بررسی شرایط بهینه تهیه کشت سلولی اولیه از کلیه ماهی سفید (*Rutilus kutum*) به روش کاشتن

سمانه نیک قربان[۱]
سمیه حقیقی کارسیدانی[۲*]
محدث قاسمی[۳]

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

***مسئول مکاتبات:**
haghighikarsidani@yahoo.com

کد مقاله: ۱۳۹۸۰۱۰۷۰۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۰۱
این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

چکیده

کشت سلولی شامل فرایندی است که سلول‌های حاصل از انواع مختلف بافت‌ها در شرایط آزمایشگاهی تکثیر می‌شوند. کشت بافت و توسعه‌ی رده‌ی سلولی از ماهی در جداسازی ویروس‌ها، سم‌شناسی، سرطان‌شناسی، فیزیولوژی سلولی و بیان ژن کاربرد دارد. در این مطالعه کشت اولیه از کلیه تعداد ۱۰ عدد ماهی سفید (*Rutilus Kutum*) به وزن ۱± ۱۲ گرم و میانگین طولی ۱±۱۱ سانتی‌متر از طریق روش کاشتن انجام گرفت. قطعات بافتی در فلاکس‌های حاوی محیط کشت L-15 به همراه آنتی‌بیوتیک‌ها (پنی‌سیلین، استرپتومایسین) و در شرایط متفاوت دمایی (۲۱، ۲۴ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد) و میزان سرم جنین گاوی متفاوت (۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) و در دو محدوده pH (۶/۸ و ۷/۲) کشت داده شدند. نتایج نشان داد که تهیه کشت سلولی اولیه از بافت کلیه ماهی سفید دریای خزر در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۲۰ درصد سرم جنین گاوی در مقایسه با تیمارهای دیگر بهتر انجام می‌شود؛ و همچنین میزان مهاجرت سلول ۸۸/۳۷ درصد محاسبه گردید. تاکنون ۸ پاساژ از این سلول‌ها انجام‌شده است که می‌تواند به تولید رده سلولی از کلیه ماهی سفید دریای خزر در آینده نزدیک منتهی گردد.

واژگان کلیدی: کشت سلولی اولیه، بافت کلیه، ماهی سفید دریای خزر.

مقدمه

شیوع بیماری‌ها در آبزی‌پروری، افزایش آلودگی‌های آبی و پیشرفت‌های اخیر در مطالعات بر روی مواد فعال زیستی با منشأ آبی همه باهم، اشتیاق قابل‌توجهی را در میان پژوهشگران به کار کشت سلولی ماهی ایجاد کرده است. علاوه بر این، اهمیت کشت سلولی ماهی به دلیل کاربردهای بالقوه رده‌های سلولی ماهی در حوزه‌هایی مانند زیست‌شناسی تکاملی ماهی، ایمونولوژی ماهی (Clem *et al*., 1996)، ویروس‌شناسی (Ruiz Kienzler *et al*., 2009؛ Kim *et al*., 2012)، سم‌شناسی (Oh *et al*., 2001؛ Kojima *et al*., 2011؛ Bols *et al*., 2001)، فیزیولوژی (Rode *et al*., 1997)، مطالعات سرطان (Salinas *et al*., 2008)، کاربردهای ترا ریخته (Fan and Collodi, 2002)، مطالعات ایمونولوژی (Goswami *et al*., 2012؛ Bols *et al*., 2001)، غدد (Alok *et al*., 2000؛ Aluru and Vijayan, 2009؛ Thomas, 2012)، عملکرد ژنومیک (Laing and Hansen, 2011)، بیوتکنولوژی (Tafalla *et al*., 2006)، علاوه بر این استفاده از کشت سلول جهت تحقیقات سیتوفیزیولوژی (Maclean, 2011)، تنظیمات ژنتیکی (Holopainen *et al*., 2012؛ Castro *et al*., 2010) افزایش‌یافته است.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) (Kamensky ۱۹۰۱) (Esmaeili *et al*., 2018) از خانواده Cyprinidae مهم‌ترین و یکی از باارزش‌ترین ماهیان، دریای خزر است (خانی پور، ۱۳۶۸). ماهی سفید جزء ماهیان استخوانی و ازلحاظ ارزش غذایی، تأمین‌کننده بخش عمده‌ای از پروتئین موردنیاز جامعه و همچنین از عوامل عمده اشتغال‌زایی و کسب درآمد بسیاری از مردم ساحل‌نشین شمال کشوراست. میزان صید ماهیان استخوانی در سال ۹۵ در استان گیلان ۲۶۷۰ تن و به‌خصوص میزان صید ماهی سفید دریای خزر در سال ۹۵ در استان گیلان ۲۰۹۶ تن گزارش‌شده است (اداره کل شیلات، معاونت صید و بنادر و ماهی گیری، بخش آمار و اطلاعات صید). با توجه به اهمیت این‌گونه و کاهش جمعیت این‌گونه در اثر بهره‌برداری زیاد، وارد شدن سموم کشاورزی، خانگی و صنعتی، کاهش سطح آب دریا و از بین رفتن محل‌های تخم‌ریزی طبیعی و مقاومت پایین در برابر عوامل بیماری‌زای ویروسی و باکتریایی (رضوی صیاد، ۱۳۷۸) و اهمیت زیاد ایجاد رده‌های سلولی از گونه‌های اقتصادی و در معرض خطر در آبزی‌پروری و مدیریت شیلاتی، بر آن شدیم تا با استفاده از تکثیر سلول‌های کلیه این ماهی ارزشمند به روش کشت اولیه در محیط آزمایشگاه بتوانیم گامی مهم جهت تشخیص بیماری‌های ویروسی این ماهی برداریم. ازآنجاکه سموم محیطی تأثیر زیادی بر بافت کلیه ماهیان دارند و همچنین بافت کلیه به‌عنوان ارگان هدف اغلب ویروس‌ها است استفاده از تیره‌های سلولی و کشت‌های اولیه با منشأ بافت کلیه از ماهیان بومی در تشخیص سریع عوامل آلوده‌کننده محیط‌های آبی و عوامل بیماری‌زا کاربرد زیادی دارد.

