اصول و روش‌های کشت

سلول‌های جانوری

گردآوری و تدوین:

دکتر شاپور حسن زاده

(عضو هیات علمی دانشگاه ارومیه)

و

فرزانه بنیادی

(دارار بورد تخصصی بافت‌شناسی)

حسن زاده، شاپور.

اصول و روشهای کشت سلول های حانوری/ گردآوری و تدوین شاپور حسن زاده و فرزانه بنیادی.- ارومیه: انتشارات دانشگاه ارومیه،۱۳۹۵.

۳۱۵ص.:مصور،جدول، نمودار.-(انتشارات دانشگاه ارومیه،۱۹۹).

کتابنامه.

۱.یاخته ها- کشت- دستنامه آزمایشگاهی. ۲. بافت ها- کشت- دستنامه آزمایشگاهی. الف. بنیادی، فرزانه، مترجم. ب. فروست. ج. عنوان.

شماره ملی: ۴۲۷۵۱۹۳ – رده گنگره ۱۳۹۵،۶الف۵ح/۲،۵۸۵/QH

عنوان: اصول و روش‌های کشت سلول‌های جانوری

گردآورنده : شاپور حسن زاده و خانم فرزانه بنیادی

ناشر: دانشگاه ارومیه، سری ۱۹۹

سال نشر:۱۳۹۵

شابک:۰-۸۸-۶۶۴۸-۶۰۰-۹۷۸

قیمت:

پیش گفتار

پیشرفت‌های بدست آمده در زمینه علوم بیولوژی سلولی و مولکولی، فراهم شدن روش‌های نوین کشت سلول‌های جانوری، پیشرفت‌های حاصل در خصوص ژنتیک و مهندسی ژنتیک و به دنبال آن فراهم شدن امکان دستکاری‌های مطلوب ژنتیکی آن‌ها، باعث شده است که دانش بشر شتاب بیشتری بگیرد. یکی از نیازهای اساسی در زمینه کشت سلول‌های جانوری، دستیابی به تکنیک‌های تعدیل و کامل شده جهت تهیه، کشت، نگهداری، ایجاد بانک‌های رده‌های سلولی و جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی در جهت ایجاد بهترین شرایط کشت است. این کتاب با هدف جبران کمبودهای موجود در زمینه کتب کشت سلول به زبان فارسی و نیز ارائه مطالب جدیدتر در زمینه کشت سلول‌های جانوری، گرداوری و تالیف شده است و شامل ۵ بخش مجزا و ۱۷ فصل است که در آن‌ها به مفاهیم و اصطلاحات پایه کشت سلولی، بیولوژی سلولی، نحوه آماده‌سازی آزمایشگاه کشت سلول، محیط‌های کشت و بسترهای مورد نیاز برای کشت و در نهایت فنون کشت پایه انواع سلول‌ها، پرداخت شده است. در کل تلاش این مجموعه بر ارائه اصول کشت و تکنیک‌ها و نکات ارزشمند آزمایشگاهی بوده است.

برای تهیه این مجموعه از آخرین منابع اطلاعات علمی اعم از کتب و مقالات مربوطه استفاده شده است که در پایان بخش‌ها به صورت مرجع آورده شده‌اند. امید می‌رود این کتاب مورد توجه تمامی علاقه‌مندان به علوم سلولی، محققان و دانشجویان قرار گرفته و مفید واقع گردد.

با توجه به وجود واژه‌های علمی و تخصصی بسیار در زمینه علوم کاربردی و کشت سلول‌های جانوری، از واژه‌های فارسی معادل مناسبی در این مجموعه استفاده شده است و برای درک بهتر مفاهیم واژه‌ای، فهرستی از اختصارات ذکر شده در متن کتاب، در ابتدای کتاب آورده شده است.

با وجود تلاش و توجه بسیاری که برای جلوگیری از اشتباه در نوشتار این کتاب صورت پذیرفته است، امکان اشتباه در هر زمان همچنان وجود دارد. بنابراین از تمامی خوانندگان محترم تقاضا می‌گردد در صورت برخورد با چنین اشتباهاتی، با ارسال نظرات خود موجب رفع اشتباهات در چاپ‌های بعدی گردند.

فهرست مطالب

بخش اول: کلیات

فصل اول: مقدمه و پیشینه نگری علم کشت سلول

مقدمه........ ۱
تعریف........ ۱
پیشینه تاریخی........ ۲

فصل دوم: آشنایی با اصطلاحات رایج در تکنیک‌های کشت سلول و بافت

اصطلاحات رایج در کشت سلول........ ۹
اصطلاحات مرتبط با زیست‌شناسی سلول‌ها در کشت........ ۱۳
اصطلاحات مرتبط با انتخاب مواد........ ۱۴
خصوصیات سلول‌های طبیعی و تغییر شکل یافته........ ۱۵
رفتار رشد سلول در شرایط آزمایشگاهی........ ۱۸

فصل سوم: مزیت‌ها و محدودیت‌های کشت سلول و بافت

مزیت‌های کشت سلول و بافت........ ۲۱
محدودیت‌های کشت سلول و بافت........ ۲۲
منابع........ ۲۴

بخش دوم: بیولوژی سلولی

فصل اول: کلیاتی درباره سلول

سلول چیست........ ۲۶
نظریه سلولی........ ۲۶
اندازه سلول‌ها........ ۲۸
ساختمان سلول........ ۲۹
نظر بیوشیمیست‌ها درباره سلول........ ۳۱
شیمی سلول........ ۳۲

فصل دوم: روش‌های بیوشیمیایی مطالعه سلول

جداسازی اجزاء سلول........ ۳۵
کروماتوگرافی........ ۳۶
۱- کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی........ ۳۷
۲- کروماتوگرافی تمایلی........ ۳۷

۳- کروماتوگرافی تعویض یونی ۳۸
اتورادیوگرافی ۴۰
کشت سلول ۴۰
سیتوشیمی ۴۱
الکتروفورز ۴۱
۱- ژل الکتروفورز تک‌بعدی ۴۲
۲- ژل الکتروفورز دو بعدی ۴۲
۳- ژل الکتروفورز پالس فیلد ۴۳
۴- ژل الکتروفورز میدان معکوس ۴۳
فلوسایتومتری ۴۴
فصل سوم: چرخه سلولی
افزایش جرم در جریان چرخه سلولی ۴۶
فازهای چرخه سلولی ۴۷
تنظیم چرخه سلولی ۴۸
تقسیم میتوز ۴۹
تاثیر نقص چرخه سلولی در ایجاد سرطان ۵۱
فصل چهارم: مرگ سلولی
آپوپتوز ۵۳
نقش ارگانل‌های سیتوپلاسمی در آپوپتوز ۵۴
مسیرهای آپوپتوزی ۵۸
۱- مسیر خارجی آپوپتوز یا آپوپتوز القاء شده توسط گیرنده‌های مرگ ۵۸
۲- مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوپتوز ۵۹
نکروز ۶۰
تفاوت نکروز با آپوپتوز ۶۲
اتوفاژی ۶۴
منابع ۶۵
بخش سوم: آزمایشگاه کشت سلولی
فصل اول:تجهیزات مورد نیاز در آزمایشگاه‌های کشت سلول
۱- وسایل ضروری اتاق کشت ۶۸
۲- وسایل وابسته یا سودمند ۶۸
۳- وسایل متفرقه یا مفید ۶۹
الف) دستگاه‌های مورد نیاز در آزمایشگاه کشت سلول ۶۹

ب) لوازم مصرفی..... ۸۱
ج) مواد مصرفی..... ۸۶

فصل دوم: آماده سازی و استرلیزاسیون آزمایشگاه کشت سلولی

طراحی اتاق تمیز (اتاق بدون پاتوژن)..... ۸۸
رده‌بندی اتاق تمیز (اتاق بدون پاتوژن)..... ۹۱
بهداشت شخصی در آزمایشگاه کشت سلول..... ۹۲
ایمنی عمومی در آزمایشگاه‌های کشت سلول..... ۹۲
استرلیزاسیون..... ۹۴
چگونه شرایط استریل را در آزمایشگاه کشت سلول برقرار کنیم؟..... ۹۵
استریل سازی وسایل و ظروف..... ۹۷

فصل سوم: آلودگی در آزمایشگاه‌های کشت سلولی

آلودگی‌های مزمن و دوره‌ای در آزمایشگاه کشت سلول..... ۱۰۱
روش‌های جلوگیری از آلودگی‌ها..... ۱۰۲
انواع آلودگی‌های کشت سلولی..... ۱۰۳
۱- آلودگی باکتریایی..... ۱۰۳
۲- آلودگی با مایکوپلاسماها..... ۱۰۷
الف) رنگ‌آمیزی فلوروسنت برای تشخیص مایکوپلاسماها..... ۱۰۸
ب) آزمون PCR برای تشخیص مایکوپلاسما..... ۱۱۰
ج) رنگ‌آمیزی با DAPI..... ۱۱۲
د) روش‌های بیوشیمیایی برای تشخیص مایکوپلاسما..... ۱۱۲
۳- آلودگی با ویروس‌ها..... ۱۱۳
۴- آلودگی با پروتوزوآ..... ۱۱۵
۵- آلودگی‌های متقاطع با دیگر سلول‌ها..... ۱۱۵
۶- آلودگی قارچی..... ۱۱۵
۷- آلودگی با مخمر..... ۱۱۷
منابع..... ۱۱۸

بخش چهارم: بسترها و محیط‌های کشت سلول

فصل اول: بسترهای کشت سلول

موادی که می‌توانند به عنوان بستر کشت سلول استفاده شوند..... ۱۱۹
بسترهای مناسب برای کشت‌های سوسپانسیون..... ۱۲۰
بسترهای مناسب برای سلول‌های تحت تیمار..... ۱۲۱
عواملی که در انتخاب محیط کشت مناسب موثرند..... ۱۲۲

فصل دوم: محیط کشت سلول

پیشینه تهیه و استفاده از محیط‌های کشت ۱۲۷
منابع محیط‌های کشت ۱۲۸
اعمال عناصر عمده اضافه شده به محیط‌های کشت ۱۲۸
ساخت دستی محیط‌های کشت ۱۳۶
سایر محلول‌های مورد استفاده در آزمایشگاه کشت سلولی ۱۳۷
۱- بافر HEPES یک مولار ۱۳۷
۲- نیگروزین ۱۳۸
۳- ترپیان بلو ۰/۴ درصد ۱۳۸
۴- تریپسین ۰/۲۵ درصد ۱۳۸
۵- تریپسین- ورسن ۱۳۹
۶- ورسن (EDTA) ۰/۵۲۶ میلی‌مولار ۱۳۹
۷- محلول فریز ۱۴۰
۸- استوک معرف MTT ۱۴۰
۹- بافر گلایسین و اسید کلریدریک ۱۴۰
۱۰- بافر TBS ۱۴۰
کنترل کیفیت محیط‌های کشت ۱۴۰
محیط‌های پایه ۱۴۳

فصل سوم: سرم

محیط کشت‌های فاقد سرم ۱۴۵
مواد مغذی سرم ۱۴۶
انواع سرم ۱۴۷
منبع سرم تهیه شده ۱۴۸
تست بچ ۱۴۹
۱- تست بچ برای سلول‌های سوسپانسیون ۱۵۰
۲- تست بچ برای کشت‌های مونولایر (تک‌لایه) ۱۵۰
نحوه ذخیره‌سازی سرم ۱۵۱
تخلیص سرم ۱۵۲
۱- روش ستون سفادکس ۱۵۳
۲- روش دیالیز ۱۵۳
محیط‌های کشت ۱۵۶
معایب استفاده از سرم ۱۵۷
منابع ۱۶۱

