۳۸

بنام خدا

تنظیم کنندگان: زهره اجلالی بزرگی
ناهید موسوی

تاریخ: / /

جلسه: اول

درس: کشت سلولی

استاد:

کشت سلولی: به معنای این است که یک سری سلول را کشت می دهیم تا بر روی آن ها مطالعه کنیم.

در این کلمه سلول ها را در بافت های مشخص در یک سری فلاسک قرار می دهند (در دما و رطوبت و O_2 و CO_2 مشخص) تا به حد مناسب رشد کنند.

آزمایشگاه کشت سلولی یک محیط کاملاً ایزوله است. زیرا در بدن سیستم ایمنی وجود دارد که از بافت محافظت کند اما در محیط کشت سلولی این ها کاملاً خارج شده اند پس نیاز به محیط ایزوله داریم تا آلودگی یا باکتری بر سطح کشت رشد کند باید آن را دور ریخته و از ابتدا کار را آغاز کنیم.

چرا از کشت سلولی استفاده می کنیم؟

مهم ترین بخش استفاده از کشت سلولی در این زمان، حمایت از حقوق حیوانات و استفاده از حیوانات کمتر است.

۱- انجام تست های سم شناسی قبل از دسترسی عمومی

قسمی بعد از post marketing هم مدت زمانی دارو را رصد می کنند تا ببینند دارو تاثیر خود را دارد یا نه، یا عوارض نشان می دهد یا نه که این بخش در ایران توسط معاونت غذا و دارو انجام می گیرد یکسری فرم هایی توضیح می شدند تا هر پزشک

Scanned by CamScanner

بتواند در آن ها موارد و عوارض مشاهده شده را اطلاع دهد تا در صورت امکان داروی مورد نظر اصلاح شود. که به این موارد postmarketing گفته می شود.

۲- جلوگیری از استفاده از حیوانات به شکل وسیع

ما اگه 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 بحث اثرات هورمونی که در کشت سلولی قابل مشاهده نیست.

۳- پیشرفت های داروهای جدید

۴- اقتصاد و بازار دارویی

۵- وضع قوانین ترکیبات موضعی و ترکیبات سیستمیک

۶- انجام تست های سم شناسی

مثلا در تست های سم شناسی بیشتر از کشت سلولی ۱۱ استفاده می شود. در تست های سم شناسی به دنبال مشاهده اثرات بد یا خوب یک ماده هستیم

مثلا در تحقیقات حال حاضر استفاده از اثرات سم برای از بین بردن سلول های سرطانی استفاده می شود به طوری که سلول های سرطانی از بین بروند اما تأثیری بر سلول های سالم نداشته باشد برخلاف داروهای شیمی درمانی حال حاضر که بر سلول های سالم بدن نیز تأثیر دارند

در سلول های سرطانی یک سری کانال وجود دارد که در سلول های سالم نیستند.

الان در تحقیقات از سم عقرب برای بستن این دریچه ها و از بین بردن سلول های سرطانی استفاده می شود.

تمایز بین سلول ساده و سرطانی

سلول های سالم انرژی ATP خود را عموما از طریق اکسیداسیون با فسفریلاسیون تولید می کنند اما سلول های سرطانی همه انرژی خود را از طریق گلیکولیز تأمین می کنند (با وجود حضور اکسیژن) زیرا میتوکندری آن ها از کار افتاده است (برخلاف سلول های طبیعی که متقاطع در بدن وجود اکسیژن گلیکولیز انجام می دهند)

پس اگر ما بتوانیم کاری کنیم که گلیکولیز متوقف شود می توانیم به صورت اختصاصی و هدفمند به سلول های سرطانی آسیب برسانیم

Scanned by CamScanner

۷- وجود رده های سلولی اختصاصی

۸- محیط کشت های مناسب سلول

رصد نمودن اثرات فیزیولوژیک و سیستمیک داروها امری دشوار است زیرا برای دیدن تأثیرات برخی از داروها باید تأثیر آن ها را بر بافت آسیب دیده مشاهده کرد بنابراین بیشترین بررسی ها هم محیط بیرون و در سطح سلولی انجام می شود زیرا در آن صورت می توان پیش بینی کرد که در آن بافت از بدن چه اتفاقی می افتد