از بین کشت‌های اولیه ایجادشده از کلیه می‌توان موارد زیر اشاره کرد: کشت اولیه ایجادشده از کلیه با استفاده ازسرم ماهی *Clarias gariepinus* (Rathore *et al*.,2001) کشت اولیه از ماهی *rainbow trou*t (Stafford *et al*.,2001) و همچنین از ماهی کپور (*Cirrhinus mrigala*) (Nanda *et al*.,2014) رده‌های سلولی ایجادشده از کلیه شامل موارد زیر هستند: تیره‌های جداشده از ماهی سالمون *Salmo salar* (ASK)، (Devold *et al*., 2000)، (SHK-1)(Dannevig *et al*.,1997)، (TO) (Wergeland and Jakobsen, 1997)، (H fossilis) از ماهی *Heteropneustes fossilis* (Singh *et al*.,1995)، (KIK) از ماهی گربه‌ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* (Noga and Hartman,1977)، (BPK) از ماهی black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) (Tung *et al*., 1991) و Chen همکاران (۱۹۸۷) نیز رده‌های از کلیه ماهیان زیر تهیه نمود که عبارت‌اند از: (TK-1) از ماهی تیلاپیا هیبرید (*Tilapia sparrmanii*)، (OK) از ماهی Snakehead-Chana (*Channa lucius*)، (BKG) از ماهی Banded Grouper (*Epinephelus awoara*)، (EK-1) از مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonicas*) همچنین دیگر رده‌های ایجادشده از کلیه عبارت‌اند از: (CIK) از ماهی کپور علف خوار (*Ctenopharyngodon idell*a)(Zuo et al.,1986)، (IEK) از ماهی Indian Etroplus (*E. suratensis*) Sarath Babu *et al*.,) (2012)، (SISK) از باس دریایی (*L. calcarife*) (Sahul Hameed *et al*.,2006)، (CSK) از ماهی Snakehead murrel (*Channa striata*) (Abdul majeed *et al*., 2013)، (THK) از ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) (Wen, 2016)، (YTK) از عنبر ماهی ژاپنی (*Seriola quinqueradiata*)(Watanabe *et al*.,1981)، (SBK) از ماهی باس دریایی ژاپنی (*Lateolabrax japonicus*) (Watanabe *et al*.,1981)، (GK) از ماهی گروپر (*Epinephelus awoara*) ((Lai *et al*., 2000)، (TSHKC) از ماهی half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) (Zheng *et al*., 2012)، (SBK-2) از ماهی باس دریایی (Watanable and Yoshimizu,1999).

در این مطالعه با توجه به اهمیت حفظ ذخایر ژنتیکی آبزیان ایران و نیز لزوم تهیه کشت سلولی جانوران بومی برای مطالعات کاربردی، امکان تولید کشت سلولی اولیه از گونه ارزشمند ماهی سفید دریای خزر بررسی‌شده است و تا زمان تنظیم مقاله ۸ پاساژ تهیه گردید تا ضمن دستیابی به روش کار بتوان در آینده اقدام به تهیه تیره‌های سلولی بافت مذکور، انجماد و نگهداری آن به‌صورت بانک سلولی و استفاده از تیره‌های سلولی تهیه‌شده برای مقاصد گوناگون ازجمله تشخیص بیماری‌های ویروسی استفاده نمود.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

مواد و روش‌ها

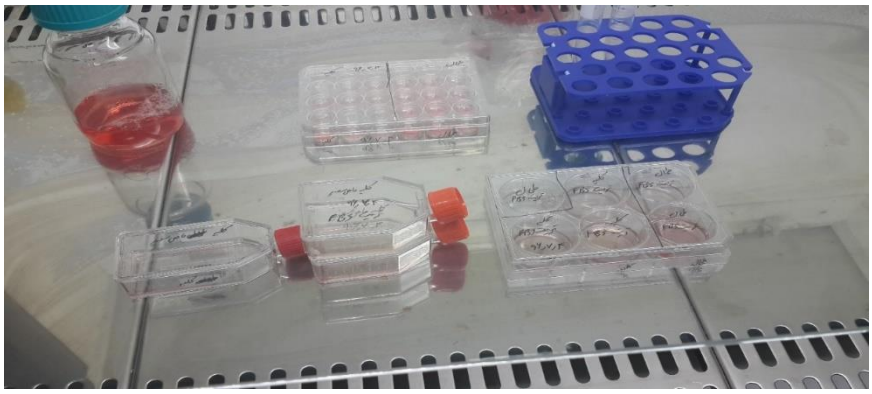
تعداد ۱۰۰ عدد بچه ماهی سفید با وزن ۲-۱ گرم از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری واقع در رشت تهیه گردید و به پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی انتقال داده شد و به مدت ۴ ماه جهت تطابق با شرایط زندگی در محیط آزمایشگاه، افزایش اندازه و تأیید سلامت بچه ماهیان، در آکواریوم‌های ۸۰ لیتری نگهداری و غذادهی روزانه با استفاده از گرانول‌های ساخت شرکت Biomar با توجه به سایز دهانی ماهی انجام‌شده و تعویض آب روزانه انجام گرفت. در طی این مدت هیچ‌گونه تلفاتی وجود نداشت. سپس تعداد ۱۰ عدد ماهی جوان و سالم به وزن ۱± ۱۲ گرم و میانگین طولی ۱±۱۱ سانتی‌متر برای جداسازی بافت کلیه انتخاب گردید.

محیط کشت Leibovitz's L-15 (L-15) ساخت شرکتGibco از کشور آمریکا و سرم جنین گاوی ۲۰ درصد ساخت شرکت Gibco همراه با ضد قارچ آمفوتریسین B و پنی‌سیلین ۱۰۰۰(Iu/ml) و استرپتومایسین ۱۰۰۰ (µg/ml) ساخت شرکت Gibco با آب مقطر دو بار تقطیر دیونیزه استفاده شد. به‌منظور تهیه یک لیتر محیط کشت، g۱۳/۸۶ پودر L-15، ۲۰ درصد سرم جنین گاوی،۵/۲ mg/ml آمفوتریسین B، 10 سی‌سی پنی‌سیلین استرپتومایسین را به آب مقطر ۲ بار تقطیر دیونیزه اضافه کرده و بر روی استیرر قرار داده تا حل شود و پس از حل شدن کامل، استریل گردید. فرآیند استریل کردن محیط کشت با استفاده از استری کاپ با فناوری وکیوم و خلأ ساخت شرکت Milipore آمریکا و در زیر هود لامینار انجام پذیرفت پس از تهیه محیط کشت آن‌ها را داخل بطری‌های درب دار ریخته و درب بطری‌ها به‌وسیله پارافیلم بسته شد تا هیچ‌گونه تبادل هوایی برقرار نشود. محیط کشت مذکور جهت تهیه کشت سلولی تک لایه و پاساژ مورداستفاده قرار گرفت.

۱۰ عدد بچه ماهی به وزن متوسط ۱۰ گرم جداشده و بعد از قرار دادن در آب یخ بیهوش شده (Kamalendra *et al*., 2010; Parameswaran *et al*., 2006) و پس از خشک‌کردن توسط گاز استریل برای حذف آلودگی موجود در لایه موکوسی، شست‌وشو به‌صورت غوطه‌ور کردن در محلول وایتکس ۵ درصد و الکل ۷۰ درصد در پایان در آب مقطر انجام گرفت. سپس بافت کلیه زیر هود لامینار در شرایط استریل جدا گردید و توسط تیغ اسکالپل و قیچی به قطعات کوچک‌تر تبدیل و با محلول PBS استریل شستشو گردید. پس‌ازآن بافت موردنظر در داخل لوله فالکن حاوی محلول PBS ریخته شد و در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۰۵۰rpm در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد.

