بسمه تعالی

گروه جزوه نویسی رادیوبیولوژی

جلسه چهارم

پاییز 91

همان طور که در جلسه سوم گفته شد سلول ها به صورت یک لایه کف فلاسک را می پوشانند . پس از آن چندین لایه روی لایه قبلی ساخته می شود . به دلیل کمبود اکسیژن و مواد غذایی و نرسیدن به لایه های زیرین تقسیم سلولی متوقف می شود و سلول ها در فاز G_0 باقی می مانند . یکی از دلایلی که درمان تومور در کانسر را دشوار می کند تعداد سلول هایی هستند که در فاز G_0 قرار می گیرند . چون سلول در این فاز مقاوم هستند و نسبت به اشعه مقاومت نشان می دهند . این سلول ها از بین نمی روند و دوباره شروع به تقسیم می کنند و باعث می شود که بیماری مجددا عود کند . قبل از شروع تحقیقات روی یک تیره سلولی خاص باید یک ذخیره کافی از آن سلول ها را در آزمایشگاه داشته باشیم . که معمولا در تانک نیتروژن نگه داری می شوند .

رده یا تیره سلولی (CELL LINE) : یک سری از شرکت ها کارشان تامین تیره های سلولی است که یا به صورت کشت داده شده در فلاسک و یا در تانک نیتروژن به آزمایشگاه تحویل داده می شود . این شرکت ها فقط اطلاعاتی مثل سن – تعداد کروموزوم – پاتولوژی سلول و این که در چه مرحله ای از رشد قرار دارند به ما می دهند ولی سایر اطلاعات را به پژوهشگر نمی دهند چون ممکن است با شرایط محیط و کشت در هر آزمایشگاه متفاوت باشد .

زمان دوبرابر شدن سلول (DOUBLING TIME) : مدت زمانی است که طول می کشد جمعیت سلولی دوبرابر شود و اهمیت محاسبه آن به دلیل این است که سرعت رشد سلول ها را نشان می دهد . برای مثال سلولی که آرام رشد می کند مقاوم تر است . و دوز داروهای استفاده شده برای سلول مقاوم و حساس متفاوت است . زمانی که سلول ها به کف فلاسک چسبیده اند و سطح آن را پوشانده اند (در حالی که هنوز فضا برای رشد دارند) مدیوم (مایعی است حاوی عناصر لازم برای بقا سلول . مانند نمک های آلی سدیم – منیزیم و کلسیم) از فلاسک خارج می شود و آنزیم به فلاسک اضافه می شود . این آنزیم با حفظ جداره سلولی باعث کنده شدن آن از کف فلاسک می شود . پس از جدا کردن سلول ها از کف فلاسک آن ها را با محلول بافر فسفات می شورند و تعداد آن را می شمارند و مجددا آن ها را کشت می دهند . به این عمل اصطلاحا پاساژ (PASSAGE) گفته می شود .

برای شمارش سلول از دو روش استفاده می شود :

1 – استفاده از لام های مدرج که تعداد سلول ها در هر خانه شمرده می شود .

2 - یا استفاده از دستگاه سل کانتر (CELL COUNTER) . این دستگاه از لوله هایی ساخته شده که تنها اجاره عبور یک سلول را می دهد . با عبور سلول از لوله اشعه لیزر به آن تابیده شده و دیتکتور آن را ثبت می کند و به این ترتیب سلول ها شمرده می شود .