بخش پنجم: تکنیک‌های کشت انواع سلول‌های جانوری

فصل اول: تکنیک‌های معمول در آزمایشگاه‌های کشت سلول

کلونینگ سلولی........ ۱۶۲
روش‌های شمارش سلول........ ۱۶۳
۱- لام هموسیتومتر........ ۱۶۳
۲- شمارشگر سلولی الکترونیکی........ ۱۶۵
مقایسه دو روش شمارش سلول‌ها........ ۱۶۶
ذخیره سلول‌ها........ ۱۶۷
نحوه بازیافت سلول‌ها از نیتروژن مایع........ ۱۷۲
بانک‌های سلولی و شیوه حمل سلول‌ها........ ۱۷۳
تکنیک پاساژ سلولی........ ۱۷۴
تهیه کاریوتایپ........ ۱۷۵
انتقال ژن به سلول........ ۱۷۸
۱- روش کلسیم فسفات........ ۱۷۸
۲- لیپوزوم‌ها........ ۱۸۰
۳- الکتروپوریشن........ ۱۸۱
مشاهده سلولی........ ۱۸۱
۱- میکروسکوپ فاز کنتراست........ ۱۸۲
۲- میکروسکوپ فلوروسانس........ ۱۸۵
۳- میکروسکوپ زمینه تاریک........ ۱۸۶
بررسی سمیت، شمارش و تکثیر سلول‌ها با استفاده از روش MTT........ ۱۸۷

فصل دوم: کشت‌های اولیه

اصول مهم برای جداسازی بافت........ ۱۸۹
نیازهای اولیه و مشترک برای تمامی کشت‌های اولیه........ ۱۹۰
جداسازی و کشت انواع سلول‌ها........ ۱۹۱
۱- لنفوسیت‌ها........ ۱۹۱
۲- سلول‌های ملانوسیت پوست انسان........ ۱۹۴
۳- کشت استئوبلاست‌ها........ ۱۹۶

۴- کشت سلول‌های جنینی رت ۱۹۸
۵- کشت سلول‌های جنینی جوجه ۲۰۰
۶- کشت سلول‌های کبدی جوجه ۲۰۲
۷- کشت سلول‌های قرنیه انسان ۲۰۳
۸- کشت سلول‌های هپاتوسیت رت ۲۰۴
۹- کشت اولیه سلول‌های کلیه ۲۰۵
۱۰- کشت سلول‌های اندوتلیال ۲۰۶
۱۱- کشت سلول‌های اپی‌تلیوم نای و نایژه ۲۰۶
۱۲- کشت سلول‌های اپی‌تلیالی پستانداران ۲۰۸
۱۳- کشت سلول‌های اپی‌تلیالی کولون ۲۰۸
۱۴- کشت سلول‌های اپی‌تلیوم پروستات ۲۰۸
۱۵- کشت سلول‌های ماهیچه اسکلتی رت یا جوجه ۲۰۹
۱۶- جداسازی و کشت سلول‌های عضله صاف ۲۱۰
۱۷- کشت سلول‌های ماکروفاژی موش ۲۱۱
۱۸- کشت سلول‌های آسیت ۲۱۲
۱۹- کشت سلول‌های چربی ۲۱۲
نتیجه‌گیری ۲۱۳

فصل سوم: سلول‌های بنیادی

ویژگی‌های اساسی سلول‌های بنیادی ۲۱۶
اپی‌ژنتیک سلول‌های بنیادی ۲۱۸
مدل‌های مطرح در تنظیم اپی‌ژنتیکی سلول‌های بنیادی ۲۱۹
انواع سلول‌های بنیادی ۲۲۱
۱- سلول‌های بنیادی جنینی (ES) ۲۲۲
تکنیک‌های کشت سلول‌های بنیادی جنینی ۲۲۵
۱- طراحی آزمایشگاه ۲۲۵
۲- تولید سلول‌های بنیادی جنینی ۲۲۶
۳- استفاده از لام هموسیتومتر برای تعیین تعداد سلول‌ها ۲۲۷
۴- دفریز کردن سلول‌های بنیادی جنینی ۲۲۸
۵- پاساژ سلول‌های بنیادی جنینی ۲۲۸
۶- فریز سلول‌های بنیادی جنینی ۲۲۹
۷- الکتروپوریشن سلول‌های بنیادی جنینی ۲۳۰
۸- انتخاب کلون سلول‌های بنیادی جنینی ۲۳۱
۹- جداسازی کلنی‌های سلول‌های بنیادی جنینی برای رشد یا فریز ۲۳۱

۱۰- فریز کلنی‌های سلول‌های بنیادی جنینی ۲۳۲
۱۱- آماده‌سازی DNA ۲۳۲
۱۲- ذوب کلنی‌های سلول‌های بنیادی جنینی (در پلیت‌های ۲۴ خانه) ۲۳۳
۱۳- آماده‌سازی سلول‌های بنیادی جنینی برای تزریق بلاستوسیت ۲۳۳
۲- سلول‌های بنیادی بالغ ۲۳۴
الف) سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSC) ۲۳۵
جداسازی و تخلیص سلولی ۲۳۸
نانوفیبرها و داربست‌های سلولی ۲۳۸
کاربرد در طب ترمیمی ۲۳۹
تکنیک‌های کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال ۲۴۱
۱- کشت سلول‌ها ۲۴۱
۲- دفریز کردن سلول‌های مزانشیمال فریز شده ۲۴۵
۳- پاساژ سلول‌ها ۲۴۶
۴- فریز و ذخیره سلول‌های بنیادی مزانشیمال ۲۴۷
۵- تشکیل کلنی ۲۴۷
۶- تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمال ۲۴۸
۷- انتقال ژن به سلول‌های بنیادی مزانشیمال ۲۴۹
ب)سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک یا خون‌ساز (HSC) ۲۵۴
منابع تهیه سلول‌های بنیادی خون‌ساز ۲۵۶
انتقال سلول‌های بنیادی تهیه شده به فرد بیمار ۲۵۸
استفاده از سلول‌های HSC برای درمان سرطان ۲۵۸
تکنیک‌های کشت سلول‌های بنیادی خون‌ساز ۲۵۹
۱- سلول‌های بنیادی خون‌ساز حاصل از خون بند ناف ۲۵۹
۲- کشت سلول‌های بنیادی خون‌ساز حاصل از بافت جفت انسانی ۲۶۰
۳- سلول‌های بنیادی خون‌ساز حاصل از خون محیطی ۲۶۲
۴- سلول‌های بنیادی خون‌ساز حاصل از مغز استخوان ۲۶۳
تفاوت سلول‌های بنیادی جنینی با سلول‌های بنیادی بالغ ۲۶۶
کنترل رفتار سلول‌های بنیادی ۲۶۷

فصل چهارم: سلول‌های سرطانی و رده‌های سلولی

انواع تومور ۲۷۲
ارتباط بین تلومر و سرطان ۲۷۳
آنژیوژنز و سرطان ۲۷۳
دسته‌بندی انواع سرطان بر حسب بافت آلوده ۲۷۵

رده‌های سلول سرطانی ۲۷۶
نقش رده‌های سلولی و موارد استفاده آن‌ها ۲۷۷
روش‌های ایجاد رده‌های سلولی ۲۷۸
ویژگی‌های رشدی رده‌های سرطانی ۲۷۹
کلکسیون سلول‌های سرطانی ۲۸۰
ایجاد رده‌های سلولی جدید یا استفاده از رده‌های سلولی موجود ۲۸۱
نحوه نام‌گذاری و شناخت رده‌های سلولی ۲۸۱
معیارهای انتخاب رده سلولی ۲۸۲
تکنیک‌های کشت رده‌های سلول سرطانی ۲۸۲
۱- تهیه رده سلول سرطانی از تومور سرطانی ۲۸۲
۲- نگهداری و غذادهی روتین سلول‌های سرطانی ۲۸۳
۳- تهیه ساب کالچر از سلول‌ها ۲۸۴
۴- اجتماع سازی ۲۸۵
۵- شمارش سلول‌ها ۲۸۶
۶- فریز و نگهداری سلول‌ها ۲۸۷
۷- بررسی حساسیت سلولی: روش استاندارد کلونوژنیک ۲۸۸
۸- سنجش سیتوتوکسیتی بر اساس تشکیل کلنی ۲۹۰
۹- بررسی آپوپتوز با استفاده از روش تانل ۲۹۱
۱۰- بررسی آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی انکسین و پروپیدیوم یدید (PI) ۲۹۴
۱۱- سنجش آنژیوژنز ۲۹۶
۱۲- تشخیص پیری در سلول‌های سرطانی ۲۹۷
۱۴- آنالیز DNA رده‌های سلولی سرطان انسانی توسط فلوسایتومتری ۳۰۲
منابع ۳۰۶
پیوست ۳۱۲
ایندکس موضوعی ۳۲۳

فهرست اختصارات:

۳T۳: Mouse embryonic fibroblast cell line
۳T۳J۲: Mouse fibroblasts
۳T٦: A mouse fibroblast cell culture model
A۵۴۹: Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells
Ab-۱: p۲۱ monoclonal antibody
Ab-٦: p۵۳ monoclonal antibody
ACL: Anterior Cruciate Ligament
AD: Adipsin
ADC: Analog to Digital Converter
AI: Apoptotic Index
AMEM: Minimum Essential Medium with Alpha Modification
Apaf-۱: Apoptotic Pprotease Activating Factor
Bes: N, N-Bis-(۲-hydroxyethyl)-۲-aminoethane sulfonic acid
BFU-e: Erythroid progenitors
BHK C۱۳: Baby hamster kidney cells
BME: Basal Medium Eagle's
BMP: Bone Morphogenetic Protein
BMSCs: Bone Marrow Stem cells
BrdU: Bromodeoxyuridine
BS: British Standard
××**BSA:** Bovine serum albumin
BSC۱: Kidney Epithelial Cells of Monkey Origin
BSE: Bovine spongiform encephalopathy
BSSHanks(HBSS): Hank's Balanced Salt Solution
BSS: Balanced salt solution
$CaCl_{۲}$: Calcium chloride
$CaPO_{۴}$: Calcium phosphate
CD: Cluster of differentiation
Cdk: Cyclin-dependent kinase
cDNA: Complementary DNA
CFC-GEMM: Acolony forming unit that generates myeloid cells
CFC-mix: Colony-Forming Cell mix
CFE: Colony Forming Efficiencies
cGVHD: Chronic Graft Versus Host Disease
Ciap: Cellular inhibitors of apoptosis
C-kit: A type of receptor tyrosine kinase and a type of tumor marker
CMC: Carboxymethyl cellulose
$CO_{۲}$: Carbon dioxide
COBE: Cosmic Background Explorer, a satellite dedicated to studying cosmic microwave background radiation

CPE: Cytopathologic effect

CV١: Normal African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells

DAB: ٣, ٣'-Diaminobenzidine

DAPI: ٤', ٦-diamidino-٢-phenylindole (a fluorescentstain)

DD: Death Domain

DEAE: Diethylaminoethyl cellulose

DISC: Death-inducing signaling complex

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMF: Dimethylformamide

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DNA: Deoxyribonucleic acid

DNTPs: Deoxynucleotide Triphosphates

DOTMA: N-[١-(٢،٣,-dioleyloxy propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride

