass: an in situ hybridization study. Biol. Reprod. 70: 1380–1391.

9- **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. Dev. Biol. vol. 295, No. 1, pp. 263–277.

10- **Grunow, B.; Noglick, C.; Kruse, C. and Gebert, M., 2011.** Isolation of cells from Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus* and optimization of culture conditions. Aquat Biol. 14:67-75.

11- **Hinsch, K. and Zupanc, G.K., 2006.** Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain. J. Neurosci. Methods. 158:75–88.

12- **Kaslin, J.; Ganz, J. and Brand, M., 2008.** Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 363:101–122.

13- **Larner, A.J.; Johnson, A.R. and Keynes, R.J., 1995.** Regeneration in the vertebrate central nervous system: phylogeny, ontogeny,

and mechanisms. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. Vol. 70, No. 4, pp. 597–619.

14- **-Ming, G.L. and Song, H., 2005.** Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci. 28:223-250.

15- **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.*). Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 150, No. 1, pp. 75–86.

16- **Nottebohm, F., 2002.** Neuronal replacement in adult brain. Brain Res Bull. 57:737–749.

17- **Otteson, D.C. and Hitchcock, P.F., 2003.** Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. Vision Res. 43:927–936.

18- **Polenov, A.L. and Chetverukhin, V.K., 1993.** Ultrastructural radioautographic analysis of neurogenesis in the hypothalamus of the adult frog, *Rana temporaria*, with special reference to physiological regeneration of the preoptic nucleus: II. Types of neuronal cells produced. Cell Tissue Res. 271:351–362.

19- **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.* Comp Biochem Physiol a Mol Integr Physiol. Vol. 152, No. 2, pp. 245-54.

20- **Taupin, P. and Gage, F.H., 2002.** Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. J Neurosci Res. 69:745–749.

21- **Udvadia, A.J., 2008.** Genomic sequence from Takifugu capable of promoting axon growth-associated gene expression in developing and regenerating zebra fish neurons. Gene Expr. Patterns. Vol. 8, No. 6, pp. 382–388.

22- **Vishnyakova, K.S.; Mugue, N.S.; Zelenina, D.A.; Mikodina, E.V.; Kovaleva, O.A.; Madan, G.V. and Yegorov, Y.E., 2009.** Cell culture and karyotype of Sakhalin sturgeon ***Acipenser mikadoi***. Biochem (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. Vol. 3, No. 1, pp. 42-54.

23- **Zupanc, G.K.H., 2006.** Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. J Comp Physiol. 192:649–670.

24- **Zupanc, G.K. and Clint, S.C., 2003.** Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. Glia. Vol. 43, No. 1, pp. 77–86.

25- **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. Exp. Neurol. Vol. 160, No. 1, pp. 78–87.

26- **Zupanc, G.K. and Horschke, I., 1995.** Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. J. Comp. Neurol. Vol. 353, No. 2, pp. 213–233.

27- **Zupanc, G.K.H. and Zupanc, M.M., 2006.** New neurons for the injured brain: mechanisms of neuronal regeneration in adult teleost fish. Regenerative Med. 1:207–216.

28- **Zupanc, G.K.; Hinsch, K. and Gage, F.H., 2005.** Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. J Comp Neurol. 488:290–319.

29- **Zupanc, G.K.; Horschke, I.; Ott, R. and Rascher, G.B., 1996.** Postembryonic development of the cerebellum in gymnotiform fish. J Comp Neurol. 370:443–464.

Isolation, Cultivation and Characterization of Neural stem cells from Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Brain

- **Hadiseh Kashiri**[*]: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 49138-15739, Gorgan, Iran
- **Ali Shabani:** Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 49138-15739, Gorgan, Iran
- **Kamran Haidari:** Gorgan University of Medical Sciences, P.O.Box: 619, Gorgan, Iran
- **Mohammad Reza Imanpour:** Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 49138-15739, Gorgan, Iran
- **Mohsen Saeedi**: Gorgan University of Medical Sciences, P.O.Box: 619, Gorgan, Iran

Received: April 2013 Accepted: May 2013

Keywords: Antibody, Persian sturgeon, stem cell, culture, brain.

Abstract

In the present study, we tried to cultivate neural stem cells from different regions of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) brain, as a chondrostei fish. For this, telencephalon, mesencephalon and metencephalon of the brain were separated, cultivated in DMEM/F12 medium supplemented with fetal bovine serum (20% FBS) and maintained at 25^0C with 5%CO2. Medium was changed every 3s days and replaced with fresh medium. After 2-3 weeks, cells were confluent and passaged. Cells of metencephalon (cerebellum) culture from Persian sturgeon brain (CPS) are still alive after about 7 months and 9 passages and their stocks are available in the laboratory. The cell cultures have been cryopreserved using liquid nitrogen. The survival rate of cells was 70% after thawing. In immonocytochemistry survey, cells were immonopositive for anti-nestin antibody, as a neural stem cell marker. The obtained cultures could be considered as a constant long term culture because of their stability, and could be used in different studies.

*Corresponding author's email: hadiskashiri@gmail.com