

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

دعای مطالعه

اَللّٰهُمَّ اَخْرِجْنِيْ مِنْ ظُلُمَاتِ الْوَهْمِ وَاكْرِمْ نِيْ بِنُوْرِ الْفَهْمِ
اَللّٰهُمَّ افْتَحْ عَلَيْنَا اَبْوَابَ رَحْمَتِكَ وَاَنْشُرْ عَلَيْنَا خَزَائِنَ عُلُوْمِكَ
بِرَحْمَتِكَ يَا اَرْحَمَ الرَّاحِمِيْنَ

پروردگارا، خارج کن مرا از تاریکی های فکر و گرامی بدار به نور فهم
پروردگارا، بکشای بر مادرهای رحمت را و بکستران کنج های دانشت را به امید رحمت
تو ای مهربان ترین مهربانان

بیایید به حقوق دیگران احترام بگذاریم

دوست عزیز، این کتاب حاصل دسترنج چندین ساله ی مؤلف، مترجم و ناشر آن است. تکثیر و فروش آن به هر شکلی بدون اجازه از پدیدآورنده کاری غیراخلاقی، غیرقانونی، غیرشرعی و کسب درآمد از دسترنج دیگران است، نتیجه ی این عمل نادرست، موجب رواج بی اعتمادی در جامعه و بروز پی آمدهای ناگوار در زندگی و محیط ناسالم برای خود و فرزندانمان می گردد.

اصول و مبانی کشت سلول

مولفین

(به ترتیب حروف الفبا):

نسترن انصاری نقلبری

«کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران»

کتایون بهمن صوفیانی

«استادیار ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز»

فتانه توسلیان

«دکتری ایمنی‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران»

اردشیر عباسی

«دکتری ایمنی‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران»

مریم فرقدان

«دکتری ایمنی‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران»

ستاره کریمی

«کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران»

افروز همایون‌فر

«کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران»

ویراستار علمی: مریم فرقدان

«دکتری ایمنی‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران»



□ IQ3

□ **الگویتیم**
میانبر

□ IQ3

□ **پرس**

□ **کتابی جامع**
دکتر خایلی

عنوان و نام پدیدآور	اصول و مبانی کشت سلول / مولفین (به ترتیب حروف الفبا) نسترن انصاری نقلابری ... [و دیگران]
مشخصات نشر	تهران: گروه تألیفی دکتر خلیلی، ۱۴۰۱.
مشخصات ظاهری	۱۱۹ ص. : مصور، جدول، نمودار.
شابک	978-600-422-670-7
وضعیت فهرست نویسی	فیبا :
یادداشت	مولفین (به ترتیب حروف الفبا) نسترن انصاری نقلابری، کتایون بهمن صوفیانی، فتانه توسلیان، اردشیر عباسی، مریم فرقدان، ستاره کریمی، افروز همایون فر.
موضوع	: یاخته ها -- کشت
موضوع	Cell culture :
موضوع	: یاخته ها کشت -- دستنامه های آزمایشگاهی
موضوع	Cell culture -- Laboratory manuals :
شناسه افزوده	: انصاری نقلابری، نسترن، ۱۳۷۲-
رده بندی کنگره	QH۵۸۵/۲ :
رده بندی دیویی	۵۷۱/۶۳۸ :
شماره کتابشناسی	۸۵۵۴۵۴۶ :

نام کتاب: اصول و مبانی کشت سلول

مولفین: نسترن انصاری نقلابری، کتایون بهمن صوفیانی، فتانه توسلیان،

اردشیر عباسی، مریم فرقدان، ستاره کریمی، افروز همایون فر

ناشر: گروه تألیفی دکتر خلیلی

نوبت و سال چاپ: اول . ۱۴۰۱

شمارگان: ۱۰۰۰

چاپ و صحافی: شباب

مدیر تولید: اقبال شرقی

مدیر فنی و هنری: مریم آرده

تایپ و صفحه آرایی: بیتا اندوژفر

بهاء: ۷۰۰۰۰ تومان

آموزشگاه دکتر خلیلی: ۰۲۱۶۶۵۶۸۶۲۱

مرکز پخش: ضلع جنوب غربی میدان انقلاب . جنب سینما پارس . مجتمع تجاری پارس . طبقه اول

مرکز فروش: ۰۲۱۶۶۵۶۹۲۱۶

مدیر فروش: ۰۹۱۲۵۵۰۸۵۸۹



@drkhaliligroupbook



www.DKG.ir



drkhaliligroupbook

به نام خداوند جان و خرد

شکر و سپاس فراوان خدای را که توفیق عنایت فرمود تا در حد بضاعت خویش قدمی ناچیز در عرصه وسیع علم برداریم.

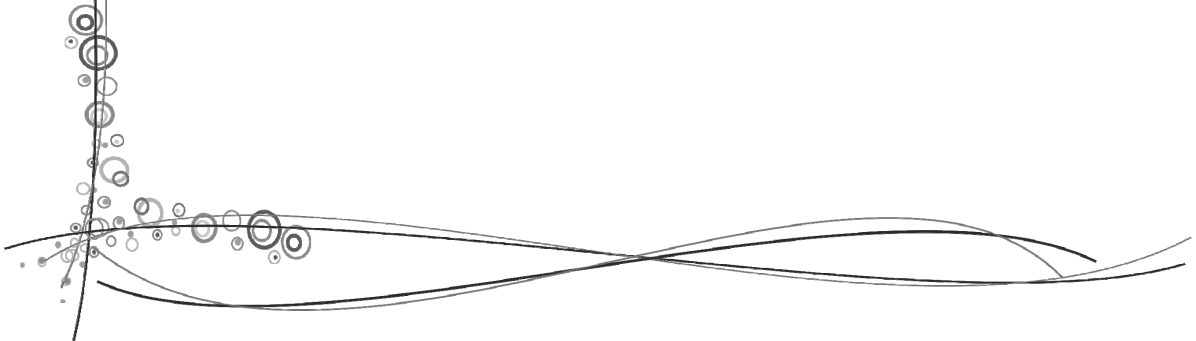
مطالب کتاب با زبانی ساده و گویا و با پرهیز از پرداختن به توضیحات اضافی تألیف شده است تا ضمن فهم بهتر مطالب، جنبه کاملاً کاربردی پیدا کند.

