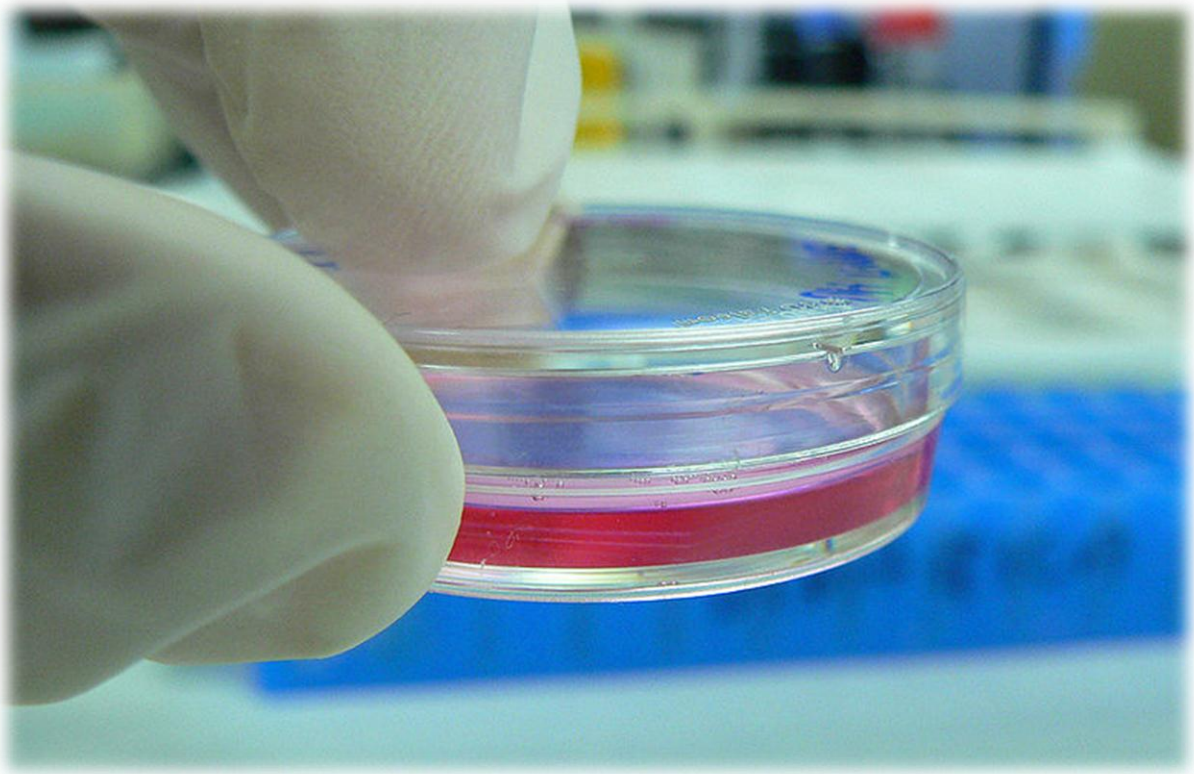
رادیوبیولوژی – جلسه ی سوم (کشت سلولی cell culture)

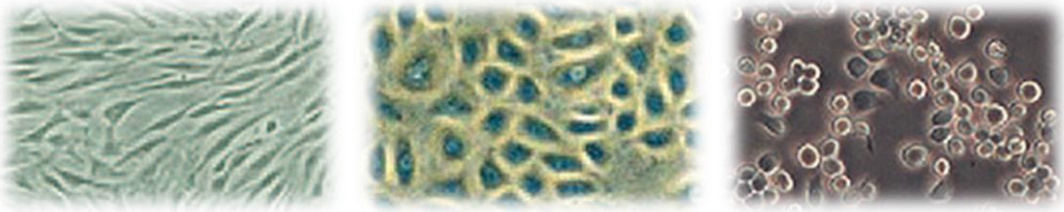
دانشجویان رادیولوژی ورودی ۸۹
دانشگاه علوم پزشکی تهران

What is cell culture?

کشت سلول یا همان کشت بافت:



کشت سلول:فراهم آوردن سلول هایی از یک مجموعه ی حیاتی که تحت تاثیر یک عامل بیرونی قرار می گیرند.



از سه نوع سلول بر اساس شکل و ظاهر در محیط کشت سلولی استفاده می شود:

1)سلول های شبیه اپی تلیال(epithelial-like cells)

2)سلول های شبیه لنفوبلاستی(lymphoblast-like cells)

3)سلول های شبیه فیبروبلاستی(fibroblastic-like cells)

In vitro : (within the glass,i.e,in a test tube or petri dish)(خارج بدن درواقع محیط آزمایشگاهی)سلول از بدن گرفته می شود و در یک محیط آزمایشگاهی تغییرات بر روی آن اندازه گیری می شود.

In vivo : (within the living) سلول در محیط بدن است که ممکن است مبتلا باشد و یا آن هارا مبتلا کنیم.

اساسا تحقیقات به صورت in vitro شروع می شود، که در واقع خلاصه شده ی سیستم in vivo می باشد.