DPBS: Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline

D-PBSA: Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline

Eagles MEM: Eagle's minimal essential medium

EBSS: Earle's Balanced Salt Solution

EC$_{١٠}$: Economical medium ١٠

ECL: Chemiluminescence

ECM: Extra Cellular Matrix

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGF: Epidermal growth factor

EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium

ES: Embryonic stem cells

ESSS: Eagle's Spinner Salt solution

ETCM: Early Transcription-Competent Marks

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter

FADD/Mort١: Fas-Associated protein with Death Domain

FBS: Fetal bovine serum

FCS: Fetal Calf Serum

FDA: United States Food and Drug Administration

FGF: Fibroblast Growth Factor

FIGE: Field InversionGel Electrophoresis

FITC: Fluorescein Iso Thio Cyanate

FL: Filter of flow cytometry, Detector position

FLT٣LG: Fms-related tyrosine kinase ٣ ligand

FSC: Forward Scatter

G$_{١}$: Gap١

G$_{٢}$: Gap٢

G٤١٨: Geneticin, O-٢-Amino-٢،٧-didesoxy-D-glycero-α-D-gluco-heptopyranosyl-(١→٤)-O-(٣-desoxy-٤-C-methyl-٣-(methylamino)-β-L-arabinopyranosyl- (١→٦))-D-streptamin

G-CSF: Granulocyte- Colony Stimulating Factor

GJIC: Gap Junctional Communication

GM-CFC: Granulocyte-Macrophage Colony-Forming Cell

GM-CFU: Or GMP, a colony forming unit

GMEM: Glasgow Modification of Eagle's Medium

HA/TCP: Hydroxyapatite/ Tricalcium phosphate

HA: Hierarchical Activation

Hams F١٢: F-١٢ Nutrient Medium

HB: A defined serum-free medium for culture of myelomas, murine and human derived hybridomas, lymphoblastoid cells

HBS: Hepes Buffered Saline

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

HCl: Hydrochloric acid

HCT١١٦: Human colon cancer cells

HEK ٢٩٣: Human Embryonic Kidney ٢٩٣ cells

HEPES: ٤-(٢-hydroxyethyl)-١-piperazineethanesulfonic acid: Hanks Buffered Saline Solution

HIV: Human Immunodeficiency Virus

$HNO_{٣}$: Nitric acid

HRP: Horseradish peroxidase

HSC: Hematopoietic stem cells

HT٢٩: Human colorectal adenocarcinoma cell line

IAP: Inhibitor Apoptosis

$IC_{٥٠}$: Half maximal inhibitory concentration

ICM: Inner Cell Mass

IGEPAL: Nonylphenol Ethoxylates

IL-٦: Interleukin-٦

IMDM: Iscoves Modified Dulbeccos

ISO: International Organization for Standardization

JMEM: Minimum Essential Medium with Joklik's Modification

$K_{٢}HPO_{٤}$: Potassium phosphate

KCl: Potassium chloride

KGF: Keratinocyte Growth Factor

KGM: Keratinocyte Growth Medium

$KH_{٢}PO_{٤}$: Potassium dehydrogenate phosphate

KRBH: Kerbs-Ringer bicarbonate HEPES buffer

L-١٥: Leibovitz's L-١٥ Medium

LB: Luria Broth

LHC-٩: Aserum-free media for culture of bronchial epithelial cells

LPL: Lipoprotein lipase

LT١٥٦: Lung tumor biopsy number ١٥٦

M: Mitosis

MACS: Magnetic Activated Cell Sorting

MCDB: media developed at the department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Colorado
MEM: Minimum Essential Medium
$MgCl_{۲}$: Magnesium chloride
$MgSO_{٤}$: Magnesium sulfate
MRC: Human Fetal Lung Fibroblast Cells
mRNA: Messenger RNA
MSC: Mesenchymal stem cells
MSS: Media salt solution
MTT: ۳-(٤, ٥-Dimethylthiazol-۲-yl)- ۲،٥- Diphenyltetrazolium Bromide
$Na_{۲}HPO_{٤}$: Disodium phosphate
$Na_{۲}SeO_{۳}$: Sodium selenite
NaCl: Sodium chloride
$NaH_{۲}PO_{٤}$: Monosodium phosphate
$NaHCO_{۳}$: Sodium bicarbonate
NANOG: Homeobox protein NANOG, a transcription factor (protein)
NaOH: Sodium hydroxide
NCI-H٤٤١: Human lung adenocarcinoma epithelial cell line
NGF: Nerve Growth Factor
NHB: Nocardia globerula cells
NHBE: Human Bronchial /Tracheal Epithelial Cells
Notch: Notch signaling pathway, a cell signaling system present in most multicellular organisms
NP-٤٠: NP-٤٠ cell lysis buffer, for the preparation of cell extracts to be analyzed by Antibody Bead Immunoassay, ELISA, and Western blotting.
NRK: Normal Rat Kidney Epithelial Cells
OC: Osteopontin
Oct-٤: Octamer-binding transcription factor ٤
OM: Obliquemedium
Omi/HTRA-۲: A mitochondrial serine protease
OP: Osteocalcin, bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein
p۲۱: Cyclin-dependent kinase inhibitor ۱
P۳K: Caucasian fibroblast-like fetal lung cell
p٥۳: Tumor protein p٥۳
PBS: Phosphate Buffered Saline
PC۱۲: A pheochromocytoma of the ratadrenal medulla
PCL: Polycaprolactone
PCR: Polymerase chain reaction
PDGF: Platelet-derived growth factor
PE: Phyco Erythrin
pH: Potential of Hydrogen
PHA-M: Phytohaemagglutinin
PI: Propidium iodide

PLLA: Poly L Lactic Acid
PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride
PPLO: Pleuropneumonia-like organisms
Prot.K: Proteinase K
PT: Promiscuous Transcriotion
PTFE: Polytetrafluoroethylene
PTHR: Parathyroid hormone ١ receptor
PVC: Polyvinyl chloride
RNA: Ribonucleic acid
ROS: Reactive oxygen species
rpm: round per minute
RPMI ١٦٤٠: Roswell Park Memorial Institute medium
RT: Reverse Transcription
RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction
S: Synthesis
Sca-١: Stem Cell Antigen-١
SCF: Stem Cell Factor
SDS: Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis
SH٢: Src Homology ٢ (a protein domain within the Src oncoprotein)
SMAC/DIABLO: second mitochondria-derived activator of caspases
SMCM: Smooth Muscle Cell Medium
SN٣٨: ٧-Ethyl-١٠-hydroxy-camptothecin
Sox-٢: a transcription factor that is essential for maintaining pluripotency of undifferentiated embryonic stem cells
SSC: Side Scatter
T٤٧D: Human ductal breast epithelial tumor cell line
TAE: A buffer solution containing a mixture of Tris base, acetic acid and EDTA
TBS: Tris Buffered Saline
TCH™: A general purpose serum replacement for human cells
TCM™: A general purpose serum replacement for other species
TdT: Terminal deoxynucleotidyl transferase
TE: Tris-EDTA buffer
Tes: ٢-[[١, -dihydroxy-٢-(hydroxymethyl) propan- yl] amino] ethanesulfonic acid
TGF: Transforming growth factor
TNC: Total Nucleated Cell
TNF: Tumor necrosis factors
TPO: Thrombopoietin
Triosil: Na-metrizoate or Na-N-methyl-٣،٥-diacetamido-٢،٤،٤-triodobenzoatebasic FGF
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UCB: Umbilical cord blood

UCM: Umbilical Cord Matrix stem cells
UPW: Ultra Pure Water
USDA: United States Department of Agriculture
UV: Ultraviolet
Vcam-١: Vascular cell adhesion protein ١
Vero: Kidneyepithelial cells extracted from an African green monkey
WAJC ٤٠٤: Epithelial Basal Medium WAJC ٤٠٤ (culture media)
WI-٣٨: Human lung fibroblast cell line
Wnt: Wnt signaling pathway
X-Gal: ٥-bromo-٤-chloro-٣-indolyl-β-D-galactopyranoside
XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

بخش اول:
کلیات

فصل اول: مقدمه و پیشینه‌نگری علم کشت سلول
فصل دوم: آشنایی با اصطلاحات رایج در تکنیک‌های کشت سلول و بافت
فصل سوم: مزیت‌ها و محدودیت‌های کشت سلول و بافت

فصل اول:مقدمه و پیشینه نگری علم کشت سلول

مقدمه

امروزه کشت سلولی به یک تکنولوژی ضروری در بسیاری از شاخه‌های علوم تبدیل شده است که پایه و اساس مطالعات مربوط به تکثیر سلولی، تمایز و تشکیل محصول در شرایط کاملا کنترل شده را به خود اختصاص می‌دهد. کشت سلولی همچنین ابزاری برای توصیف کل ژنوم انسانی و تشریح مسیرهای درون سلولی و بین سلولی می‌باشد که بیان ژن را تنظیم می‌کنند. از آن دسته، زیست‌شناسی تکوینی و پاتولوژی به عنوان ابزاری برای ژنتیک‌دانانی که در سطوح مولکولی کار می‌کنند، ایمنولوژیست‌ها، جراحان، مهندسان زیستی و تولید کنندگان دارو به کار می‌رود و هنوز هم به عنوان یک ابزار اساسی برای زیست‌شناسان سلولی برای توسعه تکنولوژی است. علم کشت سلولی از یک علم ساده میکروسکوپی به تکنولوژی پیشرفته‌ای تبدیل شده است که ریشه در صنعت دارد. همچنین در علوم ریز الکترونیک، هوانوردی، نجوم، فیزیک نجوم، مهندسی هسته‌ای وجود داشته و به عنوان پلی ضروری بین تحقیقات بنیادی و اکتشافات صنعتی قرار دارد.
جایگزینی و بهبود در اندام‌ها و بافت‌هایی که آسیب دیده‌اند و یا عملکرد مناسبی ندارند، هدف علم سلول درمانی است. سلول درمانی می‌تواند با پیوند سلول‌ها به بافت‌ها و اندام‌های هدف میسر گردد. از جمله آن می‌توان به تزریق سلول‌های جنینی طبیعی به مغز بیماران مبتلا به پارکینسون اشاره نمود. کاربرد دیگری از سلول درمانی می‌تواند پیوند سلول‌های انتخاب و دستکاری شده برای ترشح محصولاتی باشد که ژن-های آن‌ها دچار مشکل و تغییراتی شده است. با این حال هزینه سلول درمانی بسیار بالا بوده و بهبود آسیب‌های بافتی پوست، استخوان و غضروف که امروزه با این روش صورت می‌گیرد، میلیون‌ها دلار هزینه را در پی دارد. چنین تکنیک‌هایی چالش‌های جدیدی را در تکنولوژی به وجود می‌آورند. تصور می‌شود که در آینده نه چندان دور درمان توسط سلول‌های بنیادی رایج گردد. سلول‌های بنیادی سلول‌هایی هستند که توانایی تمایز به انواع سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های بدن را دارند.

تعریف

مروری بر توسعه و کاربرد علم کشت سلول به عنوان اصلی ضروری برای بیوتکنولوژی سلول‌های حیوانی به نظر می‌رسد. تعریفی کلی برای بیوتکنولوژی را می‌توان به این صورت بیان کرد: اتحاد علوم طبیعی و مهندسی به منظور کاربرد ارگانیسم‌ها، سلول‌ها، اجزاء و قطعات آن‌ها و آنالوگ مولکولی برای این‌که بتوان محصولات و خدماتی را به دست آورد.