بررسی سمیت سلولی

تعریف سمیت سلولی براساس نوع مرگ سلول و تغییر در فنوتیپ سلول تغییر خواهد یافت

در یک سری از ویال ها (گرایو تیوب) سلول ها را (در حد ۱cc تا ۵cc) را در نیتروژن مایع و دمای ۱۵۰°c نگهداری می کنند این تیوب ها باکد مشخص می شوند که نوع سلول را مشخص می کند: سلول نرمال، سرطان، بافت پارانشیم و... که در صورت نیاز به هر کدام کد را اعلام می کنیم

سلول ها را در تعداد $2-1.0\times10^{6}$ عدد نگهداری می کنند که بعد در این فلاسک ها شروع به افزایش تعداد می کنند و در کف فلاسک جای می گیرند تا جایی که فلاسک ۹۰٪ پر شود وقتی که پر شد باید آن ها را پاساژ دهیم یعنی آن ها را از کف بر می کنیم و به دو فلاسک انتقال می دهیم پس می توان ماده سمی یا دارویی را در غلظت های مختلف در این فلاسک ها آزمایش کنیم

گونه ای از این تست ها، تست سرشناسی است که بعد از تست، واکنش سلول ها را به آن ثبت می کنیم

سمیت سلول می تواند به اشکال زیر باشد:

۱- مرگ نکروز (مرگ به دلیل آسیب پاتولوژیک یک سلول)

۲- مرگ آپاپتوز (مرگ سلول منظم و تنظیم شده توسط خود سلول)

۳- خود هضمی (حاصل ترشح آنزیم های درون سلول)

۴- توقف در رشد سلول

۵- اختلال در تمایز سلول

تفاوت نکروز و آپاپتوزیس:

هنگامی که سلول ها دیگر مورد نیاز نیستند یا به صورت تصادفی برای از کار افتادن در می آیند، دچار یک مرگ برنامه ریزی شده

Scanned by CamScanner

سلولی یا آپاپتوزیس می شوند این روند موجب می شود تا سلول کوچک، فشرده و متراکم شود، اسکلت سلولی خود را از دست بدهد و سطح سلولی خود را تغییر بدهد به طوری که یک سلول فاگوسیت حاذر بتواند به غشای سلولی بچسبد و سلول را هضم کند.

بر خلاف آپاپتوزیس، سلول هایی که در نتیجه یک آسیب حاد می میرند معمولا متورم شده و به علت از دست رفتن غشای سلولی پاره می شوند سلول تکثیر شده ممکن است محتویات خود را به خارج ریخته و موجب التهاب و آسیب سلول های مجاور شود.

مزایای روش سمیت سلولی:

۱- اوزان: سلول ها را می توان فریز و نگهداری کرد و از آن ها چندین بار استفاده کرد.

۲- قابل اندازه گیری و تعیین مقدار: می توان پارامترهای مختلف را در آن ها اندازه گیری کرد که در بافت های بدن امکان پذیر نیست.

۳- تکرار پذیر: اگر سلول ها آلوده شوند، می توان دوباره از آن ها استفاده کرد.

یکسری محدودیت های معمول نیز دارد:

امکان آلوده شدن محیط کشت و محیط مغذی و ... که با رعایت دقیق اصول بهداشتی و اضافه کردن آنتی بیوتیک به محیط کشت قابل جلوگیری است.

درشت های سمیت سلولی، سمیت سلول را بر پایه رشد و یا بقای سلول ارزیابی می کنند.

برروی محیط کشت یکسری گلبول رشد می کند که هنگام اضافه شدن سم به محیط کشت تعدادی از گلبول ها از بین می روند و تعداد آن ها محدود می شود و حاصل سم بر فعالیت متابولیسمی گلبول ها تاثیر می گذارد و این تاثیر تا مدتی که سم بر محیط کشت است باقی می ماند.