سپس محیط کشت Leibovitz's L-15 (L-15) ساخت شرکت Gibco از کشور آمریکا همراه با ضد قارچ اضافه گردید و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۵۰rpm در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از اتمام مراحل فوق لوله‌های فالکن را به زیر هود منتقل کرده مقداری محیط کشت داخل لوله ریخته سپس به‌وسیله‌ی پیپت استریل بافت‌ها را برداشته و داخل پلیت ۲۴ خانه و فلاسک ۲۵cm2، به‌صورت ۳ تیمار دمایی متفاوت شامل (۲۱، ۲۴ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد) با غلظت‌های مختلف سرم جنین گاوی (۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) در انکوباتور یخچال دار (Memmert, Germany company) کشت و نگهداری شد. بدین‌صورت که در ابتدا دماهای متفاوت را با غلظت سرم جنین گاوی ۲۰٪ بررسی کرده و سپس دمای بهینه را با مقادیر سرم ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد مقایسه نمودیم و به مدت ۱۴ روز میزان مهاجرت سلول‌ها و افزایش تعداد سلول‌ها بررسی گردید. هردو روز یک‌بار محیط کشت تعویض گردید (شکل ۱).

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]



شکل ۱: کاشت قطعات بافتی در فلاسک و پلیت‌های ٦ خانه و ٢٤ خانه کشت سلولی.

پس از پوشش حداقل ۷۰ درصد کف فلاسک پاساژ سلول‌ها انجام شد. سپس ابتدا ظرف کشت به زیر هود منتقل‌شده و محیط کشت درون ظرف تخلیه گردید و به‌منظور شست‌وشو و جدا کردن سلول‌های مرده و سرم جنین گاوی موجود در ظرف که عامل محدود کردن فعالیت آنزیم تریپسین است ۱ میلی‌لیتر PBS درون ظرف ریخته شد و به مدت ۲۰ ثانیه ظرف آرام تکان داده و بعد از خارج کردن PBS، ۳۰۰ میکرو لیتر آنزیم تریپسین بر روی سلول‌ها ریخته شد و اجازه داده شد تا سلول‌ها در معرض تماس با آنزیم باشند سپس ۱ میلی‌لیتر محیط کشت اولیه‌ی فاقد آنتی‌بیوتیک بر روی سلول‌ها ریخته تا تریپسین خنثی گردد و عملیات پیپتاژ چندین بار انجام گرفت تا سلول‌ها به‌طور کامل از کف ظرف جدا شوند. پلت سلولی حاصل در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت اولیه به‌صورت سوسپانسیون درآمده و به فلاسک محیط کشت جدید منتقل گردید (Wolf and Quimby,1976). سپس فاکتورهای چسبندگی سلول‌ها و میزان تقسیم سلولی و زمان و میزان سرعت رشد و پوشش کامل سلول‌ها روی کف به‌صورت روزانه بررسی شد و میزان مهاجرت سلول از بافت به روش (Moritz and Labbe,2008) از طریق تعیین شاخص کارایی کاشت بافت (رابطه ۱) محاسبه شد.

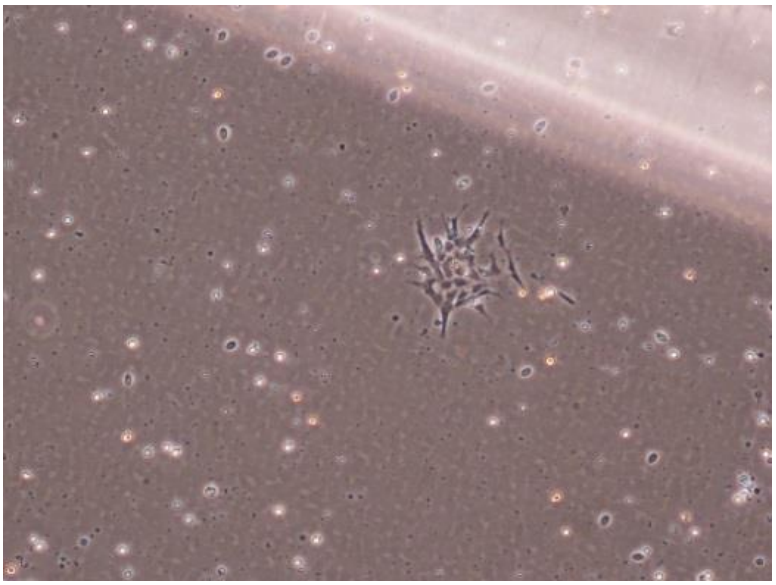
رابطه ۱:
$$\text{درصد کارایی کاشت بافت} = \frac{\text{تعداد قطعات بافتی که سلول از آن‌ها مهاجرت کرده است}}{\text{تعداد کل قطعات کاشته شده}} \times 100$$

نتایج

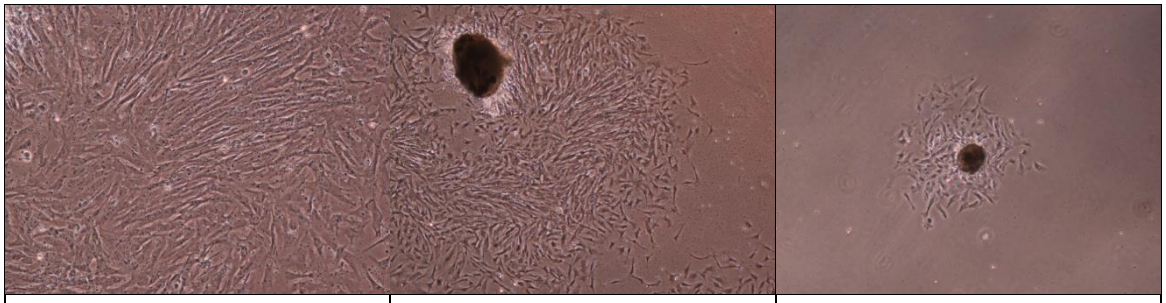
نتایج نشان داد که جداسازی و تکثیر سلول‌های کلیه ماهی سفید با روش کشت سلولی اولیه امکان‌پذیر است. سلول‌ها در روز اول به کف فلاسک چسبیدند (شکل ۲) از روز دوم به بعد رشد و مهاجرت سلول‌ها روند خوبی را نشان داد که نشان‌دهنده محیط کشت مناسب بود. سلول‌ها در تمام گروه‌ها فیبروبلاستی بودند. اثر دمای ۲۱، ۲۴ و ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد در طی روند مطالعات بر رشد سلول‌ها بررسی شد که نتایج نشان داد دمای ۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد برای رشد مناسب نبوده است و سلول‌ها در این دما تکثیر بسیار کندی داشتند و محیط کشت زیادی مصرف نشد و رشد قابل‌توجهی مشاهده نشد. همچنین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد سلول‌ها تکثیر سریع داشته ولی زنده‌مانی کمی داشتند. سلول‌ها بعد از تکثیر سریع شروع به ریزش کردند. درصورتی‌که در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد سریعاً محیط را اسیدی نموده که نشان‌دهنده مصرف محیط و تکثیر سلول‌ها است (شکل ۴). در مرحله بعد با دمای بهینه ۲۴ درجه سانتی‌گراد غلظت‌های متفاوت سرم جنین گاوی (۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) بررسی شد که در غلظت‌های ۵ و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، رشد کمتری مشاهده گردید ولی در غلظت ۲۰ درصد سرم جنین گاوی رشد و تکثیر مناسب