هدف از گردآوری این مجموعه کمک به رفع نیازهای علمی دانشجویان و علاقه‌مندان رشته‌های علوم پایه پزشکی می‌باشد و امید است این مجموعه بتواند راه‌گشایی هر چند ناچیز در عرصه علم و دانش و راهنمایی مفید برای دانشجویان و علاقه‌مندان باشد.

شایسته است از استادان محترم و صاحب‌نظران این عرصه و همچنین سایر عزیزانی که همواره مشوق و راهنمای ما بودند، سپاس و قدردانی به عمل آوریم.

با تشکر

گروه مولفین



فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۹	فصل اول: اصول کشت سلول
۹	مقدمه و تاریخچه کشت سلول
۱۱	کاربردهای کشت سلول
۱۲	زیست‌شناسی سلول‌ها در محیط کشت
۱۳	مرگ سلولی
۱۶	فصل دوم: تجهیزات و وسایل کشت سلول
۱۶	تجهیزات و وسایل مورد نیاز در کشت سلول
۳۳	وسایل مصرفی مورد نیاز در کشت سلول
۴۱	فصل سوم: مواد مورد نیاز برای کشت سلول
۴۱	مقدمه
۴۱	محیط کشت سلول
۴۴	سرم
۴۷	آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدقارچ‌ها
۴۹	انواع محیط کشت سلول
۵۰	عوامل فیزیکی و شیمیایی تأثیرگذار در رشد و زنده‌مانی سلول‌ها در کشت سلول
۵۵	محلول‌های نمکی متعادل
۵۶	فصل چهارم: روش‌های جداسازی، کشت و نگهداری سلول‌ها
۵۶	خصوصیات مورفولوژیک سلول‌ها در کشت
۵۸	تعویض محیط کشت
۵۸	روش‌های جداسازی سلول
۶۰	شمارش و تعیین زنده‌مانی سلول‌ها

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۶۲	پاساژ یا کشت مجدد سلول
۷۱	تهیه منحنی رشد سلولی
۷۲	انجماد یا فریز سلول ها در آزمایشگاه
۷۶	ذوب یا دفریز سلول های منجمد
۷۸	فصل پنجم: انواع کشت سلول و بافت
۷۸	مقدمه
۷۹	کشت سلول اولیه
۸۰	کشت سلول پیوسته
۸۱	روش های جداسازی سلول از بافت برای کشت اولیه
۸۳	منابع بافتی کشت سلول
۸۳	کشت اولیه ی سلول ها از بافت توموری
۸۵	کشت رده های سلولی توموری
۸۷	سلول های بنیادی
۸۹	روش کشت سلول های بنیادی
۹۹	فصل ششم: آلودگی در کشت سلول
۹۹	مقدمه
۹۹	راه های انتقال آلودگی در کشت سلول و اقدامات اولیه برای پیشگیری از آنها
۱۰۱	انواع آلودگی در کشت سلول
۱۱۱	در صورت بروز آلودگی چه باید کرد؟

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۱۱۳.....	فصل هفتم: دستورالعمل آزمایشگاه کشت سلول
۱۱۳.....	مقدمه
۱۱۳.....	طراحی آزمایشگاه کشت سلول
۱۱۴.....	مدیریت آزمایشگاه کشت سلول
۱۱۵.....	اصول بهداشت فردی
۱۱۵.....	اصول صحیح کار کردن زیر هود بیولوژیک
۱۱۶.....	اصول کلی کار با کشت‌های سلول
۱۱۸.....	انتقال مایعات استریل
۱۱۸.....	دفع پسماندها

اصول کشت سلول

مقدمه و تاریخچه کشت سلول

به طور کلی کشت سلول فرآیندی است که سلول‌ها تحت شرایط کنترل شده، خارج از محیط طبیعی خود رشد می‌کنند. سلول‌ها پس از جدا شدن از بافت موجود زنده قادرند در شرایط کاملاً کنترل شده و مشابه بدن موجودی که از آن منشأ گرفته‌اند، کشت داده شده و رشد نمایند. برای کشت هر سلولی، شرایطی لازم است که این شرایط برحسب نوع سلول متفاوت است. اکثر سلول‌ها برای رشد به سطح یا بستر مصنوعی نیاز دارند (کشت چسبنده)، در حالی که سایر سلول‌ها می‌توانند به صورت آزادانه و شناور در محیط کشت (کشت معلق) رشد کنند. در شرایط کشت، طول عمر اکثر سلول‌ها از نظر ژنتیکی تعیین شده و مشخص است. اما برخی از سلول‌ها با روش‌های دست‌کاری ژنتیکی به سلول‌های نامیرا تبدیل شده‌اند که در صورت فراهم شدن شرایط بهینه، به طور نامحدود تکثیر و ازدیاد می‌یابند.

کشت سلول تکنیکی است که به طور گسترده در مطالعات متابولیسم و فیزیولوژی سلول که ممکن است به راحتی در داخل بدن انجام‌پذیر نباشند، مورد استفاده قرار می‌گیرد و همچنین، به دلیل انطباق‌پذیری مطالعات و آزمایش‌هایی که در آن اعمال می‌شود، تغییرات عمده‌ای در تحقیقات طی دهه‌های اخیر ایجاد کرده است.