پیشینه تاریخی

شروع بیوتکنولوژی سلول‌های جانوری به دهه‌های ۴۰ و ۵۰ قرن ۲۰ ام برمی‌گردد. زمانیکه اولین محصول کشت سلول‌های جانوری در شرایط آزمایشگاهی و واکسن پولیو توزیع گردید. اعتبار این کارها بیشتر به فعالیت‌های Enders و همکارانش برمی‌گردد. آن‌ها اولین گروهی بودند که ویروس‌ها را در محیط کشت سلولی یعنی در شرایط آزمایشگاهی که با کشت کل ارگان‌ها متفاوت بود، پرورش دادند.
تا قبل از سال ۱۹۴۰ استفاده گسترده از تکنیک‌های کشت به خاطر فراهم نبودن شرایط استریل لازم محدود بود تا اینکه در اواخر دهه ۱۹۴۰ استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها کمک به گسترش بیشتر تکنیک‌های کشت سلول کرد. افزودن آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر پنی‌سیلین و استرپتومایسین به محیط‌های کشت به واسطه کاهش احتمال عفونت‌های باکتریایی، کار با کشت‌ها را آسان نمود. استفاده از یک محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک که کمتر مستعد عفونت باشد، باعث تثبیت کشت سلولی به عنوان یک تکنیک روتین قابل گسترش شد.
در طول دهه‌های ۱۹۴۰ و ۱۹۵۰ تلاش‌ها برای تولید رده سلولی انسانی با شکست مواجه شد. در همین دوران بود که سلول‌های کارسینومای انسانی نظیر رده سلولی Hela توسط Gey و همکارانش (۱۹۵۲) جداسازی گردید و معلوم شد که در کشت سلولی به شدت رشد می‌کنند. همه محققان منتظر چنین تحولی برای شروع مطالعات در زمینه سرطان‌های انسانی بودند. رده سرطانی ایجاد شده به صدها آزمایشگاه در سراسر جهان توزیع گردید. در ادامه گزارش‌هایی مبنی بر ایجاد رده‌های سلولی جدید از انواع دیگر سرطان‌ها گسترش یافت. به هر حال، با پی بردن به روش‌های آنالیز کاریوتایپ، به بررسی رده‌های سلولی و تشخیص آن‌ها پرداخته شد. تست ایزوانزیم Gartler که در آن ۱۸ رده سلولی

تولید شده بررسی شد، نشان داد که همه رده‌های سلولی موجود در واقع همان Hela بوده‌اند. با این وجود علاقه‌مندان بسیاری در زمینه مطالعات سرطان کمیته‌ای برای بررسی تشکیل دادند تا بتوانند نظر Gartler را رد کنند. Nelson-Rees که در یک مرکز کشت سلول کار می‌کرد، تشخیص داد که یافته‌های قبلی Gartler درست بوده و همه رده‌های تشخیص داده شده، از لحاظ علمی Hela می‌باشند.
بعد از کشف Enders در سال ۱۹۴۰ مبنی بر اینکه ویروس‌ها را می‌توان در کشت سلولی تهیه کرد و به عنوان واکسن استفاده نمود، کشت سلول‌های حیوانی در مقیاس صنعتی[۱] مطرح شد و کاربرد کشت سلولی برای تهیه واکسن پولیو در سال ۱۹۵۰ سرآغاز توسعه کشت سلولی به عنوان یک تکنولوژی در حال گسترش گردید.
در اوایل سال ۱۹۵۰ Earle و Eagle با آنالیز احتیاجات غذایی سلول‌های کشت شده، نقش مهمی در پیشبرد این تکنیک ایفاء کردند. در سال ۱۹۵۵ ساخت محیطی به نام EMEM، احتیاجات رشد سلول‌های Hela و سلول‌های L موش را تامین کرد. این محیط از لحاظ شیمیایی دارای مزایایی از قبیل حفظ خصوصیات و ثبات سلول‌ها، استریلیزاسیون راحت‌تر و احتمال آلودگی کمتر بود. از آن پس تا به حال محیط کشت EMEM و سایر محیط‌های وابسته به آن به طور گسترده‌ای برای کشت سلول‌ها استفاده می‌شود.
از سال ۱۹۵۰ تا امروز محدوده رده‌های سلولی موجود به طور قابل توجهی افزایش یافته است. تعدادی از سلول‌ها متحمل تغییراتی نسبت به سلول‌های اصلی در شرایط آزمایشگاهی شدند. این موضوع منجر به تغییر شکل آن‌ها به رده‌های سلولی شده است که قادر به رشد بی نهایت هستند و یا در بعضی موارد دستکاری ژنتیکی سلول‌ها، منجر به تولید محصولات مورد نظر گردید.
اولین کار ثبت شده در زمینه کشت و نگهداری سلول‌های حیوانات متعلق به Ross Harrison می‌باشد که در سال ۱۹۷۰ تکنیک قطره معلق را ابداع کرد. او یک تکه از بافت عصبی را از جنین قورباغه جدا کرده و درون مایع لنف قرار داد و از آنجا که مایع لنف لخته می‌شد، اجازه می‌داد که تکه بافتی به صورت یک قطره در زیر لام میکروسکوپ قرار گیرد. به وسیله این روش هاریسون قادر بود تا رشد سلول‌های عصبی جنین قورباغه را برای مدت چندین هفته مشاهده نماید.
بعد از هاریسون این کار به وسیله Burrows گسترش پیدا کرد. او با همکاری Alexis Carrel تکنیک‌هایی را برای کشت گسترده‌ای از سلول‌های پستانداران معرفی کرد. آن‌ها مشاهده کردند که با کنترل دقیق شرایط استریلیته قادر خواهند بود سلول‌ها را برای چندین سال کشت دهند بدون اینکه عفونتی در آن‌ها ایجاد شود. در همان زمان مشاهده شد که با استفاده از عصاره‌های جنین جوجه و مخلوط کردنش با پلاسما می‌توان شرایط خوبی برای رشد و بقاء سلول‌ها فراهم کرد. به تدریج از عصاره جنین، غذاها و فاکتورهای رشد تهیه شد و به وسیله ماتریکسی از فیبرین که از پلاسما به دست می‌آید، بستری برای اتصال سلول آماده گردید. کشت‌ها در فلاسک‌های Carrel که ظروفی کوچک با کف صاف بود، نگهداری می‌شد. این ظروف کار در شرایط استریل را تسهیل کرد.
در سال ۱۹۷۵ Kohler و Milstein امکان الحاق[۲] سلول‌هایی با منشاء مختلف، برای تولید هیبریدومای پایدار که قادر به ترشح مداوم منوکلونال آنتی‌بادی بود را توصیف کردند. همچنین در دهه ۱۹۷۰ با فراهم شدن توانایی بیان ژن‌های پستانداران در باکتری‌ها، زمینه تکنولوژی DNA نوترکیب گسترش یافت و اجازه تولید محدوده گسترده‌ای از پروتئین‌های پستانداران در کشت‌های باکتریایی را به وجود آورد. این پروتئین‌ها شامل انسولین، سوماتوتروپین (هورمون رشد)، اینترفرون و سایر مواد بودند. اگرچه در ابتدا تصور بر این بود که استفاده از چنین باکتری‌های نوترکیب جایگزین کشت سلول‌های حیوانات خواهد شد ولی بعدا مشخص شد که هر دو سیستم مزایا و معایب خاص خود را دارند که برای تولید صنعتی هر ماده بیولوژیک باید مد نظر قرار گیرند.
اساس ایجاد تکنیک‌های کشت سلولی توسط Wilhelm Roux (۱۸۸۵) که یک جنین‌شناس بود، ایجاد شد. وی نشان داد که سلول‌های جنینی جوجه می‌توانند در سرم فیزیولوژی گرم و در شرایط آزمایشگاهی[۳] برای چند روز زنده بمانند. بعدها Rous از تریپسین جهت جدا کردن سلول‌ها از تکه‌های بافت استفاده نمود که نوآوری بزرگی در تهیه سوسپانسیون‌های سلولی بود. همین امر موجب تمایز تکنیک کشت سلول از کشت بافت گردید. اگرچه هنوز هم اغلب این دو اصطلاح به اشتباه به جای یکدیگر به کار برده می‌شوند، ولی کشت بافت شامل رشد سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی درون یک ماتریکس بافتی است که ممکن است چندین نوع سلول را در برداشته باشد، در حالیکه کشت سلول رشد سلول‌ها را به‌عنوان یک میکروارگانیسم مستقل در بر می‌گیرد.

---

۱. Larg-Scale
۱. Fusion
۱. In vitro

Arnold در سال ۱۸۸۷ نشان داد که بافت‌های جدا شده از قورباغه می‌توانند در محلول گرم به مدت کوتاهی زنده بمانند. بعدها تلاش‌های بسیاری توسط گروه‌هایی از محققین انجام شد تا شرایط کشت سلولی و محیط کشت سلولی را برای افزایش ظرفیت بقاء سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی بهبود بخشند. بعد از اختراع آنتی‌بیوتیک‌ها، کشت سلولی تا حدی ساده‌تر گردیده است.

تا سال ۱۹۹۰ مطالعات فیزیولوژیکی برای افزایش بازده کشت سلولی بیشتر از این‌که پایه علمی داشته باشد، بر اساس تجارب به دست آمده در آزمایشگاه بود. به طوریکه تغییراتی در اجزاء محیط کشت یا پارامترهای محیطی مانند اکسیژن، کربن دی‌اکسید، اکسایش، pH، کاهش در مقدار آمونیاک و سطح اسیدیته در کشت صورت می‌گرفت و فقط به مشاهده پاسخ پرداخته می‌شد. مسلما با این روش گام‌هایی برای بهبود محیط‌های کشت برداشته شد اما برای تغییر و افزایش کیفیت محصول حاصله کافی نبود. این تغییرات برای نزدیک شدن به زیست‌شناسی سلولی و ژنتیک سلولی بسیار با ارزش بود. فقط یکی از مثال‌های آن می‌تواند آپوپتوز باشد. آپوپتوز به عنوان نوعی از مرگ سلولی مطرح شد که به دلیل شوک‌ها و استرس‌های ایجاد شده در کشت پیش می‌آید و همچنین به طور ژنتیکی تنظیم می‌گردد. در ۱۹۹۳ تشخیص و بررسی ژن‌های درگیر در افزایش بازده کشت بسیار موثر واقع گردید. به طوریکه امروزه داروهای پیش‌آپوپتوزی همانند آپتوسین که فسفودی استراز چرخه‌ای را مهار می‌کند، به طور انتخابی باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردد. در مقابل، مهار آپوپتوز ممکن است عمر سلول را برای تولید یک محصول و افزایش بازده آن بالا ببرد.

از جمله موارد دیگری که به طور موفقیت‌آمیزی برای افزایش کیفیت و کمیت محصول تولیدی بررسی شده است، فهم و کنترل تنظیم پروتئین، نسخه‌برداری و فرایندهای پس از ترجمه است. اهمیت آن به این دلیل است که دستکاری ژنتیکی سلول‌های جانوری مشکل‌تر بوده و بازده کشت آن در محیط‌های کشت نسبت به باکتری‌ها و مخمرها کمتر است. سلول‌های جانوری انتخاب مناسبی برای تولیدات پزشکی هستند زیرا مولکول‌های پیچیده‌ای تولید می‌کنند که از لحاظ بیولوژیکی فعال می‌باشند به این معنی که محصولات آن‌ها سه بعدی بوده و ضمن فعال بودن در بدن انسان، هیچ واکنش ایمنولوژیکی را نیز در آن به راه نمی‌اندازند.