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

دیده شد (شکل ۳؛ شکل ۵). دمای بهینه در این کشت ۲۴ درجه سانتی‌گراد و pH در دو حالت ۶/۸ و ۷/۲ بررسی شد که در pH ۶/۸ سلول‌ها پس از سه روز شروع به ریزش نمودند و از بین رفتند ولی در pH ۷/۲ سلول‌ها به رشد و تکثیر ادامه دادند. همچنین میزان مهاجرت سلول از قطعات کاشته شده (درصد کارایی کاشت بافت) در روز هفتم به میزان ۸۸/۳۷ درصد محاسبه گردید.



شکل ۲: کاشت سلول کلیه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus Kutum*) در ٢٤ ساعت اول با بزرگنمایی x ۱۰.

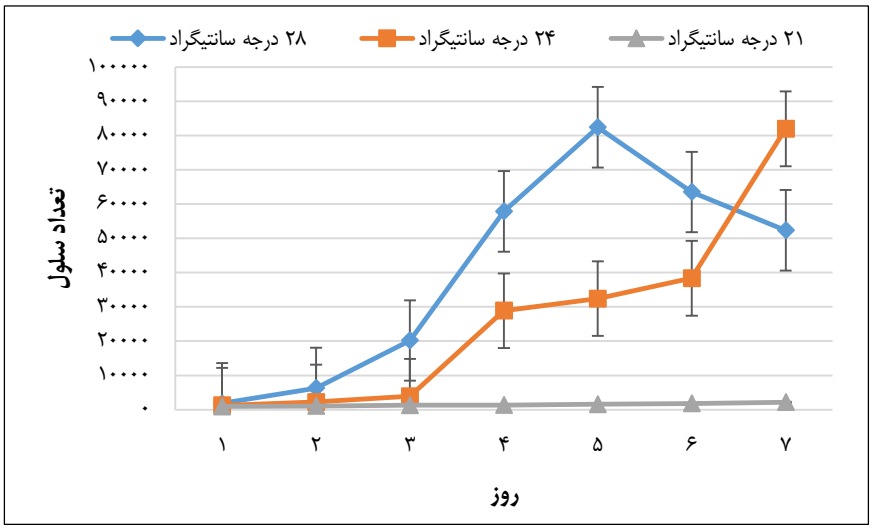


الف | ب | ج

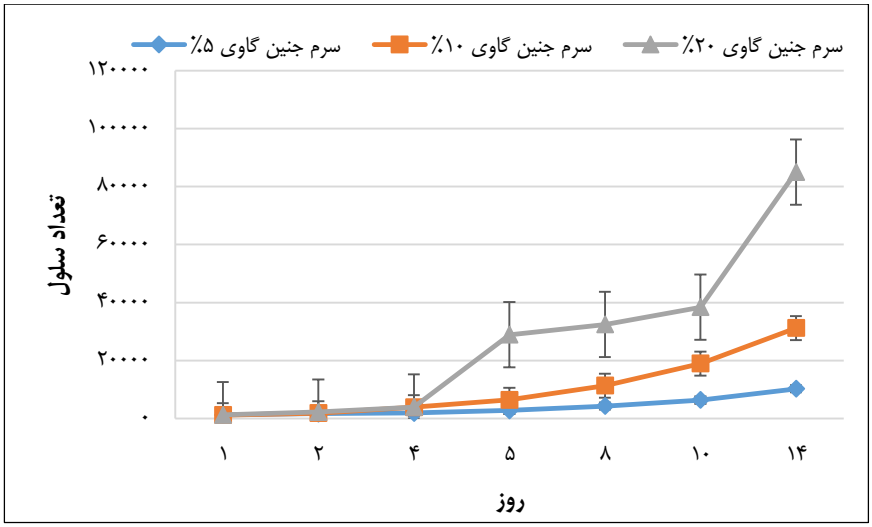
شکل ۳: رشد و تکثیر سلول‌های کلیه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus Kutum*) در روز دهم بعد از کاشت با غلظت‌های مختلف سرم جنین گاوی (۵، ۱۰ و ۲۰ درصد).

الف: غلظت ۵ درصد سرم جنین گاوی با بزرگنمایی 4x، ب: غلظت ۱۰ درصد سرم جنین گاوی با بزرگنمایی 4x، ج: غلظت ۲۰ درصدسرم جنین گاوی با بزرگنمایی،x 10

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]



شکل ٤: تأثیر دما بر تعداد سلول‌های کلیه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kuutm*).



شکل ٥: مقایسه تعداد سلول‌های کلیه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kuutm*) در غلظت‌های مختلف سرم جنین گاوی (FBS).

بعد از گذشت ۱۴ روز (زمانی که سلول‌ها حداقل ۷۰ درصد کف را پوشانده بودند) اقدام به پاساژ آن‌ها شد. ابتدا ظرف کشت به زیر هود منتقل شد و محیط کشت درون ظرف تخلیه گردید پس‌ازآن آنزیم تریپسین به میزان ۲/۵ درصد در هزار (۵cc) به فلاسک کشت سلول اضافه شد تا کلونی‌های سلولی که به کف فلاسک چسبیده‌اند از آن جدا گردند به مدت چند دقیقه سلول–ها در معرض تماس با آنزیم تریپسین قرار گرفتند تا سلول‌ها شروع به جمع شدن و جدا شدن از کف ظرف کشت نمایند بعدازاین زمان ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت اولیه‌ی فاقد آنتی‌بیوتیک بر روی سلول‌ها ریخته می‌شود تا تریپسین خنثی گردد و عملیات پیپتاژ چندین بار انجام می‌گردد تا سلول‌ها به‌طور کامل از کف ظرف جدا شوند و پس از

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

مشاهده سلول‌های جداشده از کف توسط میکروسکوپ، پلت سلولی حاصل به فلاسک کشت جدید منتقل شدند و پاساژ صورت گرفت به همین ترتیب پاساژهای بعدی نیز انجام گرفت و تا زمان نوشتن مقاله، هشت پاساژ انجام‌گرفته است.