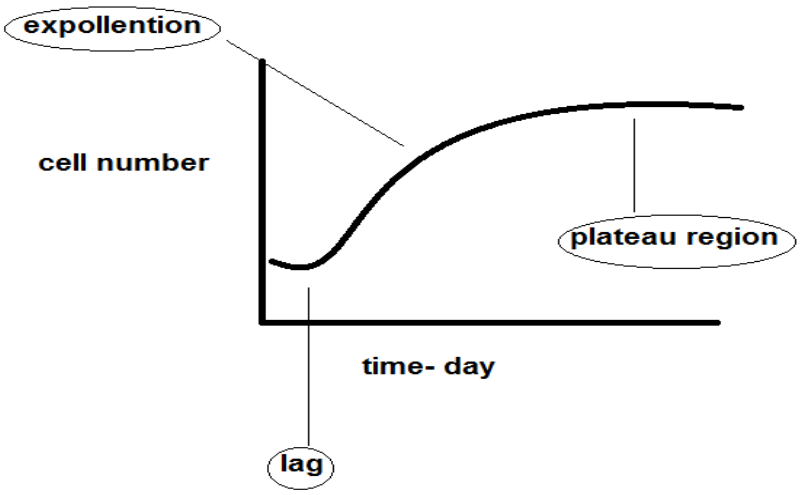
ما در کار می توانیم تا شش پاساژ ادامه دهیم ولی بیش تر از آن توصیه نمی شود . چون ما در فرآیند پاساژ از آنزیم تریپسین استفاده می کنیم که خود یک عامل محرک و جهش زا است و می تواند رفتار سلول را تغیر دهد . تحقیقات ما از پاساژ 2 یا 3 آغاز می شود تا سلول یا محیط خود را وفق دهد و آداپته شود .

پلیت های کشت سلولی : صفحه ای است دارای تعدادی حفره که بسته به کار از پلیت های با حفرات کم یا زیاد استفاده می شود . حفره های پلیت محلی است که ما سلول ها را در آن می کاریم . وقتی سلول ها به پاساژ دو و سه رسیدند در هر کدام از حفره ها حدود 1000 سلول می ریزند به آن مدیوم اضافه می کنند و داخل انکوباتور می گذارند .

چرا بیش تر نمی ریزند ؟

چون هرچه تعداد سلول ها بیش تر باشد زمان رسیدن به پایان کار در روز های کوتاه تری اتفاق می افتد و نقاط اندازه گیری ما کاهش می یابد و خطا در محاسبه بیش تر می شود (با مطالعه نمودار متوجه می شوید)

فردای آن روز آنها را از انکوباتور خارج می کنند و هر روز تقریبا سه تا از آن ها را می شمارند . هر حفره جداگانه شمارش می شود و در نهایت میانگین آن ها گرفته می شود . زمانی که دیگر به حجم سلول ها اضافه نشد این کار متوقف می شود و با توجه به آطلاعات نمودار زیر رسم می گردد .



ابتدا یک کاهش در تعداد سلول ها مشاهده می شود سپس سلول ها شروع به زیاد شدن می کنند تا در منطقه پلاتو تعداد آن ها ثابت می شود . با توجه به نمودار بالا که براساس شمارش سلول ها کشیده شده با کم شدن تعداد روز ها نقاط اندازه گیری کاهش می یابد و محاسبه دارای صحت لازم نیست .

لگ (lag) : وقتی سلول را می کاریم به دلایل مختلف یک سری از بین می روند که یا سلول مشکل داشته یا تاثیر تریپسین روی سلول بوده است . گاهی ممکن است به دلیل پیپتاژ کردن به سلول صدمه بخورد . که جمعیت کم می شود و از رقم اولیه پایین تر می آید .

باقی مانده آن ها شروع به رشد می کنند و تعدادشان زیاد می شود (قسمت expollention) با زیاد شدن سلول ها لایه ها روی هم قرار می گیرند و پلاتو منحنی را می سازند .

ناحیه expollention = ناحیه نمایی

ناحیه پلاتو = ناحیه ثابت

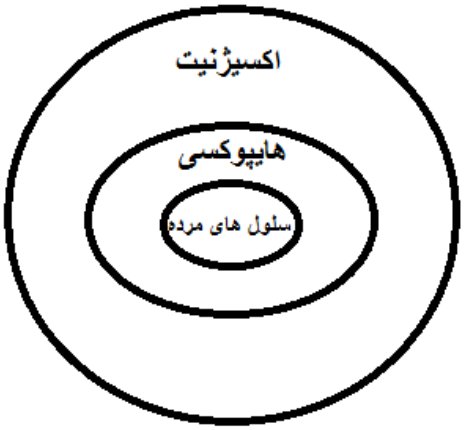
زمان دو برابر شدن سلول ها از ابتدای ناحیه نمایی تا ابتدای ناحیه پلاتو در نظر گرفته می شود و بر اساس شیب این ناحیه doubling time محاسبه می شود .