در دوره زمانی ۱۹۸۶ تا ۱۹۹۶ زیست‌شناسی سلولی و مهندسی ژنتیک برهه‌ای را به وجود آورد که در آن محصولات جدیدی تولید گردید که قبلا تولید آن‌ها غیر ممکن بود و همچنین به کشت سلول‌هایی پرداخته شد که قبلا یا قادر به کشت آن‌ها نبودند و یا بازده کشت آن‌ها بسیار پایین بوده است. در نهایت یکی دیگر از تحولات ایجاد شده در این دهه این بود که توسط محصولات تولیدی سلول بتوان تغییراتی را بر خود سلول اعمال کرد.

امروزه تکنیک‌های کشت سلولی در دوران درخشانی از بیوتکنولوژی صنعتی قرار گرفته‌اند. پیشرفت تکنیک‌های کشت سلولی در طی سالیان متمادی به ترتیب به صورت زیر بوده است:

۱۶۶۵: Hooke در طی مطالعات و مشاهدات خود بیان کرد که وزیکول‌ها و حفره‌های مشاهده شده در چوب پنبه سلول‌های آن هستند و این شاید به عنوان نقطه شروع علم سلول‌شناسی محسوب گردد.

۱۶۷۴ و ۱۶۸۲: Malpiighi (۱۶۷۴) و Greur (۱۶۸۲) مشاهده کردند که سلول‌های گیاهی دارای مواد مایع مانندی هستند که به دیواره سلولی متصل شده‌اند.

۱۸۰۶ و ۱۸۳۰: Treviranus (۱۸۰۶) و بعدها Uugovon Mohe (۱۸۳۰) بیان کردند که سلول‌های مریستمی در ابتدا دچار طویل شدگی و سپس تقسیم می‌شوند.

۱۸۹۷: Loeb نشان داد که سلول‌های بافت پیوندی و خون در لوله‌های حاوی سرم و پلاسما زنده می‌مانند. Ljunggren نیز نشان داد که بخشی از پوست انسان در داخل مایع اسیدی می‌تواند زنده بماند. بعدها پیوند پوست به طور موفقیت آمیزی انجام شد.

۱۹۰۲: Haberland (گیاه‌شناس آلمانی) برای اولین بار کشت سلولی را در محیط کشت سلولی شامل گلوکز، پپتون و نمک‌های مختلف انجام داد.

۱۹۰۶: Beebe و Ewing تقسیم سلولی را در لنفوسارکومای سگ که پیوند شده بود، مشاهده کردند.

۱۹۰۷: Ross Granivelle Harrison طناب نخاعی دوزیستان را کشت داد و نشان داد که آکسون‌ها برای توسعه سلول‌های عصبی ایجاد می‌گردند و بعدها همین آکسون‌ها به عنوان محیطی برای کشت سلول‌های عصبی برای چند هفته استفاده شدند. Harrison به عنوان **"پدر کشت بافت"** شناخته شده است. او نه تنها نشان داد که بافت‌های زنده برای چند هفته در محیط آزمایشگاهی زنده می‌مانند، همچنین به تحقیقات نیز جهت داد و نقشی اساسی را در توسعه علم زیست‌شناسی بازی کرد.

۱۹۱۰: Burrows جنین جوجه را با استفاده از پلاسمای لخته شده جوجه کشت داد. او همچنین تاکید کرد که لنف قورباغه توده ثابت و مناسبی را که مناسب کشت سلول باشد، تشکیل نمی‌دهد و همچنین جمع‌آوری آن در مقیاس فراوان مشکل می‌باشد.

۱۹۱۱: M.R.Lewis و W.H.Lewis برای اولین بار محیط کشت سنتتیک را جایگزین محیط کشت طبیعی نمود. او نشان داد که تفاوت اساسی مشاهده شده بین محیط کشت طبیعی و سنتتیک این است که ترکیب محیط کشت طبیعی شامل پلاسما و عصاره جنینی می‌باشد، در حالیکه محیط کشت سنتتیک از اجزاء شناخته شده‌ای آماده گردیده است.

۱۹۱۲: Alexis Carrel که برنده جایزه نوبل بود، نشان داد که ترکیبات محیط کشت شامل سرم خون، سرم فیزیولوژی و عصاره جنینی می‌توانند عمر سلول‌ها را در شرایط آزمایشگاهی افزایش دهند. در سال ۱۹۱۳ او فلاسکی را تحت عنوان فلاسک Carrel (تصویر ۱-۱-۱) برای کشت ساده و راحت سلول‌ها در شرایط استریل، معرفی کرد.

تصویر ۱-۱-۱. ساختارفلاسک Carrel

۱۹۱۶: Rous و Jones تریپسین را برای جدا کردن سلول‌ها از بستر بافتی به کار بردند.

۱۹۴۷: Earls و همکارانش نشان دادند که انواع سلول‌ها در تماس با ورقه‌ای از سلوفان می‌توانند تکثیر یابند. آن‌ها بیان کردند که سلول‌هایی از نژاد L با پیش‌سازهای فیبروبلاست موشی به همراه یک عامل ایجاد کننده سرطان یعنی متیل کلانترن به صورت کلنی‌ای حاصل از سلول‌ها در محیط کشت ظاهر می‌گردند.

۱۹۴۸: Sanford Katherine، Wilton Earle و Gwendolyn سلول‌هایی را از رده سلولی موشی به دست آوردند و آن را سویه L نام‌گذاری کردند. سلول‌های L مادری از بافت‌های نرمال چربی به دست آمده و در طول ۱۰۰ روز تهیه شدند. نژاد کلون شده L۹۱۹ در مارس ۱۹۴۸ معرفی شده و به رسمیت شناخته شد. تعداد کروموزوم‌های آن بین ۶۲ تا ۶۸ متغیر بوده است.

۱۹۴۹: Joseph Morgan، HelenMorton و RaymondParker محیط کشتی تولید کردند و آن را "Formula ۱۹۹" نامیدند که حاوی سرم خون بود و کشت سلول اولیه را در شرایط آزمایشگاهی ممکن می‌ساخت. در همان سال Eagle و Karl مشاهده کردند که برای ۱۰۰ سلول یک میلی‌لیتر محیط کشت از لحاظ تغذیه کافی بوده ولی این مقدار برای ۵۰۰۰۰ سلول کافی نمی‌باشد. این پدیده به عنوان **"رشد وابسته به جمعیت"** شناخته شد. زمانیکه کشت بافت و جنین جوجه جای خود را به تولید واکسن در سال ۱۹۵۰ داد، تحول مهمی در تکنولوژی کشت سلولی ایجاد شد.

۱۹۵۱: George Gey، Ward Coffman و Mary Kubicele سلول‌های اپیتلیالی را از کارسینومای گردنی زنی به اسم Henreetta Lacks به دست آوردند که بعدها به رده سلولی Hela معروف شد. در همان سال Theodore Puck و Philip Marcus روش "Feeder Layer" را معرفی کردند که در آن توانایی تقسیم سلول‌های Hela روی لایه‌ای از سلول‌ها که توسط اشعه X غیر فعال شده اما توانایی متابولیسم آن‌ها باقی مانده بود، فراهم شد. این سلول‌های تغییر یافته به عنوان یک لایه مغذی برای رشد سلول‌ها در کشت سلولی استفاده گردید.

۱۹۵۴: Zwilling سدیم ورسنات را برای کشت بافت استفاده کرد. Levi Montalcini و همکارانش نشان دادند که عامل رشد عصب (NGF) رشد آکسون‌ها را در کشت بافت تحریک می‌کند. Robertson نیز سرم را در کشت بافت برای رشد بهتر سلول‌ها استفاده کرد. در همان سال Eagle نشان داد که سلول‌های Hela به ترکیبات آمینواسید خاصی نیاز دارند و حداقل ۱۲ آمینواسید برای آن ضروری

می‌باشند. این آمینواسیدها عبارتند از آرژنین، سیستئین، هیستیدین و تیروزین به اضافه ۸ آمینواسیدی که برای تعادل نیتروژن در انسان موردنیاز هستند مانند ایزولوسین، لوسین، لیزین، متیونین، فنیل‌آلانین، تره اونین، تروپتوفان و والین.

۱۹۶۱: Hayflick و Moorhead یک رده سلولی دیپلوئید انسانی به نام W۱-۳۸ را ایجاد کردند. در ابتدا آن‌ها تصور می‌کردند که این رده سلولی دارای طول عمر زیادی می‌باشد اما بعدها مشاهده کردند که فیبروبلاست‌های انسانی بعد از چند تقسیم محدود در محیط کشت از بین می‌روند. قدرت تکثیر محدود سلول‌های انسان در محیط کشت بعد از یافته Hayflik در ۱۹۶۵، "Hayflik effect" نامیده شد. مسئله جالب در مورد این پدیده این بود که به نظر می‌رسید سلول‌ها یک کنترل زمانی داشته باشند که به آن‌ها می‌گوید چه مدت می‌توانند زنده بمانند.

۱۹۶۵: Ham´s F۱۲ به عنوان محیطی معرفی شد که قادر است رشد سلول‌های خاصی از پستانداران را القاء کرده و آن‌ها را کلون کند. در همان سال Harris و Watkins اولین هتروکاریون از سلول‌های پستانداران را توسط القاء ویروسی بر سلول‌های انسانی و موشی تولید کردند.

۱۹۶۶: Abercrombie پدیده جالبی به نام "Contact inhibition" را معرفی کرد که در آن مهار تقسیم سلولی و بقاء در سلول‌هایی که در تماس با یک محیط جامد هستند، دیده شده است. در سلول‌های سرطانی سرعت تقسیمات میتوزی مهار نمی‌گردد. بنابراین کشت سلول‌ها مجموعه نامنظمی از چندین لایه سلولی را ایجاد می‌کنند.

۱۹۷۰: Horibate و Harris رده سرطانی P۳K را به عنوان یک رده سرطانی پلاسموسیتوما معرفی کردند.

۱۹۷۵: Kohler و Milstein اولین آنتی‌بادی مونوکلونال ترشح شده از رده سلولی هیبریدوما را تشخیص دادند. Sato و همکارانش نشان دادند که رده‌های سرطانی مختلف نیاز به ترکیبات مختلفی از هورمون‌ها و فاکتورهای رشد برای رشد در محیط کشت دارند.

۱۹۷۶: Wigler و Axel توانستند یک کپی از ژن‌های پستانداران را به سلول‌های کشت شده در محیط کشت وارد سازند و آن‌ها را از نظر ژنتیکی دستکاری نمایند.

۱۹۷۹: Sato و همکاران ترکیبات محیط کشت بدون سرم برای سلول عصبی را مشخص نمودند و بعدها تحقیقات زیادی با استفاده از کشت سلول گسترش یافت.

۱۸۸۵: شخصی به نام Rex توانست تا مدتی سلول‌های جنین جوجه را در سرم فیزیولوژی نگهداری کند که البته نمی‌توان کشت سلول نامید.

اواخر قرن نوزده: روش‌هایی به منظور نگهداری اسپرم به صورت منجمد جهت تلقیح مصنوعی امتحان گردید.

۲۰۰۷: Mario Capecchi و Oliver Smithie از امریکا و Martin Evans از بریتانیا که جایزه نوبل پزشکی را دریافت کردند، سلول‌های بنیادی جنینی موشی دستکاری شده از لحاظ ژنتیکی را بررسی کرده و در آزمایشگاه آن را برای بیماری‌های انسانی به کار بردند.