تاریخ این تکنیک به اواخر قرن نوزدهم برمی‌گردد، زمانی که ویلهلم روکس^۱ موفق به حفظ سلول‌های زنده عصبی جنین جوجه در پلیت حاوی بافر سالین برای چند روز شد. در سال ۱۸۸۷، لئو لوب^۲، با استفاده از تکنیکی تحت عنوان "کشت بافت در بدن" به کشت سلول‌ها از داخل و خارج بدن پرداخت.

1. Wilhelm Roux

2. Leo Loeb



وی قطعات پوست جنین خوکچه‌هندی را در آگار و سرم منعقدشده قرار داد، سپس به حیوانات بالغ تلقیح کرد و تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال میتوزی را به دست آورد. در سال ۱۹۰۷، هریسون بر چالش‌های اساسی کشت سلول غلبه کرد و تکنیک تکثیر را ایجاد کرد. در این تکنیک، قطعاتی از لوله عصبی جنین قورباغه را داخل قطره‌ای از لnf تازه در پوشش استریل کشت داد. بنابراین، با این آزمایش ساده، کشت سلول به‌عنوان ابزاری برای تحقیق و همچنین تحقق هدف اصلی آن، تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، واکسن‌ها و داروها آغاز شد. در سال ۱۹۱۰، مونتروز بروس^۱ روش قطره حلق‌آویز را برای کار با بافت‌های موجودات خونگرم جایگزین کرد که در آن از لخته پلاسمای مرغ به‌عنوان جایگزین لnf استفاده کرد. سپس به همراه الکسیس کارل^۲، بافت‌های جنینی و بالغ سگ، گربه، مرغ، موش صحرایی و خوکچه را با استفاده از پلاسمای تازه به دست آمده از همان منبعی که بافت رشد می‌کرد، کشت داد. در اواخر سال ۱۹۱۰، کارل و مونتروز بروس با موفقیت از محیط‌های پلاسمای مرغ، موش، سگ و انسان با استفاده از روش قطره آویز استفاده کردند. کارل، سایر محیط‌های کشت از جمله پلاسمای رقیق شده با غلظت‌های مختلف محلول نمکی و نیز سرم را به کار برد. بنابراین، با ایجاد اولین رده سلولی، کشت سلول تکامل یافت. با این حال، پس از گذشت ۳۰ سال، کشت سلول به‌عنوان یک شکست به شمار می‌رفت. زیرا روشی غیر کمی، غیرقابل تکرار و مدیریت آن دشوار بود و تقریباً کاربردی نداشت. اما در اوایل دهه ۱۹۴۰، کشت سلول با طراحی و توسعه یک محیط کشت مصنوعی برای سلول‌های گیاهی و حیوانی شکوفا شد. در سال ۱۹۵۱، دکتر جونز^۳ با استفاده از بیوپسی دهانه رحم، سرطان دهانه رحم را تشخیص داد. وی نمونه‌ای را به دکتر گی^۴، مدیر آزمایشگاه کشت بافت فرستاد و او نیز سلول‌ها را کشت داد و فهمید این سلول‌ها از ماندگاری قابل‌ملاحظه‌ای برخوردار بوده و قابلیت تقسیم و دو برابر شدن هر بیست ساعت یک‌بار را دارند. این رده سلولی جدید، به نام هلا^۵ نام‌گذاری شد که امکان توسعه واکسن سالک^۶ را فراهم کرد. توانایی تکثیر بالا در هر نوع محیط سلولی، این رده سلولی را به یکی از ارزش‌ترین منابع برای مطالعات در حوزه سرطان تبدیل کرد. همچنین با بررسی و تلاش‌های سایر دانشمندان در حوزه کشت سلول و کشت بافت حیوانی، کشت سلول‌های حیوانی به ابزاری اساسی برای پیشرفت علم به‌عنوان راه‌حلی برای بسیاری از مشکلات سلامتی انسان تبدیل شد.

از دهه ۱۹۵۰ میلادی، از نظر توسعه فن‌آوری ابزارهای بازاریابی، کشت سلول آغاز شد. از این‌رو، کشت سلول با تبدیل به یک تکنیک آسان و قابل انجام مجدد، به یکی از قدرتمندترین ابزارهایی که به شکل گسترده‌ای در تحقیقات و توسعه بیوتکنولوژی در داروهای مورد استفاده قرار می‌گیرد، تبدیل شد.

-
1. Montrose Burrows
 2. Alexis Carrel
 3. Jones
 4. Gey
 5. Henrietta Lacks (HeLa)
 6. Salk