در شرایط in vitro خون نداریم و سیستم ساده شده می باشد بنابراین نتایج بهتر تحلیل می شود، پس از جهت تحقیق خوب است اما نمی دانیم که در بدن هم همین طور جواب می دهد یا نه!

مانند همین کاررا باید دریک سیستم in vivo تست کنیم، بنابراین ابتدا ان را در حیوانات برسی میکنیم بعد یک جامعه ی کوچک از بیماران (pilot study) را انتخاب را و آزمایش می کنند--> سپس یک جامعه ی بزرگ تر--> معرفی به عنوان یک روش یا دارو --> follow up تا ده سال

در in vitro باید سلول ها را از یک منبعی تهیه کنیم که این سلول می تواند از منشا سالم(مانند لنفوسیت ها) یا غیرسالم (تومور) گرفته شود. وقتی منبع تغییر می کند شرایط کار هم عوض می شود.

- به ازای تنوع در سلول تنوع در سرطان

تهیه ی سلول :

تومور را به هود کشت سلول(هود لامینار فلو) می برند، این کابینت ها که مناسب مراکز تحقیقاتی کوچک می باشند در آن ها محوطه ای طراحی شده است با موتور هایی که هوا را با سرعت زیادی به دور این محفظه به حرکت در می آورند و همچنین فیلتر هایی که عوامل میکروبی و ... را از هوا می گیرند و فضا را کاملا استریل می کنند. سپس شروع به بریدن تومور و تبدیل به قطعه های کوچک می کنند. بر روی آن آنزیم trypsin می ریزند تا جداره ی سلولی (ماتریکس بین سلولی) را هضم کند و به صورت single cell در آیند که در این حالت به آن ها سوسپانسیون سلولی می گویند. البته آنزیم های collagenase و pronase هم قابل استفاده می باشند. و سپس این آنزیم را با فسفات بافر نمکی(PBS) خنثی می سازند، حال باید شرایطی را فراهم کرد که در آن سلول بتواند به بقای خودش ادامه دهد.

Laminar flow(class II) :(جهت آشنایی):برخی از ویژگی های آن عبارتند از:مجهز به فیلتر اصلی هپا که ازبین برنده ی ذرات 0.3 میکرون با خلوص 99.99٪ و فیلتراگزوز- مجهز به روشنایی و UV با کلید مربوط - شیرگاز-فن 1400دور-ساعت جهت نمایش

میزان کارکرد دستگاه و ...

از هر روشی که برای کشت استفاده می کنیم به علت افزایش سلول ها و کاهش منابع غذایی باید سلول ها را ساب کالچر یا همان پاساژ داد. بدین ترتیب سلول ها در چرخه رشد خود باقی می مانند و نمی میرند. بعد از پاساژ دادن های مختلف بالاخره سلول های ما به دست می آید که به آنها لاین سلولی (cell line) می گویند. در واقع ما در این لاین ها ویروس ها (یا هر چیز دیگه که نیازش داریم) را کشت می دهیم. این لاین های سلولی به صورت تجاری در دسترس هستند وانواع مختلفی دارند. با توجه به نوع سلولی که به آن نیاز داریم می توانیم از آنها استفاده کنیم.

subculture: پروسه ی کشت مجدد سلول ها بارها و بارها برای چندین مرتبه و به مدت چندین ماه تکرار می شود این عمل را اصطلاحا subculturing می گویند و هر کدام از سیکل های آن را در اصطلاح passage می نامند.

شرایط رشد سلول ها عبارتند از:

• مکان سربسته جهت حفاظت از عوامل بیرونی(flask).این ظروف ابعاد و اندازه های مختلفی دارند که حداقل آن 25 سانتی متر مربع می باشد. نوع دیگری از فلاسک ها petri dish نام دارند که دایره ای شکل می باشند.

•medium:مایعی حاوی عناصری برای بقای سلول،املاح و مواد مورد نیاز را در اختیار سلول قرار می دهند و همچنین سلول مواد دفعی اش را به آن بر میگرداند، به رنگ انار است ☺ پس از مدتی بدلیل متابولیسم سلول ها و مواد دفعی انها به رنگ زرد در میاید به دلیل تغییر

ph، که در این حالت باید refresh شود. medium بسته به نوع سلول مورد استفاده تغییر می کند .(البته بعد نیاز هست که مدیوم را با پپتوری بیرون بکشند).

•درجه ی حرارت باید حدودا 37 باشد،مناسب برای انجام فعالیت های متابولیکی

•انکوباتور(incubator):ابزاری آزمایشگاهی برای کشت و رشد دادن نمونه های زنده است. این وسیله با کنترل دما از طریق المنت هایی و رطوبت و CO2 شرایط مناسبی را برای رشد سلول فراهم می کند. این دستگاه توسط یک پزشک اطفال فیلیپینی به نام fe del mundo اختراع شده است. تنظیم دما از دو راه ---><1-انکوباتور 2-هاتروم (hot room) :در صورتی که کشت زیاد باشد از هاتروم که اتاق هایی با ابعاد بزرگ هستند استفاده می شود.