در حال حاضر، محدوده گسترده‌ای از سلول‌های پستانداران به صورت نوترکیب تهیه شده‌اند که قادر به تولید اختصاصی ترکیبات و محصولات موردنظر می‌باشند. امروزه محدوده محصولات بیولوژیک مفید که به صورت تجاری از کشت‌های سلول حیوانات تهیه می‌گردد و اغلب پروتئین یا گلیکوپروتئین هستند، در حال گسترش است.

فصل دوم: آشنایی با اصطلاحات رایج در تکنیک‌های کشت سلول و بافت

قبل از اینکه به جنبه‌های علمی روش‌های کشت سلول بپردازیم، بهتر است آشنایی مختصری با اصطلاحات کشت بافت و سلول داشته باشیم. در این فصل بررسی مختصری از این اصطلاحات انجام می‌گردد:

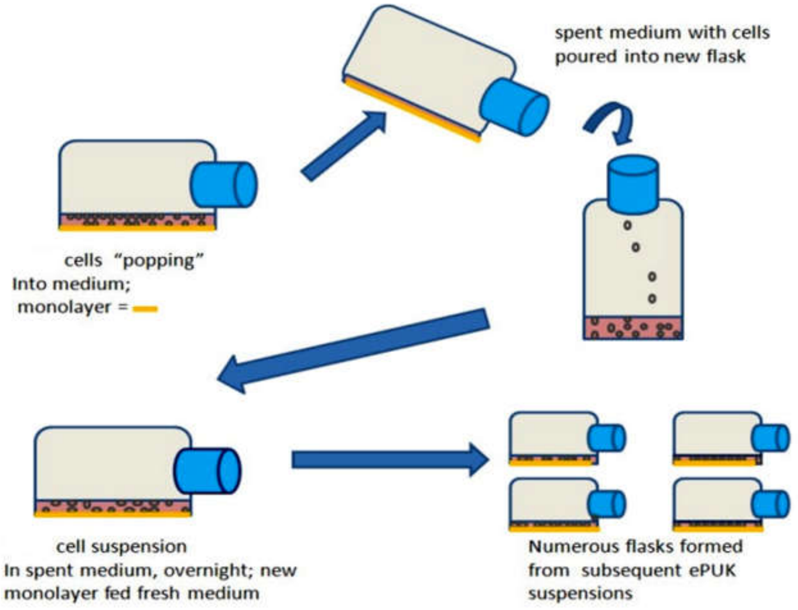
اصطلاحات رایج در کشت سلول

۱- کشت اولیه[۴]

کشت اولیه از بافت‌های قطعه‌قطعه شده یا از تکه‌های اعضاء به دست می‌آید. کشت تا موقعی که پاساژ داده نشود، کشت اولیه است. بعد از آن تحت عنوان رده سلولی نامیده می‌شود. پس از جداسازی بافت، ممکن است با مهاجرت سلول‌ها از قطعات بافت متصل به بستر مناسب یا با تفکیک مکانیکی و آنزیمی بافت برای تولید یک سوسپانسیون سلولی، یک کشت اولیه به وجود آید که در نهایت تعدادی از سلول‌ها به بستر خواهند چسبید. به نظر می‌رسد اکثر سلول‌های تغییر نیافته و طبیعی به استثناء سلول‌های خون‌ساز، لازم است به یک سطح صاف چسبیده تا با حداکثر راندمان زنده مانده و تکثیر یابند. از سوی دیگر سلول‌های تغییر یافته، مخصوصا سلول‌های تومورهای جانوری قابل کشت، قادر به تکثیر به حالت معلق در محیط کشت می‌باشند.

۲- پاساژ (واکشت سلولی)

انتقال سلول‌ها از یک محیط کهنه به یک محیط جدید، در نتیجه تهیه جمعیت‌های سلولی برای مطالعه است. اولین محصول بعد از کار با کشت اولیه، ساب کالچر (تحت کشت)[۵] نامیده می‌شود. اصطلاح کشت ثالث به ندرت استفاده می‌گردد. زمانیکه جمعیت سلول‌های ظرف کشت به حداکثر خود می‌رسند، عمل پاساژ سلولی انجام می‌گردد (تصویر ۱-۲-۱). همانطور که کاملا قابل پیش‌بینی است، هنگامیکه جمعیت سلول‌های ظرف کشت به حداکثر خود رسیدند، سلول‌ها به تدریج به سمت پیری رفته و پس از مدتی دچار آپوپتوز می‌شوند. این اتفاق به خاطر افزایش تدریجی متابولیت‌های سمی و اتمام مواد غذایی موجود در محیط کشت انجام می‌شود. مواد حاصله از سلول‌های مرده باعث تاثیر بر بقیه سلول‌ها و حتی مرگ آن‌ها خواهد شد. بنابراین برای داشتن سلول‌های سرزنده (که لازمه هر پژوهش و تحقیق مرتبط با کار کشت سلول است)، لازم است همواره تراکم‌های مناسبی از سلول‌های مورد نظر در ظرف کشت وجود داشته باشد.



تصویر ۱-۲-۱. پاساژ کشت‌های تک لایه‌ای[۶]. مراحل مختلف در چرخه‌های رشد و پاساژ سلول‌های تک‌لایه‌ای پس از اینکه سلول‌ها کاملا سطح فلاسک را پر نمودند، دیده می‌شود.

۳- رده سلولی[۷]

---

۱. Primary culture
۵. Sub Culture
۶. Monolayer Cells
۷. Cell Line

یک رده سلولی جمعیت سلولی است که از یک کشت اولیه بعد از اولین ساب کالچرینگ (تحت کشت)[۸] به دست می‌آید. در واقع یک رده سلولی چرخه‌ای تکراری از رشد، تریپسینیزاسیون (جداسازی سلول‌های متصل به ظرف کشت) و ساب کالچرینگ است. برای برخی از سلول‌ها این چرخه به طور مداوم قابل تکرار می‌باشد، در حالیکه برای برخی از سلول‌ها این ظرفیت محدودتر خواهد بود. در واقع به محض اینکه یک کشت اولیه پاساژ (واکشت) داده شود، آن کشت به عنوان یک رده سلولی شناخته می‌شود. این واژه دلالت بر حضور چندین دودمان سلولی با فنوتیپ‌های مشابه یا متفاوت دارد.

۴- گونه سلولی[۹]

این اصطلاح برای توصیف جمعیت ساب کالچر شده‌ای استفاده می‌شود که براساس خصوصیت ویژه‌ای که آن گروه بروز می‌دهند، انتخاب می شوند. این خصوصیات شامل خصوصیات عملکردی یا نشانگرهای ویژه، است. در واقع اگر یک دودمان سلولی توسط کلونینگ، جداسازی فیزیکی سلولی و یا هر تکنیک دیگر انتخاب شود تا ویژگی‌های اختصاصی معینی را که در قسمت عمده سلول‌های موجود در کشت شناسایی شده را داشته باشد، آن رده سلولی به عنوان یک سویه یا رده سلولی شناخته می‌شود. اگر یک رده سلولی در شرایط آزمایشگاهی تغییر یافته و به رده سلولی پیوسته تبدیل شود، چنانکه کلون شده و تعیین هویت گردد، به عنوان سویه سلولی پیوسته شناخته می‌شود.

۵- کشت کلون[۱۰]

کشت کلونی یا انتخاب کلون تهیه جمعیت سلولی است که همگی از یک سلول واحد به وجود آمده باشند. باید در نظر داشت کشتی که به واسطه میتوز و به طور موفقیت‌آمیز از یک سلول تنها مشتق شده باشد، متشکل از سلول‌های یکسان خواهد بود. البته این حالت همیشه پایدار نخواهد بود و جمعیت‌های سلولی مشتق شده از کلون، درجاتی از ناهمگنی را بروز خواهند داد. بنابراین کشت کلونی به طور مطلق به هموژنی یا پایداری طولانی مدت خصوصیات جمعیت سلولی تاکید نمی‌کند.

۶- سلول نرمال

اگرچه ممکن است هرکسی بتواند خواص سلول‌های نرمال را توصیف کند ولی این موضوع تعاریف دقیقی را می‌طلبد. برای کشت‌های اولیه کلمه نرمال تاکید می‌کند که سلول‌ها از یک عضو یا بافت سالم و طبیعی مشتق شده‌اند، نه از یک تومور یا سایر ضایعات پاتولوژیک. برعکس اصطلاح نرمال، اصطلاح تغییر شکل یافته[۱۱] است. در تعریف این اصطلاح معمولا باید خواصی از رفتار سلول را در نظر گرفت که معمولا به وسیله یک دسته از سلول‌ها و نه سایر سلول‌ها، بیان می‌شود.

۷- دانسیته اشباع[۱۲]

دانسیته اشباع در یک کشت، تراکم جمعیت سلول‌ها (تعداد سلول بر سانتی‌متر مربع از سطح کشت) در نقطه‌ای است که این جمعیت منجر به توقف رشد وابسته به دانسیته شود. یعنی تراکم سلول‌ها در هر سانتی‌متر مربع فلاسک و محیط کشت، زمانیکه رشد سلول‌ها به حدی رسیده باشد که تراکم سلول‌ها مانع تکثیر و رشد سلول‌ها گردد. رده‌های سلولی تغییر یافته به طور معمول دانسیته اشباع بالاتری نسبت به سلول‌های طبیعی دارند، به این دلیل که رده‌های سلولی تغییر یافته دارای قدرت تکثیر بسیار بالاتری از سلول‌های طبیعی هستند. در جدول زیر رایج-ترین و پرکاربردترین اصطلاحات کشت سلولی، آورده شده است:

جدول ۱-۲-۱. اصطلاحات مورد استفاده در کشت سلول (P. Langdon S, ۲۰۰٤).

اصطلاح انگلیسی	اصطلاح فارسی	تعریف
Cell culture	کشت سلول	نگهداری سلول‌های جدا شده در محیط کشت
Tissue culture	کشت بافت	نگهداری نمونه‌های بافتی جدا شده، در کشت
Cell line	رده سلولی	کشتی که پس از اولین فاز کشت، واکشت (ساب کالچر) داده

۳. Sub-Culture
۱. Cell Strain
۲. Clonal Culture
۳. Transformated
٤. Saturation Density

		شده است
Finite cell line	رده سلولی محدود (فانی)	رده‌ای سلولی با عمر محدود که سرانجام پیری را تحمل می‌کند
Continuous cell line	رده سلولی مستمر	رده‌ای سلولی که در اصل نامیرا بوده و رشد آن به طور نامحدود ادامه دارد
Primary culture	کشت اولیه	کشتی اولیه که از بافت‌های زنده و تهیه شده از بدن موجودت زنده، حاصل شده است
Clone	کلون، کلنی	دودمان به وجود آمده از یک سلول منفرد
Immortalization	نامیرایی، جاودانه	توانا‌سازی سلول‌ها برای گسترش و افزایش عمرشان در کشت
Lag phase of growth	فاز لگ از رشد	فاز اولیه رشد زمانی‌که سلول‌ها واکشت داده می‌شوند
Log phase of growth	فاز لگاریتمی (نمایی) رشد	فازی از رشد که سلول‌ها بیشترین رشد را داشته و رشد نمایی را نشان می‌دهند
Plateau phase of growth	فاز مسطح از رشد	فازی که در آن سلول‌ها کل سطح کشت را پر می‌نمایند
Population doubling time	زمان دو برابر شدن جمعیت	زمانی‌که تعداد سلول‌ها در آن دو برابر می‌شوند
Cell banks	بانک‌های سلولی	مخازن و انبار رده‌های سلولی و مواد مورد نیاز مرتبط با آن
Substrate	لایه زیرین، سوبسترا	ماتریکسی که در آن کشت رشد داده می‌شود
Passage	پاساژ	واکشت (ساب کالچر) سلول‌ها از یک ظرف به چند ظرف دیگر
Confluent	تلاقی	موقعیتی که در آن سلول‌ها به طور کامل سوبسترا را می‌پوشانند