بحث و نتیجه‌گیری

برای به دست آوردن کشت اولیه دو روش وجود دارد: جداسازی آنزیمی از بافت و روش کشت بافت (Boles and Lee, 1991) که در این مطالعه روش کشت بافت از ماهی (*Rutilus kuutm*) بدون آنزیم موردبررسی قرار گرفت. روش کشت بافت به دلیل سرعت و سهولت و حفظ تعاملات سلولی و اجتناب از هضم آنزیمی که می‌تواند به سلول آسیب برساند نسبت به روش آنزیمی ترجیح داده می‌شود (Avella *et al*., 1994). درروش کاشت، محیط کشت به‌آرامی اضافه می‌گردد و تمام سطح سلول‌ها را می‌پوشاند. سلول‌ها رشد می‌کنند و کشت ایجاد می‌شود (Wolf and Ahne, 1982). چندین تیره سلولی با استفاده از روش کشت ایجادشده است. (Tong *et al*., 1997; Fernandez-Puentes *et al*., 1993; Bejar *et al*., 1997; Tong *et al*., 1998)

در مطالعه‌ای که Nanda و همکاران (۲۰۱۴) بر روی کشت سلول‌های کلیه، قلب، مغز، باله، تخمدان و سایر اندام‌های ماهی Major carp به دو روش کاشت بافت (Explant) و روش آنزیمی انجام دادند به این نتیجه رسیدند که درروش کاشتن در سلول‌های کلیه، تک لایه سلولی ۱۶ الی ۱۸ روز پس از کاشت ایجاد گردید و تا ۹ پاساژ نیز پیشرفت نمود. در مطالعه حاضر که از روش کاشتن بهره گرفته شد سلول‌های کلیه از ماهی سفید در روز ۱۴ تشکیل تک لایه دادند و تاکنون ۵ پاساژ صورت گرفته است که تقریباً بامطالعه حاضر مطابقت داشته است.

انواع مختلفی از محیط کشت پایه برای کشت سلول ماهی وجود دارد (Fernandez *et al*., 1993). این محیط کشت‌ها با توجه به مواد مغذی و محتویات آن و نوع نمک‌های متعادل و ظرفیت بافر آن‌ها به‌طور قابل‌توجهی متفاوت هستند (Freshney, 2000). محیط کشت‌های رایج استفاده‌شده جهت کشت سلول ماهی MEM، Leibowitz's L-15، محیط کشت MEM199 است. تفاوت اصلی بین این سه نوع محیط کشت بر اساس غلظت نمک‌ها و تغییرات در نوع و میزان اسیدهای آمینه آن است. در EMEM، بی‌کربنات بالاست درحالی‌که در H-MEM میزان بی‌کربنات پایین است. محیط کشت L-15 حاوی سدیم پیرووات بالا و فاقد بی‌کربنات است بنابراین این محیط کشت‌ها اثرات متفاوتی بر سلول‌ها خواهند گذاشت (Freshney, 2000). Nanda و همکاران (۲۰۱۴) از محیط کشت DMEM برای کشت اولیه بافت کلیه استفاده نمودند. در مطالعه Staford و همکاران (۲۰۰۱) از محیط کشت EME استفاده شد. در این مطالعه از محیط کشت L-15 استفاده شد. در صورت استفاده از این محیط کشت نیاز به افزودن گاز Co2 به محیط کشت درنتیجه انکوباتور Co2 دار نیست. سلول‌های ماهی به‌خوبی در محیط کشت L- ۱۵ رشد می‌کنند (Leibovitz, 1963) و همچنین برخی از محققان دریافتند که این محیط به‌طور مؤثر pH را در شرایط طبیعی محیطی حفظ می‌کند (Wolf and Qumby, 1969) و این محیط کشت بهترین محیط کشت برای رشد سلول‌های ماهی است (Kumar *et al*., 2001, Chen *et al*., 2019).

سرم یک افزودنی ضروری درکشت سلولی است (Ham,1981). سرم حاوی میزان زیادی پروتئین، پپتید، اسیدهای چرب، گلوکز و هورمون است که می‌تواند باعث ترویج رشد سلول و فعال‌سازی آنزیم‌ها شود و از DNA محافظت کند و از آسیب رادیکال‌های آزاد جلوگیری نماید سرم همچنین به‌عنوان یک بافر PH عمل می‌کند (Cheng *et al*.,1993). بااین‌حال غلظت سرمی بالاتر همیشه نتایج بهتری را نشان نمی‌دهد انواع مختلف سلول‌ها نیاز به غلظت‌های سرمی متفاوت دارند علاوه براین مکمل‌های دیگر عوامل رشد نیز غلظت سرمی موردنیاز را کاهش می‌دهند. در این مطالعه ازسرم جنین گاوی به میزان ۲۰٪ استفاده شد که سلول‌ها سریع‌ترین رشد و بهترین شرایط را در خود نشان دادند. در مطالعه Rathore و همکاران (۲۰۰۱) ازسرم ماهی استفاده شد. در تولید تیره سلولی (THK) از کلیه ماهی تیلاپیا از غلظت‌های متفاوت سرم جنین گاوی (۲–۱۵ درصد) استفاده‌شده است (Wen, 2016). همچنین در تهیه تیره سلولی (TSHKC) از کلیه ماهی (*Cynoglossus semilaevis*) از سرم

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

جینن گاوی با غلظت ۲۰ درصد استفاده شد (Zheng *et al*., 2012) ولی در تولید تیره سلولی (SISK) ازکلیه ماهی باس دریایی از غلظت ۲-۲۰ درصد سرم جنین گوساله استفاده شد (Sahul Hameed *et al*., 2006) و در تهیه تیره سلولی (BPK) از کلیه ماهی (*Acanthopagrus schlegelii*) سرم جنین گاوی با غلظت ۱۰ درصد استفاده گردید (Tung *et al*., 1991) که از این تفاوت درصد در استفاده از سرم جنین گاوی (FBS) می‌توان نتیجه گرفت انواع مختلف سلول‌ها نیاز به غلظت‌های سرمی متفاوتی دارند. علاوه بر رشد سلول‌ها سرم ممکن است نقش کلیدی در چسبیدن سلول‌ها به بستر و تکثیر آن‌ها، همانند آنچه در مورد تیره‌های سلولی تاس ماهی چینی (*Acipenser sinensis*) مشاهده شد داشته باشد (Zhou *et al*., 2008). چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف کشت اولین ضرورت موفقیت‌آمیز بودن کشت سلولی است. عموماً رشد خوب سلول‌ها بستگی به چسبندگی خوب سلول‌ها به کف ظرف کشت دارد که بسته به نوع ماهی و نوع سلول از غلظت‌های مختلف سرم استفاده می‌گردد تا به بهترین نتیجه در چسبندگی و تکثیر سلول‌ها دست‌یابیم.

