

« بسمہ تعالیٰ »

کشت سلولے



دکتر مہدوی نیا

دکتر نقی ترابی

دکتر اختلاط

جلسه اول: دکتر مهدوی نیا

علی موسوی نژاد

کشت سلولی: به معنای این است که یکسری سلول را کشت می‌دهیم تا بر روی آنها مطالعه کنیم.

در این علم سلولها از بافتهای مشخص را در یکسری فلاسک قرار می‌دهند (در دما، رطوبت، اکسیژن و CO₂ مشخص) تا به طرز مناسب رشد کنند.

آزمایشگاه کشت سلولی یک محیط کاملا ایزوله است؛ زیرا در بدن سیستم ایمنی وجود دارد که از بافتها محافظت میکند اما در محیط سلولی اینها کاملا خلع سلاح شده اند پس نیاز به محیط ایزوله داریم. اگر قارچ یا باکتری بر سطح کشت رشد کنند باید آنها را دور ریخته و از ابتدا کار را آغاز کنیم.

چرا از کشت سلولی استفاده میکنیم؟

مهمترین بخش استفاده از کشت سلولی در این زمان، حمایت از حقوق حیوانات است

انجام تست های سم شناسی قبل از دسترسی عمومی:

حتی بعد از **post marketing** هم مدت زمانی دارو را رصد میکنند تا ببینند دارو تاثیر خود را دارد یا نه؛ یا عوارض نشان میدهد یا نه که این بخش در ایران توسط معاونت غذا و دارو انجام میگردد. یکسری فرم هایی توضیح میدهند تا هر پزشک بتواند در آنها موارد و عوارض مشاهده شده را اطلاع دهد تا در صورت امکان داروی موردنظر اصلاح شود. به این موارد **post marketing** میگویند.

جلو گیری از استفاده از حیوانات به شکل وسیع

ما اگر اطلاعات مورد نیاز خود را از کشت سلولی بدست بیاوریم دیگر نیازی به استفاده از حیوانات نیست البته یکسری محدودیت هایی در کشت سلولی وجود دارد مانند ثبت اثرات ضد درد که در کشت سلولی قابل مشاهده نیست

پیشرفت ها داروهای جدید، اقتصاد و بازار دارویی، وضع قوانین ترکیبات موضعی و ترکیبات سیستمیک، انجام تست های سم شناسی مثلا در تستهای سم شناسی بیشتر از کشت سلولی استفاده میشود. در تستهای سم شناسی بدنال اثرات بد یا خوب یک ماده هستیم. در تحقیقات حال حاضر از اثرات سم برای از بین بردن سلولهای سرطانی استفاده میشود به طوری که سلولهای سرطانی از بین بروند اما تاثیری بر سلولهای سالم نداشته باشند. برخلاف داروهای شیمی درمانی که بر سلولهای سالم نیز اثر دارد. در سلولهای سرطانی یکسری کانال وجود دارد که در سلولهای سالم وجود ندارد.

اکنون در تحقیقات از سم عقرب برای بستن این دریچه ها و از بین بردن سلولهای سرطانی استفاده میشود

تمایز بین سلول سالم و سرطانی

سلولهای سالم انرژی **ATP** خود را عموماً از راه اکسیداسیون و فسفریلاسیون تولید میکنند اما سلولهای سرطانی همه انرژی خود را از راه گلیکولیز تامین میکنند (با وجود اکسیژن) زیرا میتوکندری آنها هز کار افتاده است (بر خلاف سلولهای سالم که فقط در غیاب اکسیژن گلیکولیز انجام میدهند) پس اگر ما بتوانیم کاری کنیم که گلیکولیز متوقف شود میتوانیم به صورت اختصاصی و هدفمند به سلولهای سرطانی آسیب برسانیم.

وجود رده های سلولی اختصاصی

محیط کشتهای مناسب سلول

رصد کردن اثرات فیزیولوژیکی و سیستمیک داروها دشوار است زیرا برای دیدن تاثیرات برخی از داروها باید تاثیر آنها را بر بافت آسیب دیده مشاهده کرد بنابراین بیشتر بررسی ها در محیط بیرون و در سطح سلول انجام میشود زیرا در آن صورت میتوان پیش بینی کرد که در آن بافت از بدن چه اتفاقی می افتد.

بررسی سمیت سلولی

تعریف سمیت سلولی بر اساس نوع مرگ سلول و تغییر در فنوتیپ سلول تغییر خواهد یافت.

در یکسری از ویالها (کرایو تیوب) سلولها را در حد ۱CC تا ۵CC/۱ در نیتروژن مایع و دمای منفی ۱۵۰ درجه نگهداری میکنند. این تیوب ها با کد مشخص میشوند که نوع سلول را مشخص میکنند که در صورت نیاز به هر کدام، کد را اعلام میکنیم.