ارزیابی سمی مواد به روش In Vitro

۱- زیست پذیری (Viability): به معنای این است که یک سلول در محیط کشت تا چه مدت می تواند در حضور ماده سمی زنده بماند.

ما ماده سمی را وارد محیط کشت می کنیم فاصله ای از ماده سمی که بتواند باعث مرگ ۵۰٪ از سلول ها شود را LD_{50} می گویند

Scanned by CamScanner

(lethal dose - limitdose) کمترین مقدار ماده که اگر باعث توقف در رشد هم شود قابل قبول است.

۲- بقای سلول (Survival) : ملاک این که آیا سلول ها می توانند در محیط زندگی کنند یا نه

۳- متابولیسم (metabolicassay)

۴- سمیت ژنتیک و دگرگونی ژنتیک (Genotoxicityand transformation) : نشان دهنده تأثیر ماده سمی بر روی آن سلول است که اگر تأثیر منفی باشد یک سری تأثیرات بر سلول می گذارد که ممکن است سلول را به سمت آپاپتوز سوق بدهد

۵- تحریک و آزردگی سلول (Irritancy)

Viability : - اساس تست نسبت به سلول های باقی مانده در محیط می باشد

- آزمون ها بر پایه ایجاد گسست در دیواره سلول و... هستند که به حالت های زیر تقسیم می شوند

الف) نفوذ ماده رنگی به سلول جوری که در حالت عادی این رنگ قادر به نفوذ نمی باشد

ب) خارج شدن رنگ هایی که در شرایط عادی قادر به خروج از درون سلول نمی باشند

ج) خروج آنزیم "دهیدروژناز" از درون سلول

رنگ های الف) مانند: ۱- Erythrosin ۲- Trypan Blue ۳- propidium iodide (به DNA متصل می شود) (بیشترین استفاده را در گسست سلولی دارد)

۴- naphtheloreBlack

رنگ های ب) مانند: ۱- Diacetyl Fluorescein (DCF)

۲- Natral Red

DCF وقتی وارد سلول می شود به Ross متصل می شود (Reactive Oxigene) پس گسترش میزان Ross در سلول بالا رود این رنگ بهترین را برای ما مشخص می کند زیرا این رنگ به حالت عادی به سلول وارد می شود اما به دلیل ترکیب با Ross خارج نمی شود و به ترکیب دیگر تبدیل می شود.

با استفاده از این رنگ ها می توانیم نوع مرگ سلولی را مشخص کنیم

رنگ PI : هنگامی که سم جدیدی را در محیط کشت آزمایش می کنیم برای دیدن دقیق تأثیر آن بر سلول از رنگ PI استفاده می کنیم. که این رنگ با عبور از دیواره سلول به DNA متصل می شود و موجب بوجود آمدن رنگ قرمزی می گردد. با بایش یکسری استعها به محیط کشت و بررسی حلول موجع و تکرار بازتابش و رنگ ایجاد شده مشخص می شود

Scanned by CamScanner

که سلول ما دچار نکروز شده است .

- اگر فرد پاسخ سلول تدریجی باشد ← آپاپتوز یا هویی ← نکروز

پس اگر آپاپتوز اولیه باشد ← دیواره هنوز سالم است و PI تشکیل نشده ← بدون رنگ

اما اگر شدت PI بالا باشد ← نکروز یا آپاپتوز تأخیری را داریم ← مقدار رنگ زیاد است زیرا دیواره از بین رفته است و مقدار زیادی از PI وارد می شود .

MTT نیز از رنگ های است که در رنگ آمیزی برای تشخیص میزان Viability استفاده می شود . MTT توسط آنزیم های هیدروژنی میتوکندری تجزیه می شود و به ماکریستال فرمازان می دهد که رنگ ارغوانی دارد با DMS_2 آن ها را ترکیب می کنیم هرچه شدت رنگ بیشتر باشد سلول سالم تر است و اگر میتوکندری آسیب دیده باشد این حلقه ها تشکیل نمی شوند و شدت رنگ ها کم تر است .