اصطلاحات مرتبط با زیست‌شناسی سلول‌ها در کشت

۱- منشاء و ویژگی‌ها

انواع سلول‌هایی که می‌توانند در محیط کشت رشد یابند فراوان است که همگی از تکثیر انواع اصلی سلول‌ها به وجود آمده‌اند. استفاده از مارکرهای ویژه هر سلول، امکان این رافراهم می‌کند که بتوانیم نوع سلول مبدا را که رده سلولی از آن مشتق شده است، تشخیص دهیم. در طول تکثیر، یک نوع سلول پیش‌ساز نسبت به یک سلول تمایز یافته تمایل بیشتری به غالب شدن دارد. در نتیجه یک رده سلولی ممکن است ناهمگن باشد، همانند کراتینوسیت اپیدرمی که شامل سلول‌های بنیادی، سلول‌های پیش‌ساز و سلول‌های تمایزیافته بالغ می‌باشد. کشت‌های دیگری مثل فیبروبلاست‌های درمی شامل جمعیتی از سلول‌هایی با ظرفیت کم تکثیر (۱۰^۴^سلول در سانتی‌متر مربع)، سلول‌هایی با قدرت تمایز بالا و جمعیتی از سلول‌های تکثیر نشونده با ظرفیت تکثیر بالا (۱۰^۵^ سلول در سانتی‌متر مربع) می‌باشد. چنین جمعیت‌هایی اگر ترییپسینه گردند، می‌توانند تکثیر شده و چرخه سلولی را دوباره از سر بگیرند. فاکتورهای تغذیه‌ای همانند سرم، یون‌های کلسیم، هورمون‌ها، واکنش‌های متقابل بین سلول‌ها و ماتریکس و ظرفیت کشت می‌توانند بر تکثیر و تمایز سلول‌ها اثر بگذارند. کنترل خواص پویای کشت سلول (تکثیر، مهاجرت، استفاده از مواد غذایی و ترشح محصول) گاهی اوقات دشوار می‌باشد. از آنجایی که سلول‌های موجود در کشت رفته دارای ویژگی‌های متفاوتی نسبت به سلول مرجع می‌شوند و تغییراتی را متحمل می‌گردند، تلاش‌های فراوانی صورت گرفته است تا بتوان خواص سلول‌های کشت شده را طوری در محیط کشت حفظ کرد که نسبت به سلول اصلی هیچ تغییری از خود نشان ندهند.

۲-تمایز

تکثیر رده سلولی نیاز به این دارد که تعداد سلول‌ها در محیط کشت با بهبود شرایط رشد آن‌ها افزایش یابد. وجود شرایطی همانند کاهش غلظت کلسیم، حضور فاکتورهای رشد، حضور عامل‌های القاء کننده تمایز، هورمون‌هایی همچون هیدروکورتیزون، فاکتورهای پاراکرین همانند IL-٦ و KGF باعث تکثیر و تمایز سلولی می‌شوند. نقش سرم در تمایز پیچیده بوده و وابسته به نوع سلول و محیط کشت آن می‌باشد. درحالیکه غلظت کمی از سرم باعث تمایز در الیگودندروسیت‌ها می‌گردد. غلظت بالایی از سرم باعث تمایز در سلول‌های مکعبی موجود در اپی-

تلیوم برونش‌ها می‌شود. به دلیل ترکیبات ناشناخته موجود در سرم و خطر عوامل اکتسابی موجود در آن همانند ویروس‌ها، مطالعات کنترل شده بر رشد، تکثیر و تمایز انتخابی سلول‌ها بهتر است محیط‌های کشت عاری از سرم استفاده گردد. قطبیت و شکل سلول نیز برای تمایز سلول‌ها به ویژه در اپی‌تلیوم موثر است. شرایط متفاوتی ممکن است برای تکثیر و تمایز سلول‌ها تاثیرگذار باشد. از اینرو یک روش تجربی نیاز است تا در یک فاز رشد به سلول‌ها اجازه رشد داده شود. در ادامه به سلول‌ها اجازه داده می‌شود که به سمت تمایز پیش روند.

اصطلاحات مرتبط با انتخاب مواد

۱- نوع سلول

برای برخی موارد همانند سنتز DNA، پاسخ به سایتوتوکسین‌ها یا آپوپتوز ممکن است نوع سلول مهم باشد. در بقیه موارد یک فرایند خاص ممکن است به نوع خاصی از سلول نیاز داشته باشد، برای مثال برای ساخت سورفاکتانت به پنوموسیت نوع دو تازه جدا شده از ریه و یا رده سلولی آن، همانند NCI-H۴۴۱ نیاز است که پروتئین‌های سورفاکتانت را بیان و ترجمه کند.

۲- منبع بافت

جنینی یا بالغ: در حالت کلی کشت‌های مشتق شده از بافت‌های جنینی بهتر از شکل بالغ آن‌ها زنده مانده و تکثیر پیدا می‌کنند. بنابراین در سلول‌های جنینی پتانسیل تکثیر بالایی وجود دارد. بافت‌های بالغ معمولا رشد کمتری داشته و درصد بالایی سلول‌های تخصصی دارند که تکثیر نمی‌شوند. شروع تکثیر و افزایش آن سخت‌تر بوده و عمر کشت اغلب کوتاه‌تر است.

بافت جنینی یا رویانی موارد کاربرد بالایی دارد، اما باید به خاطر داشت که در برخی موارد این سلول‌ها از سلول‌های بالغ متفاوت خواهند بود و نمی‌توان تصور کرد که آن‌ها در صورت تمایز حتما به سلول‌های بالغ نوع خودشان با ویژگی‌های مناسب تبدیل خواهند شد. مثال‌هایی از رده-های سلولی جنینی استفاده شده می‌تواند رده ۳T۳ (سلول‌های مزودرمی پیش‌ساز موش)، WI-۳۸، MRC و فیبروبلاست‌های جنینی ریه انسان باشد. کشت سلول‌های مشتق شده از مزودرم (فیبروبلاست، اندوتلیوم و میوبلاست‌ها) راحت‌تر از اپیتلیوم، نورون‌ها یا بافت‌های درون‌ریز است. محیط کشت انتخابی و ویژه امروزه برای انواع سلول‌ها وجود دارد که در آن‌ها ممکن است وجود سرم باعث رشد و یا القاء تمایز گردد. کشت اولیه از بافت‌های اپیتلیالی همانند پوست، ریه و غدد پستانی نیز امروزه به طور معمول در آزمایشگاه‌ها به کار می‌روند.

طبیعی یا نئوپلاستیک: بافت‌های طبیعی معمولا کشت‌هایی با عمر کوتاه را تشکیل می‌دهند در حالیکه کشت‌های حاصل از تومورها می-توانند به طور پیوسته تکثیر یافته و رده‌های سلولی را تشکیل دهند. البته چندین مثال از این نوع سلول‌ها وجود دارند (سلول‌های اپیتلیالی کلیه سگ، سلول‌های ۳T۳ و فیبروبلاست‌های کلیه همستر BHK-۲۱) که از بافت‌های طبیعی و غیر توموری تشکیل شده‌اند. سلول‌های طبیعی به طور کلی به عنوان سلول‌های بنیادی تمایز نیافته یا سلول‌های پیش‌ساز هستند. برخی سلول‌های طبیعی همانند فیبروبلاست‌ها یا اندوتلیوم، توانا هستند که تمایز یافته و دوباره به حالت غیر متمایز درآمده و قدرت تکثیر پیدا کنند، در حالیکه بقیه مانند سلول‌های اپیتلیالی مکعبی، ماهیچه اسکلتی و نورون‌ها، اگر تمایز یابند دیگر قادر به تکثیر نخواهند بود.

سلول‌های مشتق شده از تومورها با اینکه می‌توانند تا حدی تمایز یابند، ظرفیت تقسیم و تکثیر خود را نیز حفظ می‌کنند. تکثیر سلول‌های توموری اغلب در محیط کشت به روش‌های ساده و ارزانی نیاز دارد. تومورها همچنین در جانورانی که دارای سیستم ایمنی ضعیفی می‌باشند، ایجاد می‌گردد.

خصوصیات سلول‌های طبیعی و تغییر شکل یافته

۱- وابستگی به بستر[۱۳]

سلول‌های وابسته به بستر برای بقاء تکثیر یا بیان عملکرد تمایز یافته خود احتیاج به سطح یا بستری برای چسبیدن دارند. به طور معمول، وابستگی به بستر به معنی احتیاج به بستر برای چسبیدن جهت فراهم کردن شرایط تکثیر می‌باشد. اغلب سلول‌های نرمال جهت تکثیرشان باید به یک بستر متصل شوند. نقطه مقابل وابستگی به بستر، تکثیر در سوسپانسیون مایع یا درون یک محیط نیمه جامد یا ماتریکس سه بعدی نظیر محیط جامد آگار، می‌باشد.

---

۱. Anchorage Dependence

تعدادی از رده‌های سلولی تغییر شکل یافته می‌توانند کلنی‌هایی را در آگار نرم ایجاد کنند و این توانایی همراه با توقف رشد به واسطه دانسیته است. وابستگی به بستر به تنهایی به این معنا نیست که سلول رشد کننده روی بستر، طبیعی است چون بعضی از سلول‌های تغییر شکل یافته نیز روی بستر سخت، به خوبی رشد می‌کنند. تمامی سلول‌های پستانداران به جز سلول‌هایی که از خون و مایع لنفی جدا می‌شوند وابسته به بستر هستند و احتیاج به بستری برای چسبندگی و رشد خود دارند. این خصوصیت، صفت ویژه‌ای است که به طور واضح سلول‌های حیوانی را از باکتری‌ها متمایز می‌کند. شایع‌ترین انواع سلول‌های وابسته به بستر که برای کشت سلول جانوری به کار می‌روند عبارتند از سلول‌های اپی تلیال و سلول‌های فیبروبلاست که در زیر میکروسکوپ نمایی همانند سنگفرش خیابان[۱۴] دارند.

۲- کشت مونولایر[۱۵]

اصطلاح کشت مونولایر، مربوط به پخش سلول‌ها به صورت یک لایه تک سلولی بر روی بستری نظیر شیشه یا پلاستیک می‌باشد. توانایی سلول‌ها برای رشد به صورت مونولایر الزاماً به معنی آن نیست که آن‌ها وابسته به بستر هستند.

۳- توقف رشد وابسته به دانسیته[۱۶]

اغلب سلول‌های طبیعی بعد از چند بار تقسیم، کاهش رشد واضحی را نشان می‌دهند که در ارتباط با تراکم سلول‌ها می‌باشد. این امر به خاطر اشغال همه سطوح اتصال قابل دسترسی است. در اغلب موارد این پدیده به دلیل تاثیر دانسیته و تماس سلول به سلول می‌باشد. توقف تکثیر وابسته به دانسیته ممکن است قبل از اینکه انبوه سلول‌ها به وجود آید، ایجاد شود. در این صورت این کاهش رشد منعکس کننده کاهش منبع غذا و آزاد شدن فاکتورهای مشتق از سلول از جمله محصولات زائد در محیط است.