دما یکی از فاکتورهای مهم در کشت سلول است (Bols *et al*.,1992). اکثر تیره‌های سلولی این قابلیت را دارند که در رنج گسترده‌ای از دما تهیه شوند. طبق تحقیقات Wolf و Mann (۱۹۸۰)، دمای کشت یک ماهی در رنج دمای بهینه رشد آن ماهی است. در این مطالعه برای کشت سلول‌های کلیه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) از سه رنج دمایی ۲۱، ۲۴ و ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده شد که سلول‌ها در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بهترین چسبندگی و تکثیر را نشان دادند ولی در کشت اولیه از کلیه ماهی (*Clarias gariepn*) *دما ۲۸* درجه سانتی‌گراد بوده است (Rathore *et al*., 2001). در کشت اولیه باله از ماهی کپور آینه‌ای که از خانواده کپور ماهیان است مانند مطالعه حاضر در دمای ۲۶ تا ۳۰ درجه انجام گرفت (Zhou *et al*., 2013). دمای بهینه رشد سلول‌ها در تهیه تیره سلولی (SHK) از کلیه ماهی (*Verasper variegates*) ۲۴ درجه گزارش‌شده است (Wang *et al*., 2010). در بررسی دیگر که توسط نوروزفشخامی و همکاران (۱۳۹۶) صورت گرفت کشت تک لایه از بافت باله‌ی دمی تاس ماهی ایرانی در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. نوروزی و همکاران (۱۳۹۳) اقدام به کشت اولیه و تولید تیره‌ی سلولی از ماهی آزاد دریای خزر در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نمودند. نوروزفشخامی و همکاران (۱۳۹۴) به‌منظور بررسی عملکرد سلول‌های فولیکولی تخمک تاس ماهی استرلیاد بافت تخمدان را در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت دادند به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها به دلیل تفاوت دمای رشد و پرورش ماهیان مختلف است.

در مطالعه Nanda و همکاران (۲۰۱۴)، سلول‌ها رشد فیبرو بلاستی داشتند این مسئله که سلول‌های فیبرو بلاستی شکل در ماهی‌ها نسبت به سلول‌های اپیتیالی شکل غالب هستند در کشت بافت تعدادی از مطالعات دیگر هم صادق است (Singh *et al*., 1995؛ Lakra and Bhonde,1996؛ Lai *et al*., 2003). به‌طور طبیعی رشد سلولی در سلول بستگی به ماهیت سلول، توانایی سلول برای اتصال و نیازهای مواد مغذی دارد (Part and Bergstrom,1995). علاوه بر این، رشد و تکثیر سلول‌ها در طی کشت و پاساژ نیز ممکن است بسته به نوع سلول زمان کشت اولیه، میزان سلول و غلظت سرم و غیره متفاوت باشد (Melican *et al*, 2005).

درمجموع با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، دمای بهینه برای رشد سلول‌های کلیه ماهی سفید، دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد با میزان ۲۰٪ سرم جنین گاوی و pH ۷/۲ است. ازاین‌رو این شرایط دمایی و غلظت سرم برای مطالعات آتی ماهی سفید دریای خزر پیشنهاد می‌گردد. همچنین روش کشت سلول‌های کلیه در خارج از بدن موجود زنده و در محیط آزمایشگاهی به دلیل اهمیت حفظ ذخایر ژنتیکی آبزیان ایران و نیز لزوم تهیه کشت سلولی جانوران بومی برای مطالعات کاربردی، امکان تولید کشت سلولی اولیه از گونه ارزشمند ماهی سفید دریای خزر باید بیشتر موردمطالعه قرار گیرد تا بتوان در آینده اقدام به تهیه تیره‌های سلولی بافت مذکور، انجماد و نگهداری آن به‌صورت بانک سلولی و استفاده از تیره‌های سلولی تهیه‌شده برای مقاصد گوناگون ازجمله تشخیص بیماری‌های ویروسی استفاده نمود.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

سپاسگزاری

نویسندگان از ریاست و معاونت محترم تحقیقاتی پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی کشور و کارکنان محترم بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان پژوهشکده آبزی پروی آب‌های داخلی کشور کمال تشکّر و قدردانی را دارند.

منابع

اداره آمار و صید شیلات ایران.، ۱۳۹٤. دفتر برنامه‌ریزی گروه آمار و مطالعات توسعه شیلاتی، سالنامه آماری سازمان شیلات ایران

خانی پور. ع. ا.، ۱۳٦۸. بررسی لیمنولوژیکی رودخانه پلرود و خشک‌رود (ازنظر مهاجرت ماهی سفید)، دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی، کرج، ۱۵۲ ص.

رضوی صیاد. ب.، ۱۳۷۸. مقدمه‌ای بر اکولوژی دریای خزر. موسسه تحقیقات شیلات ایران. تهران.

نوروز فشخامی، م. ر.، سوداگر، م.، بهمنی، م.، مازندرانی، م. و یزدانی ساداتی، م. ع.، ۱۳۹٤. کشت اولیه سلولهای فولیکولی و تخمک تاسماهی استرلیاد (Acipenser ruthenus)روشی مناسب برای انجام مطالعات کاربردی. مجله آبزیان زینتی، ۲(۳): صفحات ۸-۱.

نوروزفشخامی، م.ر.، پورکاظمی، م.، حسن‌زاده صابر، م.، بهمنی، م.، برادران نویری، ش.، دلیری، م. و غروقی، ا.، ۱۳۹٦. کشت بافت باله دمی تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus*. مجله پژوهش‌های جانوری. انجمن زیست‌شناسی ایران، ۳۰(۴): صفحات ۴۷۶-۴۶۵.

نوروزی،ک.، کلباسی، م.، فرزانه،پروانه. شاهزاده افضلی، س. ا.، فرقدان، م.، نسیمیان، ا.، ایزدپناه، م.، آشوری موثق، س.، محمدی، ش.، مرادمند، ز.، فرهنگ نیا، م.، ۱۳۹۳. تولید و ارزیابی رده‌ی سلولی اپیتلیالی شکل از بافت باله ماهی آزاد دریای خزر. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. سال دوم، شماره سوم. صفحات ۸۸-۶۹.

Abdul Majeed, S., Nambi, K. S. N., Taju, G. and Sahul Hameed, A. S., 2013. Development, characterization and application of a new fibroblastic-like cell line from kidney of a freshwater air breathing fish Channa striata (Bloch, 1793). Acta Trop. 127:25–32.