زیست پذیری از کم ترین تست ها است که معمولاً با MTT انجام می شود تا بتوان دهیم ماده سمی ما در چه دوزی است (مشخص شدن LD_{50}) این اولین قدم برای آزمایشات سمی سلول در محیط کشت است .

پس ابتدا باید تست MTT زیست پذیری را مشخص کنیم تا از همان ابتدا غلظت مورد نیاز سم را داشته باشیم .

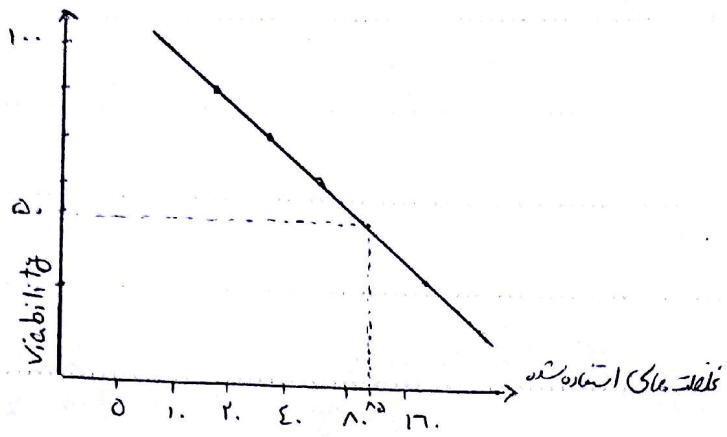
تست MTT

در سلول در حالت سالم میتوکندری آنزیم هیدروژناز دارد که با یکسری حلقه های فرمازان تشکیل می دهد که این حلقه های ارغوانی کریستال هایی ایجاد می کنند که در سطح سیتوزول سلول می نشیند و بعد کریستال ها را در یک حلال حل می کنیم که باعث ایجاد رنگ ارغوانی می شود که با اسپکتروفتومتر (یا الایزا ریدر) در طول موج 570 nm شدت رنگ را می سنجیم و مشخص می کنیم که چه مقدار از سلول ها زنده و چه مقدار مرده هستند سلول سالم و زنده می تواند حلقه های فرمازان را ایجاد کند زیرا میتوکندری سالم دارد که فعالیت می کند اما سلول مرده و بدون میتوکندری حلقه های فرمازان را تشکیل نمی دهد و در نتیجه شدت رنگ کمتر می شود این اساس تست رنگ آمیزی MTT است که در آن اندازه گیری LD_{50} تست های مربوطه را انجام می دهیم

میزان جذب = Viability = $\frac{OD\ \text{تست}}{OD\ \text{کنترل منفی}} \times 100$ = درصد سلول های زنده

Scanned by CamScanner

با توجه به نمودار تست‌های مربوط به ماده سمی را بررسی می‌کنیم



ما طبق روال گفته شده سلول‌های سالم را فیزیز می‌کنیم (که گفت چسبیده اندوخته نمی‌شوند) (پیوندهای گلیسیدی هگزی دارند و در کنار هم چسبیده شده‌اند) ← و شمارش سلول سالم و قاعدتاً بودن کار