کاربردهای کشت سلول

کشت سلول یکی از مهم‌ترین ابزارهای مورد استفاده در تحقیقات زیست‌شناسی سلولی و مولکولی به شمار می‌رود که از آن به‌عنوان مدلی مناسب برای مطالعه‌ی فیزیولوژی طبیعی و بیوشیمیایی سلول‌ها (در مطالعات متابولیک و پیری)، بررسی اثرات داروها و ترکیبات سمی بر روی سلول‌ها و جهش‌زایی و سرطان‌زایی استفاده می‌شود. همچنین از کشت سلول در غربالگری و توسعه داروها و ساخت مقیاس گسترده‌ای از ترکیبات بیولوژیک شامل واکسن‌ها و پروتئین‌های نوترکیب درمانی استفاده می‌شود. از مهم‌ترین کاربردهای کشت سلول مورد استفاده توسط محققین، می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- **استفاده از کشت سلول به‌عنوان سیستم مدل:** از کشت سلول می‌توان به‌عنوان سیستم مدل در مطالعات بیولوژی و بیوشیمی سلول‌های بنیادی و سایر سلول‌ها، بررسی اثر متقابل سلول و عوامل ایجادکننده بیماری مانند باکتری‌ها و ویروس‌ها، بررسی اثر داروها، مطالعه روند پیری و عوامل مؤثر در القای پیری استفاده نمود.
- **کاربرد در مطالعات سرطان:** مطالعه و بررسی تفاوت اساسی بین سلول طبیعی و سلول سرطانی، مکانیسم و علل سرطان و همچنین تعیین داروهای مؤثر برای از بین بردن انتخابی سلول‌های سرطانی با استفاده از تکنیک کشت سلول در شرایط آزمایشگاهی قابل انجام است. زیرا هر دو نوع سلول در آزمایشگاه قابل کشت هستند و سلول‌های عادی با استفاده از پرتودرمانی، مواد شیمیایی و ویروس‌ها می‌توانند به سلول‌های سرطانی تبدیل شوند.
- **کاربرد در مطالعات ویروس‌شناسی:** از کشت سلول برای تکثیر ویروس‌ها در تولید واکسن استفاده می‌شود. همچنین از این تکنیک می‌توان برای شناسایی و جداسازی ویروس‌ها، مطالعه چرخه رشد و تکثیر ویروس‌ها و مطالعه نحوه ایجاد عفونت استفاده نمود.
- **بررسی سمیت سلولی:** از کشت سلول می‌توان برای بررسی تأثیر داروهای جدید، مواد شیمیایی و آرایشی بر روی بقا و رشد انواع مختلفی از سلول‌ها به خصوص سلول‌های کبدی و کلیوی استفاده نمود.
- **غربالگری و توسعه دارو:** از کشت سلول‌های انسانی و جانوری برای مطالعه و بررسی سمیت دارو، یافتن دوز مؤثر، مجاز و بی‌خطر داروهای جدید استفاده می‌شود. کشت سلول نقش بسیار مهمی در صنعت داروسازی دارد.
- **تولید واکسن:** از سلول‌های کشت‌شده در شرایط آزمایشگاهی می‌توان برای تولید ویروس‌های موردنیاز برای تولید واکسن استفاده نمود. به‌عنوان مثال، ویروس‌های کاربردی برای تولید واکسن ضد بیماری‌های کشنده مانند فلج اطفال، هاری، آبله‌مرغان، سرخک و هپاتیت B با استفاده از کشت سلول حیوانات ایجاد می‌شوند.
- **تولید پروتئین‌های نوترکیب:** کشت سلول برای تولید انواع مختلفی از پروتئین‌های نوترکیب تجاری مانند آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، انسولین، هورمون‌ها و موارد دیگر با کاربرد تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد.



- **تعویض بافت یا اندام:** از کشت سلول می‌توان به‌عنوان جایگزین بافت یا اندام استفاده نمود. به‌عنوان مثال، از این روش می‌توان در تولید پوست مصنوعی برای درمان بیماران مبتلا به سوختگی و زخم استفاده کرد. با این وجود، تحقیقات در تولید ارگان‌های مصنوعی مانند کبد، کلیه و لوزالمعده در حال انجام است. همچنین، کشت سلول در بررسی روش‌های کشت ارگان‌ها و تحقیقات مرتبط با ارگان‌ها کاربرد دارد. با توجه به این که سلول‌ها توانایی تمایز در انواع مختلف اندام‌ها را دارند، اعتقاد بر این است که با فراگیری روش‌های کنترل رشد و تمایز سلول‌ها، می‌توان از آن‌ها برای درمان انواع مختلفی از مشکلات پزشکی استفاده نمود.
- **مشاوره ژنتیک:** از کشت سلول جنین استخراج‌شده از زنان باردار می‌توان برای مطالعه و بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی، ژن‌های مورد استفاده در کاریوتایپینگ و تشخیص زود هنگام اختلالات جنینی استفاده کرد.
- **مهندسی ژنتیک:** از سلول‌های کشت داده شده می‌توان برای مطالعه مواد ژنتیکی موجود در سلول مانند DNA یا RNA به منظور مطالعه بیان ژن‌های جدید و تأثیر آن بر سلامت سلول استفاده کرد. به‌عنوان مثال، از آلوده کردن برخی از سلول‌ها با ویروس‌ها برای ایجاد تغییرات ژنتیکی در آن‌ها برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب مهم تجاری استفاده می‌شود.
- **ژن درمانی:** سلول‌های کشت داده شده در آزمایشگاه می‌توانند از نظر ژنتیکی تغییر یافته و از آن‌ها در تکنیک ژن درمانی استفاده نمود. برای این منظور، سلول‌ها از بیمارانی که فاقد ژن عملکردی هستند و یا ژن عملکردی ناقص دارند استخراج می‌شوند و ژن‌های معیوب توسط ژن‌های کاربردی جایگزین شده و سلول‌های تغییر یافته در شرایط آزمایشگاهی کشت داده می‌شوند. سپس سلول‌های تغییر یافته به بیمار تزریق می‌شوند. روش دیگر، استفاده از وکتور ویروسی حاوی ژن کاربردی در ژنوم آن و تزریق به بیمار با هدف بیان ژن معیوب یا ناقص با کمک وکتور ویروسی است.

زیست‌شناسی سلول‌ها در محیط کشت

منشأ و ویژگی سلول

انواع مختلفی از سلول‌ها را می‌توان در محیط‌های کشت تجاری رشد و تکثیر داد. منشأ سلول می‌تواند از بافت‌ها یا سلول‌هایی که مستقیماً از بدن موجود زنده جدا می‌شوند و یا رده‌های سلولی که نامیرا شده‌اند، باشد. تقریباً اکثر سلول‌های هر بافت، ویژگی‌ها و مارکرهای مخصوص به خود را دارند که می‌توان آن سلول را از بقیه متمایز کرد.