با توجه به این که هر تومور با پاتولوژی های مختلف ویژگی های مختلفی دارد این منحنی درباره ویژگی تومور می تواند به ما کمک کند .

پروسه تشکیل تومور :

ابتدا سلول یک جهش پیدا می کند و شروع می کند به تقسیم شدن و یک میکروتومور تشکیل می دهد . و چون قطر کمی دارد عروق اطراف اکسیژن و مواد غذایی آن تومور را تامین می کنند و باعث بزرگ تر شدن آن می شود . هرچه تومور بزرگ تر می شه اکسیژن و مواد غذایی به مقدار کم تری به تومور می رسد . به این ترتیب سلول های درونی تر در فاز هایپوکسی یا کمبود اکسیژن قرار می گیرند . که این کم شدن اکسیژن سبب تغییر رفتار سلول می شود . بزرگ شدن سلول تا جایی ادامه پیدا می کند تا سلول های داخلی بمیرند .

یک تومور می تواند دارای لایه های زیر باشد :



سلول اکسژنیت با سلول هایپوکسی از نظر رفتار متفاوت هستند . تاثیری که اشعه روی سلول های هایپوکسی و اکسیژنیت می گذارد با یک دیگر متفاوت است و میزان تخریب و سرعت ترمیم سلول نیز متفاوت است . و همین در درمان کانسر مشکل ایجاد می کند .

قسمت نمایی نماینده ای است از سلول های اکسیژنیت چون زمانی است که فضا و مواد غذایی لازم برای رشد وجود دارد و پلاتو مسئول سلول های در عمق تر هستند (هایپوکسی) که اکسیژن و مواد غذایی برای آن ها کاهش پیدا کرده است . بنابراین نمودار در اشعه دادن بیمار ما را یاری می کند .

برای مثال با توجه به نمودار می توان فهمید که قسمت مورد بررسی چه مدت در ناحیه نمایی است . اگر بخواهیم ناحیه پلاتو را بررسی کنیم می توان فهمید از کدام روز به بعد در ناحیه پلاتو قرار دارد .

هم چنین این نمودار برای تجویز دارو مناسب است . برای مثال برخی داروها تنها باید در زمان سنتز استفاده شوند . واستفاده از این نمودار به ما کمک می کند .

پتانسیل رشد (plating efficiency = PE) :

توانایی سلول در تولید مثل را گویند . این به این معناست که چند تا از سلول های من توانایی ایجاد کلونی دارند . جمعی از سلول ها که تعداد آن ها بیش از 50 است کلونی محسوب می شوند . برای مثال اگر از صد سلول ما هفتاد عدد کلونی

ایجاد کنند PE برای این رده سلولی برابر هفتاد درصد است .

معمولا در فاصله 3 تا 4 GENERATION کلون ها را می شمارند . که این بسته به تجربه محقق دارد.

زمان شمارش مهم است .

برای مثال اگر در هنگام شمارش با تعدادی مجموعه زیر 50 مواجه شویم و برای اینکه تعداد آن ها به 50 برسد چند روز صبر کنیم . کلونی هایی که وجود دارند نیز همراه این مجموعه های زیر 50 رشد خواهند کرد . در نتیجه کلونی ها به هم می چسبند و تمایز آن ها دشوار می شود . قبل از این که بوردر کلونی ها به هم بچسبد باید شمارش انجام شود .

هنگام شمارش مدیوم خارج می شود و از محلول بنفشی که سیتوپلاسم را رنگ می کند و فوشین نام دارد استفاده می شود

فرمول PE :

$$PE = \frac{\text{کولونی به دست آمده}}{\text{تعداد سلول کاشته شده}} \times 100$$

اگر PE پایین باشد سلول ضعیف است و اگر اشعه داده شود اسیب جبران ناپذیر می خورد و قابل بررسی نیست . و اگر PE بالا باشد نشان دهنده قوی بودن سلول است که اگر دوز ضعیف باشد اثری روی آن ندارد .

میزان پاساژ نیز در سلول های توموری و سالم فرق می کند . در سلول های توموری اگر ما تا 100 پاساژ هم انجام دهیم سلول رشد می کند . اما در سلول های نرمال پس از 10 تا 15 پاساژ سلول از بین می رود .