رعایت برخی نکات به هنگام استفاده از انکوباتور ضروری می باشد:

تعویض به موقع ظرف آب داخل دستگاه- برای جلوگیری از آلودگی در انکوباتور لازم هست که قفسه و دیواره ها همواره خشک باشند-از گذاشتن مواد فرار یا قابل اشتعال در آن جلوگیری شود و ....

• CO2 (3-5%) و1:O2)استفاده از کپسول هایی که حاوی این گاز ها هستند.شیلنگ متصل به کپسول را 1-2 min در داخل فلاسک گذاشته تا دمیده شود درآن و این گاز تا 1هفته برای سلول ها کافی می باشد. تامین گاز سلول ها به این طریق برای هاتروم مناسب می باشد.

2)تامین این گاز ها از طریق انکوباتور هم ممکن است(انکوباتور CO2). دیگر نیازی به محکم بستن درب فلاسک ها نیست باید کمی شل باشد تا اکسیژن به این طریق وارد گردد و دی اکسید کربن هم از طریق کپسول CO2 متصل به انکوباتور تامین می شود.

علت ضرورت وجود co2 درمحیط کشت: تا با بیکربنات سدیم محیط کشت یک سیستم بافری مشابه خون را تشکیل میدهند و PH را در حد تعادل نگه میدارند. این سیستم به دلیل داشتن کم ترین میزان سمیت برای سلول ها بیش تر از سایرین مورد استفاده قرار می گیرد. PH بهینه برای رشد کشت های سلولی بین 7/4-7/7 می باشد.

بافر:در عرض چند دقیقه کوچک ترین تغییرات در PHرا خنثی می کند.دارای یک جز اسیدی و یک جز بازی می باشد.

•فاکتور های رشد(growth factors):از دیگر عواملی هستند که اگر در مجموعه ی سلولی قرار نگیرد تکثیر سلولی اتفاق نمیفتد. حدودا 10٪، البته بسته به نوع سلول فرق می کند.این فاکتور ها از سرم جنین گاو گرفته می شود (fetal bovine serum)FBS . calf=bovine.

•PH:7/7-4/7

•Glucose concentration: افزایش غلظت قندها، چه در داخل بدن و فضای پلاسمای و چه در محیطهای کشت سلولی در آزمایشگاه می‌تواند تاثیرات مخربی در فرآیند حیات و عملکرد سلولها داشته باشد.

•سیستم دفاعی:استفاده از آنتی بیوتیک ها و آنتی مایکوتیک ها مقاومت سلولی را افزایش می دهد. بیش تر از محلول پنیسیلین و استرپتومایسین استفاده می شود. در کاربرد آنتی بیوتیک ها بحث های زیادی وجود دارد. برخی می گویند سبب تغییر و جهش در رفتار سلولی می شود به همین دلیل توصیه نمی گردد. به این صورت عمل می کنند که اگر long term culture (کشت طولانی مدت)باشد معمولا از آنتی بیوتیک استفاده می کنند ولی در short termها (کشت های کوتاه مدت) نه!

•ضد قارچ ها

با این مواد و شرایط می توان کشت سلول را آغاز کرد.

سیستم monolayer: به معنای تشکیل یک لایه نیست. ما چند لایه داریم. ضخامت لایه ای به گونه ای می شود که رسیدن هوا و مواد غذایی به سلول ها مشکل می شود و از چرخه ی سلولی خارج می شوند و به G0 هدایت می شوند و ایجاد سلول های جدید کم می شود.

سلول ها از نظر نحوه ی کشت یافتن در محیط کشت به دو دسته تقسیم می شوند:

1- سلول‌های وابسته به بستر (Anchorage dependent): این سلول‌ها برای اینکه بتوانند تکثیر شوند، باید به سطحی متصل شده باشند. این سلول‌ها بر روی محیط کشت آنقدر تکثیر می‌شوند تا بصورت تک لایه، تمام سطح محیط کشت را فرا گیرند. پس از آن بعلت

اثر فرایند ممانعت تماسی تکثیر سلول‌ها، متوقف می‌شود. سلول‌های ترانسفورم شده بعلت اینکه پروتئین‌های سطحی خود (که در ممانعت تماسی نقش دارند) را از دست داده‌اند، می‌توانند بصورت چند لایه رشد کنند.

برای کشت سلول‌های وابسته به بستر، به بسترهای خاصی نیاز است. شیشه بعلت دارا بودن بار منفی بهترین سطح برای اتصال سلول‌ها است. از سطوح پلاستیکی (دارای بار مثبت)، در صورتیکه بکمک اشعه‌های یونیزه کننده، بار زدایی شوند نیز می‌توان استفاده کرد.
سلول‌ها بکمک پروتئین‌های سطحی خود مانند: اینتگرین‌ها، فیبرونکتین، کلاژن و لامینین به این سطوح متصل می‌شوند.

2- سلول‌های غیروابسته به بستر (Anchorage Independent): این سلول‌ها برای تکثیرو زنده ماندن لازم نیست قبلا به سطحی متصل شده باشند.مانند سلول‌های بنیادی هپاتوسیتی و یا رده‌های سلولی ترانسفورم شده.