در کشت اولیه به‌دست آمده از یک بافت ممکن است برخی سلول‌ها نسبت به برخی دیگر تمایل بیش‌تری برای تکثیر داشته باشند. از این‌رو، ممکن است در کشت حاصله هتروژنیسیته دیده شود. به‌عنوان مثال، کشت کراتینوسیت پوست شامل سه نوع جمعیت سلولی مختلف شامل: سلول‌های بنیادی، سلول‌های پیش‌ساز و سلول‌های تکامل یافته و بالغ است. فاکتورهای مکمل اضافه شده به محیط کشت

هم‌چون فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و سرم نیز می‌تواند در قدرت تکثیر و تمایز سلول‌های کشت داده شده تأثیرگذار باشد. از آنجاکه میزان و زمان تکثیر و دو برابر شدن هر رده سلولی در محیط کشت متفاوت و منحصر به فرد است، بنابراین قبل از کار با هر رده سلولی بایستی خصوصیات و ویژگی‌های آن مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد.

تمایز سلول‌ها در محیط کشت

هدف از کشت سلول، رشد و تکثیر و تمایز سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی است. اندازه، شکل، پتانسیل غشای سلول، فعالیت متابولیک و قدرت پاسخگویی به سیگنال‌ها به‌طور چشمگیری در تمایز سلولی تغییر می‌کند. شرایط موجود در محیط‌های کشت از قبیل حضور هورمون‌ها، مواد مغذی افزودنی و عوامل القاکننده، تمایز سلول‌ها را به سمت تمایز هدایت می‌کند. به‌عنوان مثال، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط‌های کشت تمایزی، توانایی تمایز به بافت‌های استخوانی، چربی و غضروف را دارند. بنابراین با ایجاد تغییر در شرایط و افزودنی‌های محیط کشت، می‌توان زمینه برای تمایز سلول‌ها به سلول موردنظر را فراهم نمود.

مرگ سلولی

مرگ سلولی، رویدادی است که در طی آن عملکردهای بیولوژیک سلول متوقف می‌شود. این پدیده ممکن است نتیجه روند طبیعی سلول‌های قدیمی در حال مرگ و جایگزینی با سلول‌های جدید باشد و یا ممکن است از عواملی مانند بیماری، آسیب موضعی یا مرگ ارگانسیم که سلول‌ها در آن نقش دارند، ناشی شود. آپوپتوز (مرگ سلولی نوع I) و اتوفازی (مرگ سلولی نوع II)، هر دو نوع، مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده هستند، درحالی‌که نکروز یک فرآیند غیرفیزیولوژیکی است که از عفونت و یا جراحت ناشی می‌شود. مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده (PCD)^۱، مرگ سلولی است که در یک فرآیند تنظیم‌شده انجام می‌شود و مزایای آن در طول چرخه زندگی یک ارگانسیم اثبات شده است. به‌عنوان مثال، تمایز بین انگشتان دست و انگشتان پا در جنین در حال رشد انسان، به دلیل آپوپتوز سلول‌های بین انگشتان ایجاد می‌شود.

آپوپتوز

آپوپتوز، مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده است که ممکن است در موجودات چند سلولی رخ دهد. حوادث بیوشیمیایی منجر به تغییرات سلولی مشخص در مورفولوژی و مرگ می‌شوند. این تغییرات شامل: از هم گسیختگی، انقباض سلول، قطعه‌قطعه شدن هسته، متراکم شدن کروماتین و قطعه‌قطعه شدن DNA کروموزومی است. عوامل مختلفی در کشت سلول باعث القای آپوپتوز در سلول می‌شوند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به محدودیت در منابع تغذیه‌ای نظیر اسیدهای آمینه و گلوکز در محیط کشت و همچنین کمبود اکسیژن اشاره کرد.

اتوفازی



اتوفازی، فرآیندی سیتوپلاسمی است که با تشکیل واکوئل‌های بزرگی که قبل از تخریب هسته، اندامک‌ها را به ترتیب مشخص می‌خورند، مشخص می‌شود. ماکرواتوفازی^۱، اغلب از آن به‌عنوان اتوفازی یاد می‌شود، یک فرآیند کاتابولیکی است که منجر به تخریب اتوفازوزومی لیزوزومی از محتوای سیتوپلاسمی، تخریب اسیدهای آمینه موردنیاز برای ساخت پروتئین و اندامک‌های اضافی یا آسیب‌دیده می‌شود. در کشت سلول، اتوفازی عموماً با شرایط محرومیت از مواد مغذی فعال می‌شود، اما با فرآیندهای فیزیولوژیک و آسیب‌شناسی نظیر تکامل، تمایز، استرس و آلودگی نیز همراه است.

نکروز

نکروز، مرگ سلولی است که در آن سلول به واسطه نیروهای خارجی مانند ضربه یا آلودگی بسیار آسیب‌دیده است و به اشکال مختلف رخ می‌دهد. در شرایط نکروز، سلول متورم شده و به دنبال آن، پارگی کنترل نشده غشای سلول رخ می‌دهد و در نهایت محتویات سلول بیرون می‌ریزد. این محتویات غالباً باعث ایجاد التهاب در سلول‌های اطراف می‌شوند. نوعی نکروز برنامه‌ریزی شده تحت عنوان نکروپتوز، به‌عنوان یک روش جایگزین مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در مواقعی که سیگنالینگ آپوپتوز توسط عوامل درون‌زا یا برون‌زا مانند ویروس یا جهش مسدود شود، شناخته می‌شود. در کشت سلول، نکروز بیش‌تر به دلیل آلودگی و یا ضربه القا می‌شود.