این هم یک سری عکس مربوط به وسایل مورد استفاده در آزمایشگاه کشت سلولی :

XC34/18
تانک نیتروژن

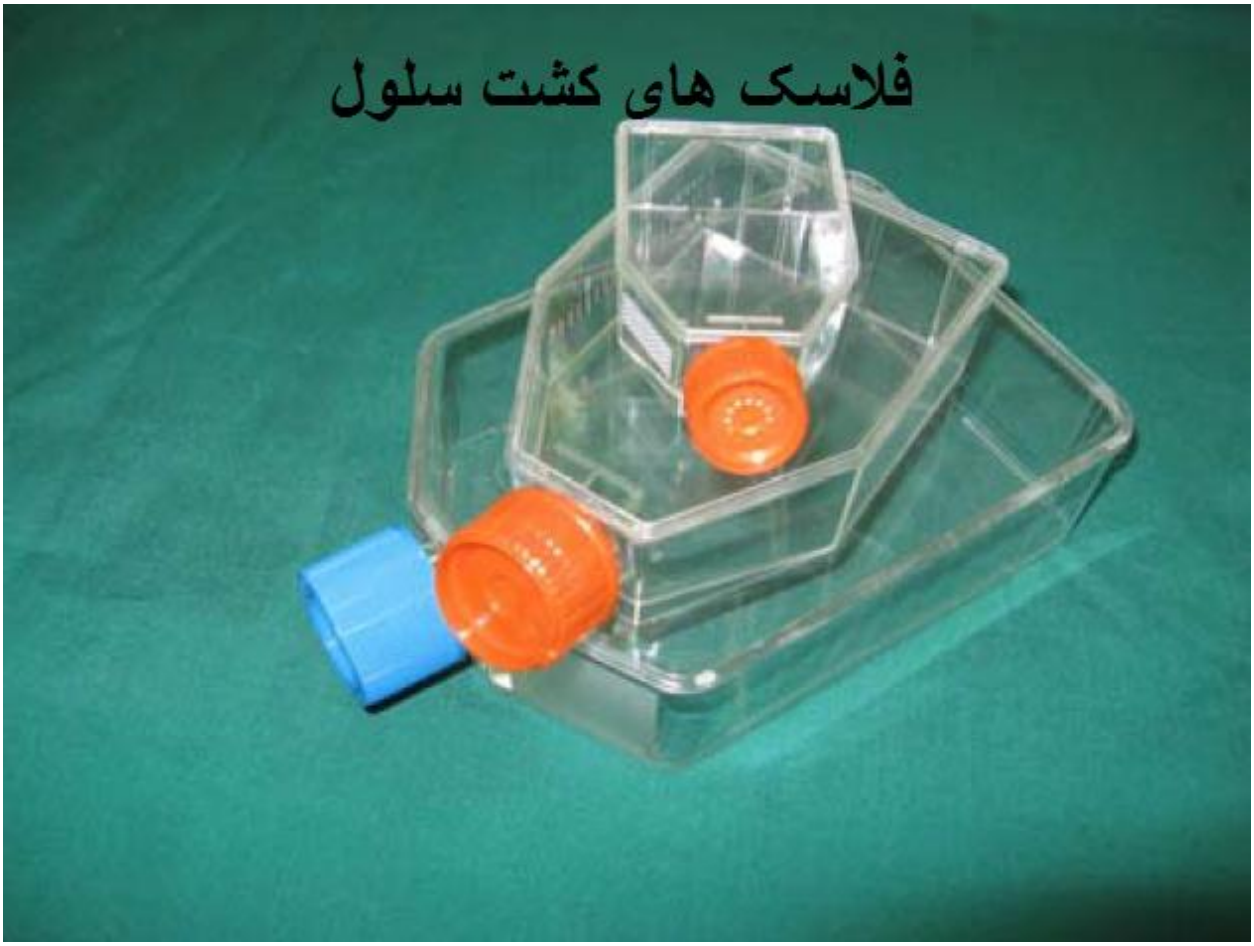
هود لامینار
JTLVC2X

انکوباتور دی اکسید کربن
Heal Force
HF160W

انکوباتور معمولی
DENA

اتوکلاو

پلیت های کشت سلول


فلاسک های کشت سلول

استفاده از پیپت معمولی