۴- پیری سلولی در شرایط آزمایشگاهی[۱۷]

رده‌های سلولی نرمال عموماً طول عمر محدودی دارند یعنی بعد از تعداد محدودی تکثیر، دیگر رشد نمی‌کنند. برای مثال عمر فیبروبلاست‌های دیپلوئید طبیعی در حدود ۵۰ تا ۷۰ تقسیم است. نشان داده شده که عمل پیری سلول در کشت شامل تغییر پیشرونده در تعدادی از خصوصیات سلول می‌باشد (جدول ۲-۲-۱).

جدول ۲-۲-۱. تغییرات حاصل در سلول‌ها به دلیل پیری.

تغییرات ایجاد شده در سلول‌های فیبروبلاست طبیعی به هنگام پیر شدن
۱- افزایش زمان تقسیم سلولی
۲- کاهش تعداد سلول‌هایی که در حال تقسیم سلولی هستند (کاهش نسبت رشد)
۳- کاهش دانسیته اشباع
۴- افزایش شیوع پلی‌پلوئیدی
۵- کاهش اتصال به بستر
۶- تغییر گلیکوپروتئین‌ها و پروتئوگلیکان‌های سطحی
۷- تغییر فرم اسکلت سلولی
۸- کاهش سنتز DNA
۹- کاهش میزان سنتز و تجزیه و تبدیل پروتئین
۱۰- کاهش انتقال آمینواسیدها
۱۱- کاهش پاسخ به فاکتورهای رشد

۵- کشت سلول‌های متصل شده به بستر[۱۸]

۲. Cobble Stone Appearance
۳. Monolayer Culture
۱. Density Dependent Inhibition of Growth
۱۷. In vitro Cell Senescence
۳. The Culture of Attached cells

کشت سلولی در معمول‌ترین حالتش شامل رشد سلول‌ها بر روی یک بستر سخت (معمولا پلاستیکی)، در وضعیت ثابت انکوباسیون می‌باشد. معمولا سلول‌ها درون یک محیط مایع به داخل فلاسک یا دیش تلقیح می‌شوند. سپس متصل شده و تکثیر می‌یابند و به دنبال استفاده مختصر از تریپسین/ EDTA و آزاد ساختن آن‌ها از سطحی که به آن متصل شده‌اند، می‌توانند کشت شوند.

۶- بسترهای مرسوم کشت[۱۹]

سلول‌های وابسته به بستر احتیاج به یک سطح فیزیکی برای اتصال و رشد دارند. شیشه‌ها، پلاستیک و انواع مختلفی از غشاءهای فیلتری موادی هستند که عموما به عنوان بسترهای کشت استفاده می‌شوند. ظروف پلاستیکی اولین بار در سال ۱۹۶۰ به دنبال توسعه روش‌هایی که سطوح پلاستیکی را در جهت بهبود بخشیدن به اتصال سلول تغییر می‌دهد به کار گرفته شد. پلی‌استیرن معمول‌ترین پلاستیک مورد استفاده برای کشت سلول است و این موضوع بیشتر به خاطر شفافیت نوری عالی آن می‌باشد. پلی‌استیرن تغییر داده نشده، بیشتر هیدروفوبیک است. انواع زیادی از سلول‌ها به هیچ وجه به پلاستیک پروسه نشده متصل نمی‌شوند و آن‌هایی که متصل می‌شوند به خوبی پخش نمی‌گردند.
نشان داده شده است که شکل سلول، تقسیم سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و دیگر اینکه سطوح اتصال که به پخش سلول کمک می‌کند باعث تکثیر سلولی می‌شوند. به کمک این تکنیک فقط سطح رشد آماده سازی می‌شود و سپس ظروف جمع بندی، بسته‌بندی و به وسیله اشعه گاما استریل می‌شوند. در هنگام کار با ظروف پلی استیرن باید حساسیت آن به حلال‌های آلی را مدنظر داشت. این موضوع در هنگام استفاده از این مواد برای آنالیزهای مورفولوژی یا استخراج محتویات سلول باید مدنظر گرفته شود.

۷- کشت سلول‌ها در سوسپانسیون[۲۰]

الف) بسترهای غیر چسبنده برای کشت‌ها در حجم کم[۲۱]: برای بعضی از کاربردها نظیر تشکیل تجمع‌های چند سلولی[۲۲] و اسفروئیدهای سلول تومور، چسبیدن سلول به بستر مطلوب نیست. در این موارد از یک سطح هیدروفوبیک استفاده می‌شود. با این وجود بعضی از سلول‌ها به این ظروف می‌چسبند، چسبیدن سلول را می‌توان به وسیله انکوبه کردن ظروف کشت بر روی یک شیکر، از بین برد.
ب)کشت انبوه سلول‌ها در سوسپانسیون مایع[۲۳]: تعدادی از سلول‌های غیر میرا برای ادامه رشد نیاز به بستر ندارند، این سلول‌هاوابسته به بستر نبوده و در سوسپانسیون مایع رشد خواهند کرد. برای کارهایی با حجم زیاد باید سلول‌ها در فلاسک‌های اسپینر[۲۴] یا بیوراکتورها کشت شوند که در آن محیط به طور مداوم وارد می‌شود و به وسیله هم زدن و تکان دادن مداوم محیط یکدست شده و جلوی رسوب سلول‌ها گرفته می‌شود. تنظیم و کنترل محیط در کشت سوسپانسیون مشکلات تکنیکی خاصی را به همراه دارد. برای مثال، سلول‌ها در سوسپانسیون تجمع-های چند سلولی را به وجود می‌آورند. این امر به این خاطر مشکل ایجاد می‌کند که سلول‌های تجمع یافته رسوب کرده و به احتمال زیاد رو به زوال می‌روند. همچنین تجمع‌های سلولی سیستم کشت را ناهمگن کرده و به طور نامطلوبی عملکرد سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهند. به این منظور محیط‌هایی که برای کشت سوسپانسیون استفاده می‌شوند، اغلب مقادیر کمتری کلسیم دارند تا از چسبیدن سلول به سلول ممانعت کنند و همچنین ممکن است حاوی عوامل محافظ سلول نظیر متیل سلولز یا عواملی برای کاهش کف و رسوب سرم باشند.

رفتار رشد سلول در شرایط آزمایشگاهی[۲۵]

در طی تثبیت یک کشت اولیه و یا درساب کالچر، یک گروه از سلول‌ها ممکن است دچار استرس قابل توجهی شوند. برای مثال می‌توان از تجزیه آنزیمی قطعات بافتی و شکستن سلول وابسته به بستر و برهمکنش‌های سلول با سلول و بستر با سلول نام برد. سلول‌های جدا شده معمولاً شکلشان تغییر می‌کند و گرد می‌شوند، قطبیت فنوتیپی را از دست می‌دهند و تغییراتی را در توزیع پروتئین‌های غشاء پلاسمایی نشان می‌دهند. همه سلول‌ها دستکاری‌های کشت را تحمل نمی‌کنند و آن‌هایی هم که تحمل می‌کنند ممکن است درجاتی از آسیب‌های فیزیکی، تغییر در سطح سلول را داشته باشند. یک سلول برای زنده ماندن و از سرگیری رشد یا برای بیان عملکرد تمایزی، باید قادر به ترمیم و تغییر و

---

۱. Current Substrates
۲. The Culture of Cells in Suspension
۳. Non Adherent Substrates for Small Scale Cultures
٤. Histotypic
٥. Mass Culture of Cell in Fluid Suspension
۲٤. Spinner
۲٥. *In Vitro* Cell Growth Behaviour

مرمت آسیب‌های وارد شده به خود باشد و خودش را با تغییرات محیط منطبق سازد. انطباق با کشت زمان برده و تحت تاثیر شرایط کشت قرار می‌گیرد. ثابت شده است که سلول‌ها محیط خود را به وسیله ترشح موادی ناشناخته برای رشد و اتصال به بستر مساعد می‌کنند.

اگر محیط به وسیله تماس با سلول‌هایی که به طور فعال رشد می‌کنند مساعد شود، بعضی از رده‌های سلولی ممکن است سریع‌تر منطبق شده و سریع‌تر رشد نمایند و یا سریع‌تر و کامل‌تر تمایز یابند. زمانیکه محیط‌های مساعد شده استفاده می‌شوند، معمولا محیط به وسیله فیلتر استریل شده و یا سلول‌های شناور آن جدا شده و سپس به صورت منجمد نگهداری می‌شوند. روش دیگر مساعد ساختن محیط کشت، کاشت یا تلقیح سلول‌ها در ظرف‌هایی است که اغلب حاوی سلول‌های زنده که قدرت تکثیر ندارند، می‌باشد. این سلول‌ها که لایه مغذی[۲۶] نامیده می شوند معمولا از فیبروبلاست‌های جنینی نظیر رده ۳T۳ که تحت اشعه گاما و یا تحت تاثیر میتومایسین C قرار گرفته‌اند تهیه می‌شوند. باید در نظر داشت که بعضی از رده‌های سلولی به دنبال اتصال به بستر برای تثبیت عملکرد تمایزی خود، احتیاج به زمان دارند.

فازهای رشد سلول[۲۷]

سلول‌های طبیعی در کشت به طور تیپیک یک الگوی سیگموئیدی را در تکثیر خود به نمایش می‌گذارند که منعکس کننده انطباق با کشت، مساعد بودن محیط اطراف سلول و در دسترس بودن بستر فیزیکی و منبع غذایی کافی و لازم برای حمایت از تولید سلول‌های جدید است.

۱- فاز تاخیری[۲۸]

به دنبال وارد کردن سلول‌ها به محیط کشت جدید، سلول‌ها یک فاز تاخیری را در رشد نشان می‌دهند که در طی آن تقسیمی صورت نمی-گیرد. طول فاز تاخیری حداقل وابسته به دو فاکتور است که شامل فاز رشد سلول‌ها در هنگام ساب کالچر و تعداد سلول‌های تلقیح شده می-باشد. کشت‌هایی که با تعداد کم سلول انجام می‌شوند فاز تاخیری طولانی‌تری داشته ومحیط را دیرتر برای رشد خود مساعد می‌کنند. اگر از سلول‌هایی که به طور فعال در حال تقسیم می‌باشند ساب کالچر تهیه شود، فاز تاخیری کوتاه‌تری مشاهده می‌گردد (تصویر ۲-۲-۱).

۲- فاز رشد لگاریتمی[۲۹]

این فاز یک دوره تکثیر فعال است که در طی آن تعداد سلول‌ها به صورت لگاریتمی افزایش می‌یابد. در فاز لگاریتمی ممکن است درصد سلول-های در حال تقسیم ۹۰ تا ۱۰۰ درصد باشد و در یک زمان معین سلول‌ها به طور تصادفی در وضعیت‌های مختلف تقسیم سلولی دیده شوند. به عنوان یک قانون کلی در طی فاز لگاریتمی سلول‌ها عموما در سالم‌ترین وضعیتشان در نظر گرفته می‌شوند و بنابراین طبیعی است که هنگام مطالعه در مورد عملکرد سلول از سلول‌های فاز لگاریتمی استفاده شود. کینتیک[۳۰] تکثیر سلول در طی فاز لگاریتمی جزء خصوصیات رده‌های سلولی است و در این فاز است که زمان دو برابر شدن تعیین می‌شود. فاکتورهایی که طول فاز لگاریتمی را تحت تاثیر قرارمی‌دهند شامل تراکم سلول‌های تلقیح شده، میزان رشد سلول و دانسیته اشباع رده سلولی، می‌باشند (تصویر ۲-۲-۱).

---

۲۶. Feeder Layers
۱. Cell Growth Phases
۲. Lag Phase
۳. Logarithmic Growth Phase
۳۰. Kinetic