تفاوت آپوپتوز و نکروز

تفاوت‌های بیوشیمیایی و مورفولوژی بسیاری بین نکروز و آپوپتوز وجود دارد. نکروز، پاسخ طبیعی سلول به صدمات فیزیولوژیکی است که با برهم‌خوردگی توانایی سلول برای نگهداری هموستاز شروع می‌شود. با نفوذ آب و یون‌های خارج سلولی، تمام اندامک‌های درون‌سلولی به‌خصوص میتوکندری متورم و سپس با ازهم‌پاشیدگی غشا و لیز سلول، تخریب می‌شوند و در نهایت اجزای سیتوپلاسمی نظیر آنزیم‌های لیزوزومی در مایع خارج سلولی رها می‌شوند. بنابراین به علت پاسخ‌های التهابی، مرگ سلولی از طریق نکروز ایجاد می‌گردد. در آپوپتوز برخلاف نکروز که در اکثر مواقع به علت تحریکات داخل سلولی اتفاق می‌افتد، سلول اقدام به خودکشی می‌کند. سلول آپوپتوز شده ویژگی‌های مورفولوژی خاصی دارد که از بارزترین آن‌ها می‌توان به وجود اجسام آپوپتوزی اشاره کرد. این اجسام شامل قسمتی از سیتوپلاسم و هسته در وزیکول‌های پلاسمایی و همچنین وزیکول‌های حاوی ریبوزوم هستند. در این فرآیند التهاب به‌عنوان وجه تمایز نکروز و آپوپتوز، ایجاد نمی‌شود (جدول ۱).

جدول ۱. تفاوت بین آپوتوز و نکروز

ویژگی	آپوتوز	نکروز
تعریف	نوعی مرگ سلولی است که عموماً توسط فرآیندهای طبیعی و سالم در بدن ایجاد می‌شود.	مرگ زودرس سلول‌ها و بافت زنده است. اگرچه نکروز به‌عنوان یک شکل ممکن از مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده موردبررسی قرار می‌گیرد، اما در حال حاضر یک فرآیند مرگ سلولی "برنامه‌ریزی نشده" محسوب می‌شود.
طبیعی بودن	فرآیندی طبیعی است.	از عوامل خارج سلولی یا بافتی مانند عفونت، سموم یا تروما ناشی می‌شود.
اثرات	معمولاً سودمند است. فقط در موارد غیرطبیعی که فرآیندهای سلولی باعث حفظ تعادل بدن شوند، منجر به کشته شدن سلول می‌شود.	در بیش‌تر مواقع مضر است.
پروسه انجام	با از هم گسیختگی غشاء، انقباض سلول، فروپاشی هسته، متراکم شدن کروماتین، قطعه‌قطعه شدن DNA کروموزومی، اجسام آپتوتیک همراه است.	اختلال در غشاء، سموم تنفسی و هیپوکسی که باعث کاهش ATP، فروپاشی متابولیک، تورم سلولی و پارگی سلول که منجر به التهاب می‌شود.
علائم	معمولاً علائم قابل توجهی وجود ندارد.	التهاب، مرگ سلول و بافت دیده می‌شود.

تجهیزات و وسایل کشت سلول

تجهیزات و وسایل مورد نیاز در کشت سلول

تأمین تجهیزات و وسایل مورد استفاده در آزمایشگاه کشت سلول، عموماً براساس نیازها، اهداف کاری، نوع فعالیت‌ها و همچنین منابع مالی آزمایشگاه صورت می‌گیرد. در این بخش، به معرفی مهم‌ترین و متداول‌ترین تجهیزات و وسایل مورد نیاز در اکثر آزمایشگاه‌های کشت سلول و همچنین نکات لازم هنگام تهیه و استفاده از آن‌ها می‌پردازیم. از مهم‌ترین تجهیزات مورد نیاز می‌توان به هود بیولوژیک، انکوباتور، بن ماری، سانتریفیوژ، میکروسکوپ معکوس، دستگاه‌های خنک‌کننده، ابزار مورد نیاز برای شمارش سلول، سمپلر، پیپتور اتوماتیک و دستگاه‌های لازم برای استریلیزاسیون اشاره کرد.

هود بیولوژیک (BSC)^۱

فراهم کردن محیط کاری استریل و عاری از آلودگی، مهم‌ترین نیاز یک آزمایشگاه کشت سلول محسوب می‌شود. بنابراین، ساده‌ترین راه ایجاد شرایط آسپتیک، استفاده از هود بیولوژیک است. هودهای بیولوژیک محفظه‌های استریلی هستند که برای محافظت از کاربر، محیط آزمایشگاه و مواد در برابر تماس با آئروسول‌ها و ترشحات آلوده‌ای که به‌هنگام کار کردن ایجاد می‌شوند، طراحی شده‌اند. به‌طور کلی کارکنان آزمایشگاه از وجود آئروسول‌ها (با قطر کمتر از ۵ میکرون) و قطرات کوچک (با قطر ۵ تا ۱۰۰ میکرون) که در حین کار تولید می‌شوند و امکان تنفس یا ایجاد آلودگی بر مواد سطح کار را دارند، آگاه نیستند. بنابراین، استفاده‌ی صحیح و بهینه از هودهای بیولوژیک با فراهم ساختن محیط کاری تمیز و عاری از آلودگی، می‌تواند نقش مهمی در کاهش ابتلا به عفونت‌های اکتسابی در آزمایشگاه و همچنین جلوگیری

از بروز آلودگی در کشت‌های سلول داشته باشد. فیلتر هپا^۱ (HEPA) موجود در هود بیولوژیک، قادر است ۹۹/۹۷ درصد از ذرات و میکروارگانیسم‌های معلق در هوا با قطر ۰/۳ میکرومتر و ۹۹/۹۹ درصد از ذرات با سایز کوچک‌تر یا بزرگ‌تر را به دام انداخته و جداسازی کند و از ورود هوای آلوده به محفظه‌ی استریل هود و محیط خارج جلوگیری نماید. براساس سطح محدودکنندگی و ایمنی، هودهای بیولوژیک را به سه دسته طبقه‌بندی می‌کنند:

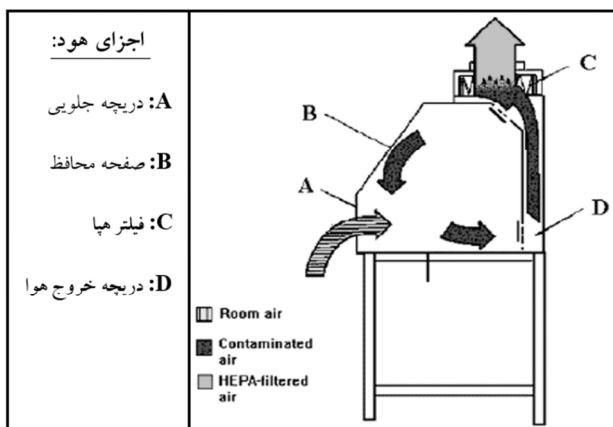
(۱) هود بیولوژیک کلاس I

(۲) هود بیولوژیک کلاس II

(۳) هود بیولوژیک کلاس III

هود بیولوژیک کلاس I

این نوع از هودهای بیولوژیک، سطح مناسبی از ایمنی را برای حفاظت از کاربر و محیط آزمایشگاه در برابر عوامل خطر ساز فراهم می‌کنند. اما به دلیل هدایت جریان هوای غیراستریل محیط از طریق فضای باز جلویی هود بر سطح کاری، برای حفاظت از مواد داخل هود در برابر آلودگی کاربردی نیستند. این نوع هودها به لحاظ نوع طراحی و سیستم جریان هوا، مشابه هودهای شیمیایی هستند و بیش‌تر برای کار با عواملی با خطر کم تا متوسط کاربرد دارند و برای کشت سلول مناسب نیستند (شکل ۱).



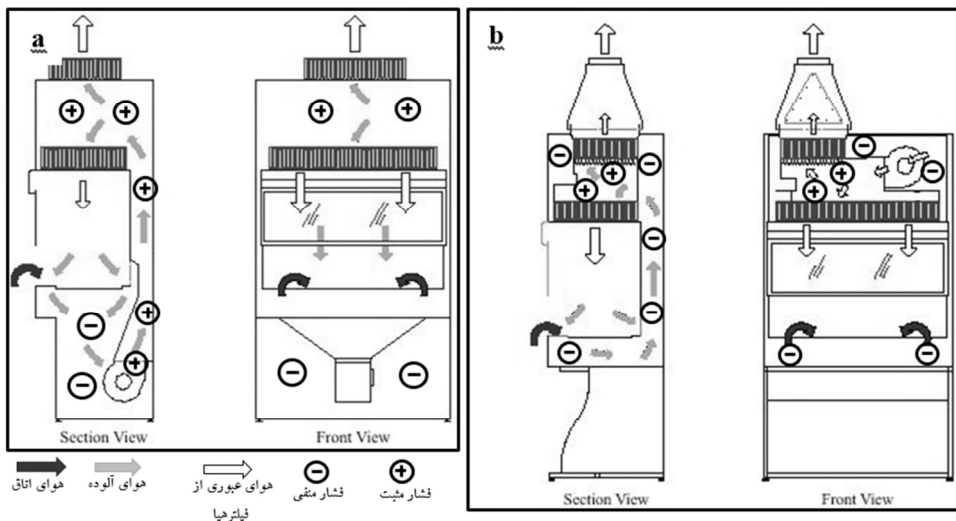
شکل ۱. هود بیولوژیک کلاس I

هود بیولوژیک کلاس II

با توجه به نیاز روزافزون و در حال گسترش کشت سلول و کشت بافت در شرایط کاملاً استریل، عبور جریان هوای غیراستریل از سطح کار قابل قبول نیست. لذا هودهای بیولوژیک کلاس II به گونه‌ای طراحی شده‌اند که علاوه بر حفاظت از کاربر و محیط آزمایشگاه در برابر آلودگی، محیط کاملاً استریل

هودهای بیولوژیک کلاس II نوع A (A1, A2):

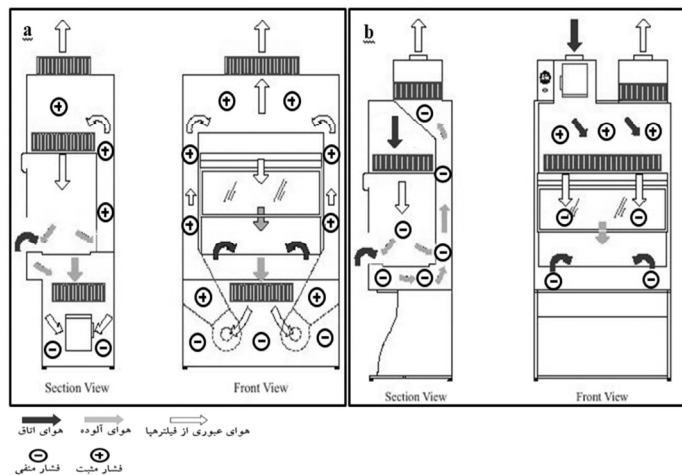
هودهای بیولوژیک کلاس II نوع A، متداول‌ترین هودهای کلاس II و همچنین، رایج‌ترین هودها در بین انواع مختلف هودهای موجود هستند. وجه مشترک این دو نوع هود این است که حدود ۷۰ درصد از هوا پس از عبور از طریق فیلتر هپا، مجدداً به درون منطقه‌ی کاری (با جریان بالا به پایین) برگشت داده می‌شود و ۳۰ درصد باقی‌مانده پس از عبور از فیلتر هپای خروجی به درون اتاق یا خارج از ساختمان تخلیه می‌شود. دو تفاوت قابل توجه بین این دو نوع هود وجود دارد: (۱) جریان هوا با دو سرعت متفاوت وارد هودها می‌شود. (۲) در هود نوع A2، جریان هوا در تمام مجراها و کانال‌های خروجی تحت فشار منفی حفظ می‌شود (شکل ۲).