Alok, D., Hassin, S., Sampath, K. R., Trant, J. M., Yu, K. and Zohar, Y., 2000. Characterization of a pituitary GnRH-receptor from a perciform fish, Morone saxatilis: Functional expression in a fish cell line, Molecular and Cellular Endocrinology. 168: 65-75.

Aluru, N. and Vijayan, M. M., 2009. Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling, General and Comparative Enocrinology. 164: 142-150.

Avella, M., Berhaut, J. and Payan, P., 1994. Primary culture of gill epithelial cells from the sea bass Dicentrarchus labrux, In Vitro Cell Dev Biol. 30:41–9.

Bejar, J., Borrego, J. J., Alvarez, M. C., 1997. A continuous cell line from the cultured fish gilt-head seabream (Sparus aurata L.). Aquaculture. 150:143-153.

Bols, N. C., Mosser, D. D., Steels, G. B., 1992. Temperature studies and recent advances with fish cells in vitro. Comp Biochem Physiol. 103: 1–14.

Bols, N. C., Brubacher, J. L., Ganassin, R. C., Lee, L. E. J., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish, Dev. Comput. Immunol. 25:853–873.

Castro, R., Martin, S. A., Zou, J. and Secombes, C. J., 2010. Establishment of an IFN-gamma specific reporter cell line in fish, Fish and Shellfish Immunology. 28: 312-319.

Chen, S. N, Jong, K. J. and Kou, G. H., 1987. Invertebrate Tissue Culture, J. Mitsuhashi, (ed.) CRC Press, INV. (In Press)

Chen, B., Zheng, Z., Yang, J., Chi, H. and Huang, H., 2019. Development and characterization of a new cell line derived from European eel Anguilla anguilla kidney, Biology open. 8:bio037507.

Cheng, L. L., Bowser, P. R. and Spitsbergen, J. M., 1993. Development of cell cultures derived from lake trout liver and kidney in a hormone-supplemented, serum reduced medium, Journal of Aquatic Animal Health. 5: 119-126.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

Clem, L.W., Bly, J.E., Wilson, M., Chinchar, V.G., Stuge, T., Barker, K., Luft, C., Rycyzyn, M., Hogan, R.J., van Lopik, T., Miller, N.W., 1996. Fish immunology: the utility of immortalized lymphoid cells – a mini review, Vet. Immunol. Immunopathol. 54:137–144.

Dannevig, B. H., Brudesth, B. E., Gjøen, T., Rode, M., Wergenland, H. I., Evensen, Ø. and Press, C. M.., 1997. Characterisation of a long-term cell line (SHK-1) developed from the head kidney of Atlantic salmon (Salmo salar L.), Fish and Shellfish Immunology. 7:213–226.

Esmaeili, H. R., Sayyadzadeh, G., Eagderi, S. and Abbasi, K., 2018. Checklist of freshwater fishes of Iran, FishTaxa. 3(3): 1-95.

Fan, L. C. and Collodi, P., 2002. Progress towards cell-mediated gene transfer in zebrafish. Brief Funct Genomics 1(2):131–138.

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

Freshney, R. I., 2000. Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Technique, 4th ed.Wiley-Liss, JohnWiley and Sons, Inc. Publ., New York, USA. 577 p.

Goswami, M., Sharma, B. S., Tripathi, A. K., Yadav, K., Bahuguna, S. N., Nagpure, N. S., Lakra, W. S. and Jena, J. K., 2012. Development and characterization of cell culture systems from Puntius (Tor) chelynoides (McClelland). Gene, 500: 140-147.

Ham R. G., 1981. Cell growth requirements-the challenge we face. In:WaymouthC.; Ham R. G.; Chapple P. J. (eds) The growth requirements of vertebrate cells in vitro. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1–15.

Holopainen, R., Tapiovaara, H. and Honkanen, J., 2012. Expression analysis of immune response genes in fish epithelial cells following ranavirus infection. Fish and Shellfish Immunology. 32: 1095-1105.

Kamalendra, W. S., Lakra. J., Sharma, M., Goswami and Sharma, B. S., 2010. Development of cell culture from caudal fin and heart of Tor Tor (Hamilton_Buchanan) Indian, Fish. Assoc., 37: 37-43.

Kienzler, A., Tronchère, X., Devaux, A. and Bony, S., 2012.Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay, Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA. 26:500-510.

Kim, M. S., Jee, B. Y., Cho, M. Y., Kim, J. W., Jeong, H. D., Kim, K. H., 2012. KFugu double U6 promoter–driven long double-stranded RNA inhibits proliferation of viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV) in fish cell lines.Arch Virol. 157:1029–1038.

Kojima, H., Takeuchi, S., Tsutsumi, T., Yamaguchi, K., Anezaki, K., Kubo, K., Iida, M., Takahashi, T., Kobayashi, S., Jin, K. and Nagai, T., 2011. Determination of dioxin concentrations in fish and seafood samples using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells. Chemosphere, 83: 753-759.

Kumar, G. S., Bright Singh, I. S. and Philip, R., 2001. Development of a cell culture system from the ovarian tissue of African catfish (Clarias gariepinus). Aquaculture. 194:51-32.

Lai, Y. S., Murali, S., Ju, H. Y.,Wu, M.F.,Guo, L.C., Chen, S. C., Fang, K. and 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.

Lai, Y. S., John, J. A. C., Un, C. H., Guo, I. C., Chen, S. C., Fang, I.C., Un, C. H. and Chang, C. Y., 2003. Establishment of cell lines from a tropical grouper, Epinephelus awoara (Temminck and Schlegel), and their susceptibility to grouper irido and nodaviruses. Journal of Fish Diseases. 26: 3142.

Laing, K. J. and Hansen, J. D., 2011. Fish T cells: Recent advances through genomics,Developmental and Comparative Immunology. 35: 1282-1295.

Lakra, W. S. and Bhondae., R. R., 1996. Development of primary cell culture from the caudal fin of an Indian major carp, Labeo rohita (Ham.). Asian Fisheries Science. 6: 149-152.

Leibovitz, A., 1963. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere, Am.J. Hyg. 78:173-180.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

Maclean, N., 2011. Cellular, molecular, genomics, and biomedical approaches, transgenesis and chromosome manipulation in fish, Encyclopedia of Fish Physiology. Elsevier. 1998-2008.

Melican, D., Butler, R., Hawkins, N. and Chen, L. H., Hayden, E., Destrempes, M., Williams, J., Lewis, T., Behboodi, E., Ziomek, C., Meade, H., Echelard, Y., Gavin, W., 2005. Effect of serum concentration,method of trypsinization and fusion/activation utilizing transfected fetal cells to generate transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer. Theriognology.63:1549-1563.

Moritz, C. and Labbe, C., 2008. Cryopreservation of goldfish fins and optimization for field scale cryobanking. Cryobiology. 56(3): 181–188.