سلول را فیزیز می‌کنیم به چه معناست؟ از درون تانک نیتروژن یک ویال را درمی‌آوریم که تا نصف آن توده سلولی است (کنیک سلولی) آن را در بن‌ماری ۳۶ درجه ذوب می‌کنیم (فیلی سریع باز می‌شود) سریعا به فلاسک منتقل می‌کنیم چند بار آن را پیپتینگ می‌کنیم (چندبار آن هارا وارد پیپت می‌کنیم تا کامل باز شوند) و بعد به فلاسک منتقل می‌کنیم و وقتی هنوز کاملا ذوب نشده ۱cc محلول گفته به این سلول‌ها منتقل می‌کنیم چرا؟ یک ماده‌ای مانند DMSO (دی متیل سولفوکساید) این ماده به شدت برای سلول سمی است و به دیواره سلول آسیب می‌زند در شرایط فریز، یک مقدار از این را به ترکیبی که همراه است سلول را با آن فریز کنیم وارد می‌کنیم تا به بخار آسیب وارد نشود البته وقتی گفته ذوب شود این ماده به سرعت آسیب می‌زند پس باید غلظت DMSO را پایین بیاوریم پس هم زمان محلول گفته اضافه می‌کنیم بعد از این دو راه داریم: ۱- یا به فلاسک می‌بریم و گفته می‌دهیم با ۲- به سلامت سلول (دیواره) مشکوک کیم و آن‌ها را می‌شماریم

گرد رجاهای مختلف شمارش سلول به ارد می‌خورد

شمارش سلول با استفاده از لام نئوبار

لام هارا مطابق شکل (صفحه بعد) دو به دو هم قرار می‌دهیم (در هر کدام از لام‌ها فضاهای وجود دارد هرکدام را به ۱۶ قسمت تقسیم می‌کنیم سلول‌ها را به زیر لام تزریق می‌کنیم تعداد سلول‌های زنده را می‌شماریم و بعد با استفاده از این فرمول تعداد سلول مفید را بدست می‌آوریم با استفاده از این روش ما تعداد سلول‌های زنده را بدست می‌آوریم

Scanned by CamScanner

زیرا ممکن است تعداد سلول ها انقدر کم شود که قابل گفت نباشد

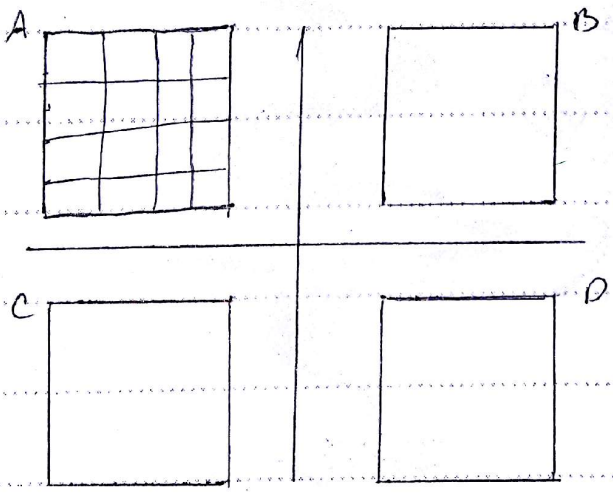
$$\text{تعداد سلول های مفید} = \frac{\text{سلول های زنده شمرده شده}}{\text{۴}} \times ۱۰^{۴} \times \text{ضریب رقت}$$

تریپان بلو رنگ مورد استفاده برای تهیه نمونه است تا سلول های با دیواره آسیب دیده مشخص شوند زیرا تیره دیده می شوند اما سلول های سالم بسیار شاداب و شفاف هستند

ما سلول های سالم یکی از این ۴ خانه را می شماریم، شمارش باید سریع انجام شود در حدود یک دقیقه زیرا دیواره سلول نسبت به رنگ آسیب پذیر است و بعد از مدتی می تواند نتیجه کاذب بدست دهد برای شمارش سریع ده قطره از سوسپانسیون و ده قطره تریپان بلو را مخلوط می کنیم و به زیر لام هاتزرتن می گذیم تا به دقت بتوانیم سلول های زنده را شمارش کنیم.

بهتر است تعداد سلول های زیاد نباشد و از محیط کشت بیش تر و سلول کم تر استفاده شود زیرا ممکن است نتیجه کاذب بدست آید به همین دلیل آن را با محیط کشت بیش تر رقیق می کنیم و بیش ضریب رقت را به آخر جدول اضافه می کنیم.

نکته: اگر سلول به رنگ بیفتد سالم است اما اگر بعد از کشت شناور بر سطح باشد آسیب دیده است



Scanned by CamScanner