شکل ۲. هود بیولوژیک کلاس II نوع A1 (a) و نوع A2 (b)

هودهای بیولوژیک کلاس II نوع B (B1, B2):

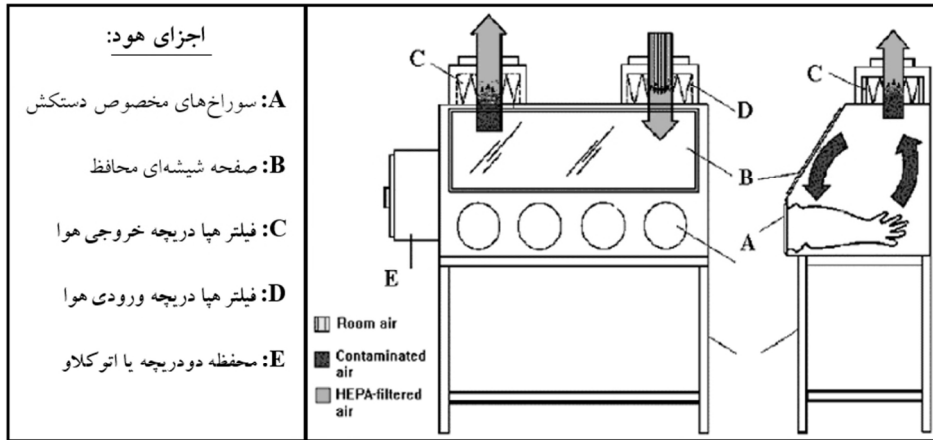
تفاوت اصلی موجود بین هودهای بیولوژیک نوع B1 و B2 این است که در هودهای نوع B1، حدود ۳۰ درصد از هوا پس از عبور از طریق فیلتر هپا مجدد به درون منطقه‌ی کاری (با جریان بالا به پایین) برگشت داده می‌شود و ۷۰ درصد باقی‌مانده، از طریق فیلتر هپای خروجی به خارج از ساختمان تخلیه می‌شود. در هودهای نوع B2 هیچ هوایی پس از فیلتر شدن مجدد به درون هود بازگردانده نمی‌شود و ۱۰۰ درصد هوا پس از عبور از فیلتر هوا به خارج از ساختمان تخلیه می‌شود. بنابراین، از آنجاکه در هودهای نوع B2 هیچ‌گونه گردش مجدد هوایی وجود ندارد، جریان هوای داخل آزمایشگاه (در بالای هود) باید به داخل کشیده شود و پس از عبور از فیلتر هپا به درون هود هدایت شود (شکل ۳).



شکل ۳. هود بیولوژیک کلاس II نوع B1 (a) و نوع B2 (b)

هود بیولوژیک کلاس III

این هودها طوری طراحی شده‌اند که با ایجاد سد فیزیکی کامل بین فرد و فضای داخل هود، بالاترین سطح محافظت از کاربر، محیط کار و مواد را از خطرات احتمالی در حین کار تأمین می‌نمایند. محافظه‌ی جلویی این هودها مانند هود کلاس I و II باز نیست و تمام موادی که وارد هود می‌شوند یا از آن خارج می‌گردند، از طریق محفظه‌های دودریچه‌ای با هم ارتباط دارند. هر نوع تغییر و آماده‌سازی مواد با استفاده از دستکش‌های متصل به قسمت جلوی هود امکان‌پذیر است. بنابراین، این هودها برای کار با عوامل فوق‌العاده خطرناک زیستی (پاتوژن‌های انسانی و سایر عوامل عفونی با خطر ایمنی‌زیستی نوع IV) و در مواردی که ایجاد محدودیت مطلق در حین کار مورد نیاز است، کاربرد دارند (شکل ۴).



شکل ۴. هود بیولوژیک کلاس III

- موارد زیر قبل از انتخاب و هنگام استفاده از هود بیولوژیک توصیه می‌شود:
 - (۱) دستگاه از شرکت معتبر انتخاب و مراحل نصب، کالیبراسیون و نگهداری از آن مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده باشد.
 - (۲) انتخاب نوع هود بایستی براساس نیاز و نوع کار آزمایشگاه صورت گیرد. هود بیولوژیک مورد استفاده برای کشت سلول، باید به اندازه‌ی کافی بزرگ و استفاده از آن برای کاربر آسان و راحت باشد. همچنین، از سیستم روشنایی کافی برخوردار بوده و سطوح داخلی و خارجی آن به آسانی قابل تمیز کردن باشد.
 - (۳) در شرایط مطلوب و برای جلوگیری از اختلال در جریان هوا، هود بیولوژیک باید در محلی دور از رفت‌وآمد و جریان هوا قرار گیرد. همچنین، در صورت امکان توصیه می‌شود فضای ۳۰ سانتی‌متری در پشت، بالا و هر طرف هود به منظور سهولت در تعمیر و نگهداری آن فراهم شود.
 - (۴) از به کار بردن شعله در فضای زیر هود، بایستی اجتناب نمود، زیرا باعث اختلال در الگوی جریان هوا و آسیب به فیلتر هپا می‌شود.
 - (۵) استفاده‌ی نادرست از هود می‌تواند تا حد زیادی اثرات حفاظتی آن را کاهش دهد. بنابراین لازم است قبل از استفاده از هود، کاربر در مورد استفاده ایمن و مناسب از آن آموزش لازم را ببیند.
 - (۶) استفاده از لوازم حفاظت فردی مانند روپوش، دستکش، ماسک و کلاه با توجه به نقش دوگانه‌ی آن‌ها در حفاظت از کاربر و محیط کار، قبل از شروع کار در زیر هود بسیار ضروری است.