Nanda, P. K., Swain, P., Nayak, S. K., Behera, T. and Dhama, K., 2014. Comparative Study on Enzymatic and Explanet Method in Establishing Primary Culture from Different Cultivable Cells of Indian Major Carp, Cirrhinus mrigala.Asian. Journal of Animal and Veteniary Advances.1683-9919.

Noga, E. J. and Hartmann, J. X., 1977. Establishment of cell lines from the walking catfish, Clarias batrachus (L.J) and their infection with channel catfish virus. In Vitro Cell Dev.BioI. 13:160.

Oh, Y. B., Lee, J. S.and Park, E. H., 2001. Fish cell line as an in vitro test system for analyzing chromosome aberrations. Bull Environ Contam Toxicol. 67(1):6–11.

Parameswaran, V., Shukla, R., Bhonde, R. and Sahul Hameed, A. S., 2006a. Establishment of embryonic cell linefrom sea bass (Lates calcarifer) for virus isolation, Journal of Virological Methods 137(2): 309-316.

Parameswaran, V., Shukla, R., Bhonde, R. and Sahul Hameed, A. S., 2006b. Splenic cell line from sea bass, Lates calcarifer: establishment and characterization, Aquaculture 261: 43-53.

Rathore, G., Sood, N. and Swaminathan, R., 2001. Primary Cell Culture From Fish gill and kidney using fish serum. Indian Journal of Experimental Biology.39:936-938.

Rode, M., Berg, T. and GjØen, T., 1997. Effect of temperature on endocytosis and intracellular transport in the cell line SHK-1 derived from salmon head kidney. Comp Biochem Physiol A. 117(4):531–537.

Ruiz, S., Schyth, B. D., Encinas, P., Tafalla, C., Estepa, A., Lorenzen, N. and Coll, J. M., 2009. New tools to study RNA interference to fishvirus: fish cell lines permanently expressing siRNAs targeting the viral polymerase of viral hemorrhagic septicemia virus. Antiviral Res. 82(3):148–156.

Sahul Hameed, A. S., Parameswaran, V., Shukla, R., Bright Singh, L. S., Thirunavukkarasu, A. R. and Bhonde, R. R., 2006. Establishment and characterization of India's first marine fish cell line (SISK) from the kidney of sea bass (Lates calcarifer), Aquaculture. 257. 92–103.

Salinas, I., Meseguer, J. and Esteban, M. A., 2008. Antiproliferative effects and apoptosis induction by probiotic cytoplasmic extracts in fish cell lines. Vet Microbiol. 126(1–3):287– 294.

Sarath Babu, V. S., Nambi, K. S. N., Chandra, V., Ishaq Ahmed, V. P., Bhonde, R., Sahul Hameed, A. S., 2012. Establishment and characterization of a fin cell line from Indian walking catfish, Clarias batrachus (L.), J Fish Dis. 34:355–364.

Singh, I. S. B., Rosamma, P., Raveendranath, M. and Shanmugam, J., 1995. Development of primary cell cultures from kidney of fresh water fish Heteropneustus fossilis. Indian J. Exp. Biol. 33, 595–599.egner, H. 1998, Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology. EXS 86, 1–38.

Stafford, J. L., Mclauchlan, P. L., Secombes, C. J., Ellis, A. E. and Belosevic, M., 2001. Generation of primary monocyte-like cultures from rainbow trout head kidney leukocytes, Developmental and Comparative Immunology. 25:447-459.

Tafalla, C., Estepa, A. and Coll, J. M., 2006. Fish transposons and their potential use in aquaculture, Journal of Biotechnology. 123: 397-412.

Thomas, P., 2012. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models, General and Comparative Endocrinology. 175: 367-383.

Tong, S. L, Lee, H. and Miao, H. Z., 1997. The establishment and partial characterization of a continuous fish cell line FG-9307 from the gill of flounder Paralichthys olivaceus,Aquaculture. 156:327333.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]

Tong, S. L., Miao, H. Z. and Li, H., 1998. Three new continuous fish cell lines of SPH, SPS and RSBF derived from sea perch (Lateolabraxjapaonicus) and red sea bream (Pagrosomus major), Aquaculture. 169:143151.

Tung, L. C., Chen, S. N. and Kou, G. H., 1991. Three cell lines derived from spleen and kidney of black porgy (Acanthopagrus schlegeli). Fish Pathol. 26:9–17.

Wang, N., Wang, X. L., Sha, Z. X., Tian, Y. S. and Chen, S. L., 2010. Establishment, characterization and virus susceptibility of a kidney-derived cell line from southern flounder, Paralichthys lethostigma Jordan & Gilbert. Journal of Fish Diseases. 34(1):81-5

Watanabe, Y., Hanada, H. and Ushiyama, M., 1981. Monolayer culture from marine fish, Fish Pathol. 15:201–205. Wen, C. M., 2016. Development and characterization of a cell line from tilapia head kidney with melanomacrophage characteristics. Fish & Shellfish Immunology. 49:442-449.

Wergeland, H. I. and Jakobsen, R. A., 2001. A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISAV). Dis Aquat Organ. 44: 183-190.

Wolf, K. and Quimby, M. C., 1969. Fish cell and tissue culture, In Fish Physiology (Eds. Hoar, W.S, Randall, P.J.), New York Academic Press. pp 253-305.

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

Wolf K. and Mann, J. A., 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes, In Vitro. 16(2): 168–179.

Wolf, K. and Ahne, W., 1982. Fish Cell culture, In Advances in cell culture Vol2. (Ed. Maramorosch, K.) New York Academic Press. pp 305-328.

Zheng, Y., Wang, N., Xie, M. S., Sha, Z. X. and Chen, S. L., 2012. Establishment and characterization of a new fish cell line from head kidney of half-smooth tongue sole (Cynoglossus semilaevis).Fish Physiol Biochem. 38:1635–1643.

Zhou, H. Y., Shin, E. M., Guo, L. Y., Youn, UJ., Bae, K., Kang, S. S., Zou, L. B. and Kim, Y. S., 2008. Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via NF-kappaB, JNK and p38 MAPK inactivation, European Journal Pharmacology. 586: 340-349.

Zhou, J., Wang, H., Zhu, X., Li, X., Lv, W. and Zheng, D., 2013. The primary culture of mirror carp snout and caudal fin tissues and the isolation of Koi herpesvirus, In Vitro Cell Dev Biol Anim. 49(9):734-42.

Zuo, W. G., Qian, H. X., Xu, Y. F., Du, S.Y., Yang, X.L., 1986. A cell line derived from the kidney of grass carp (Ctenopharyngodon Idellus). Journal of Fisheries of China. 1:11–17.

[Downloaded from jmb.ahvaz.iau.ir on 2025-07-08]