سلولها را در تعداد ۲_۱۰×۱۰*۶ عدد نگهداری میکنند که بعد در این فلاسکها شروع به افزایش تعداد میکنند و در کف فلاسک جای میگیرند. تاجایی که فلاسک ۹۰ درصد پر شود وقتی که پر شد باید آنها را پاساژ دهیم یعنی آنها را از کف فلاسک جدا میکنیم و بع دو فلاسک دیگر انتقال میدهیم پس میتوان ماده سمی یا دارویی را در غلظت های مختلف در این فلاسک ها آزمایش کرد که یکی از این تستها، تست سم شناسی ست که بعد از تست واکنش سلولها را به آن ثبت میکنیم.

سمیت سلول میتواند به اشکال زیر باشد:

مرگ نکروز (به دلیل آسیب به سلول)، مرگ آپوپتوز (مرگ تنظیم شده توسط خود سلول)، خود هضمی (حاصل ترشح آنزیم های درون سلول، توقف در رشد سلول، اختلال در تمایز سلول

تفاوت نکروز و آپوپتوز:

زمانی که سلولها مورد نیاز نباشند یا بصورت تحدیدی برای ارگانیسم در می آیند، دچار یک مرگ برنامه ریزی شده سلولی یا آپوپتوز میشوند. این روند موجب میشود تا سلول کوچک و گسسته و متراکم شود و اسکلت سلولی خود را از دست بدهد و سطح سلولی خود را تغییر دهد بطوری که یک سلول فاگوسیت مجاور بتواند به غشای سلولی بچسبد و سلول را هضم کند.

برخلاف آپوپتوزیس، سلولهایی که در نتیجه یک آسیب حاد میمیرند معمولاً متورم شده و به علت از دست رفتن غشای سلولی پاره میشوند. سلول نکروز شده ممکن است محتویات خود را به بیرون ریخته و موجب التهاب و آسیب سلولهای مجاور شود.

مزایای روش سمیت سلولی:

ارزان: سلولها را میتوان فریز و نگهداری کرد و از آنها چندین بار استفاده کرد

قابل اندازه گیری و تعیین مقدار: میتوان پارامترهای مختلف را در آنها اندازه گیری کرد که در بافتهای بدن امکان پذیر نیست

تکرار پذیر: اگر سلولها آلوده شدند میتوان دوباره از آنها استفاده کرد

یکسری محدودیت های معمولی نیز دارد

امکان آلوده شدن محیط کشت... که با رعایت دقیق اصول بهداشتی و اضافه کردن انتی بیوتیک به محیط کشت، قابل جلوگیریست.

در تست های سمیت سلولی، سمیت سلول را بر اساس رشد و یا بقای سلول ارزیابی میکنند.

بر روی محیط کشت یکسری کلنی رشد میکند که هنگام اضافه شدن سم به محیط کشت تعدادی از کلنیها از بین میروند و تعداد آنها محدود میشود و گاهی سم بر فعالیت متابولیسمی کلنی ها تاثیر میگذارد و این تاثیر تا مدتی که سم در محیط است باقی میماند

ارزیابی سمی مواد به روش invitro

زیست پذیری: به معنای این است که یک سلول در محیط کشت تا چه مدت میتواند در حضور ماده سمی زنده بماند

ماده سمی را در محیط کشت وارد میکنیم.

غلظتی از ماده سمی که بتواند باعث مرگ ۵۰ درصد از سلولها شود را LD₅₀ گویند.

بقای سلول: اینکه سلول می تواند در محیط زندگی کند یا نه

متابولیسم

سمیت ژنی و دگرگونی: نشان دهنده تاثیر ماده سمی بر ژن ان سلول است که اگر تاثیر منفی باشد یکسری تاثیرات به سلول میگذارد که ممکن است سلول را به سمت آپاپتوز ببرد

تحریک و آزردهی سلول

زیست پذیری: اساس تست نسبت به سلولهای باقی مانده در محیط میباشد

اگر تست ها بر پایه ایجاد گسست در دیواره سلول و... هستند که بر حالتهاى زیر تقسیم میشوند

الف_ نفوذ ماده رنگی به سلول جویری که در حالت عادی این رنگ قادر به نفوذ نمیباشد

ب_ خارج شدن رنگهایی که در شرایط عادی قادر به خروج نیستند

ج_ خروج آنزیم دهیدروژناز از درون سلول

حمیدرضا رضوی

جلسه دوم: دکتر نقی ترابی

نیازمندی های کشت سلولی

کشت سلولی ← حیوانی

فضای مناسب : فضای کافی - بخشی از فضای آزمایشگاه

تجهیزات : (۱) آزمایشگاهی (۲) شخصی

مواد آزمایشگاهی : (۱) سلول ها که از بافت تهیه می شوند یا به شکل آماده از بانک سلولی خریداری می کنیم

(۲) محیط کشت سلول ها