فهرست

پیشگفتار ۶

فصل ۱: مقدمه‌ای بر کشت سلول ۷

فصل ۲: روش‌های کشت سلول؛ حرکت از کشت دو بعدی به کشت سه بعدی ۲۹

فصل ۳: تجهیزات ۵۱

فصل ۴: محیط کشت سلولی ۶۳

فصل ۵: روش‌های ضدعفونی ۸۵

فصل ۶: آلودگی در شرایط کشت و راه‌های مقابله ۱۱۵

فصل ۷: دستورالعمل‌ها ۱۳۹

واژه‌یاب ۱۴۵

پیشگفتار

کشت سلول‌های جانوری در حال حاضر بخش اساسی بسیاری از تحقیقات و روش‌های درمانی در زمینه‌های مختلف از جمله بیوشیمی، بیوتکنولوژی، تولیدات دارویی، سلول درمانی و مهندسی بافت است. عدم آشنایی با اصول و نکات پر اهمیت در کشت سلول می‌تواند توقف قطعی تحقیقات را در این حیطه رقم بزند. در کتاب حاضر ابتدا مقدمه‌ای در رابطه با کشت سلول آورده شده است و در ادامه، کشت‌های دو بعدی و سه بعدی که در حال حاضر در پزشکی بازساختی مدنظر هستند، به اختصار معرفی می‌شوند. در فصل‌های بعد نکات عمومی و کاربردی در فرآیند کشت سلول از جمله تجهیزات و وسایل پر کاربرد در آزمایشگاه کشت سلول، محیط‌های کشت، روش‌های استریل کردن مواد و وسایل، انواع آلودگی‌ها و راه‌های ایجاد و تشخیص آن‌ها و همچنین چند دستورالعمل پرکاربرد در کشت سلول آورده شده است. سعی بر آن شده است که نکات اصلی از منابع مهم کشت سلول از جمله کتاب ارزشمند کشت سلول‌های جانوری فرشنی جمع‌آوری گردد تا هر چه بیشتر برای خوانندگان و محققان عزیز مفید واقع شود. از آنجا که هیچ نوشتاری کاملاً بی‌عیب و نقص نیست، از شما خوانندگان عزیز در رفع موارد احتمالی و یا افزودن بخش‌های کاربردی دیگر برای ارتقا مجموعه حاضر در چاپ‌های آتی، طلب یاری داریم.

مجموعه حاضر را که با هدف جمع‌آوری نکات ضروری کشت سلولی تهیه شده است به کلیه علاقمندان و دانشجویان تقدیم کرده و امیدواریم که این اندک بتواند نقش کوچکی در ارتقای سطح علمی این عزیزان و پیشرفت سلامت کشور عزیزمان ایران ایفا نماید.

گردآورندگان

فصل ۱

مقدمه‌ای بر کشت سلول

نویسنده: صدف وحدت

۱-۱: مقدمه

بیش از یک قرن است که محققان سلول‌های مهره‌داران را در شرایط آزمایشگاهی کشت می‌دهند و تکثیر می‌کنند. در ابتدا، کشت سلول شامل قرار دادن تکه بافت‌های جدا شده از جانوران در یک محلول مغذی برای مشاهدات و انجام آزمایش بود. در نتیجه، بعضی سلول‌ها از بافت کشت‌شده که explant نام دارد، رشد می‌یافتند و لایه‌های سلولی را تشکیل می‌دادند. در طول سالیان، محققان به شناخت بهتری از مواد مغذیِ مورد نیاز سلول‌ها رسیدند، روش‌هایی را برای جداسازی آن‌ها از بافت و تکثیر آن‌ها ابداع کردند و به توانایی استفاده از سلول‌ها به عنوان ابزارهای مطالعاتی جدید دست یافتند. در نهایت، دریافته‌ایم که چگونه می‌توان از سلول‌ها برای تولید واکسن و دارو استفاده کنیم؛ امروزه، سلول‌های جانوری برای تولید پروتئین‌ها و واکسن‌های ویروسی با ارزش بیش از ۱۰۰ میلیارد دلار استفاده می‌شوند.

هم‌چنین، امروزه، سلول‌ها خود به عنوان یک محصول درمانی شناخته شده‌اند و در مطالعات بالینی گوناگون از آن‌ها و یا از مشتقات آن‌ها برای درمان انواع مختلف بیماری‌ها استفاده می‌شود. به‌عبارتی‌دیگر، سلول‌های جداسازی شده از بافت‌های انسانی و یا تمایزیافته از سلول‌های بنیادی انسانی می‌توانند برای تیمار معایب بافتی، ترمیم بافت‌ها و مبارزه با سرطان استفاده شوند. در علم نوین امروزی، انواع گوناگونی از سلول‌های بنیادی و سلول‌های تمایزیافته مانند سلول‌های عصبی، سلول‌های مزانشیمی و یا سلول‌های T سیستم ایمنی جداسازی و تکثیر شده‌اند و برای درمان بیماران مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در حقیقت سلول‌ها نه تنها ابزار مطالعات علمی، بلکه واسطه‌های فناوری پزشکی جدید نیز هستند.

برای دستیابی به این کاربردهای وسیع علمی و پزشکی نیاز است تا با روش‌های کشت سلول‌های گوناگون در آزمایشگاه آشنا شویم؛ بنابراین، در این فصل خواهید آموخت که چگونه کشت سلول از یک ابزار علمی به بستری مهم برای تولیدات صنعتی و پزشکی بازساختی[1] ارتقا یافته است. هم‌چنین، خواهید

1. Regenerative medicine

آموخت که چگونه نسل جدیدی از روش‌های درمانی بر پایه سلول برای تغییر فناوریِ پزشکیِ امروزی پدیدار شده است.

۱-۲: تاریخچه جداسازی و کشت سلول

مانند علوم دیگر، کشت سلول نیز در ابتدای راه مانند یک هنر بود؛ در واقع، توانایی انجام آن به دانش کافی، تجربه، کنجکاوی و پشتکار وابسته بود. کشت سلول‌های جانوری در حدود یک قرنِ قبل با کشت بافت آغاز شد، زمانی که قطعاتی از بافت در محلول بافتی جانور دیگر به حالت غوطه‌ور قرار داده می‌شد. وقتی سلول‌ها از قطعه بافتی به داخل سطح کشت رشد می‌یافتند، محققان می‌توانستند برای چند روز محدود رفتار سلول‌ها را مطالعه کنند. در ادامه، بعضی سلول‌ها جداسازی شده و برای تکثیر و تولید نسل‌های محدود بعدی مجدداً کشت داده می‌شدند. تا دهه ۱۹۳۰، محققان توانستند سلول‌های گوناگونی را از رده‌های تمایزیافته (مانند رشته‌های عصبی، فیبروبلاست‌ها و ...) جداسازی کنند و کشت دهند.

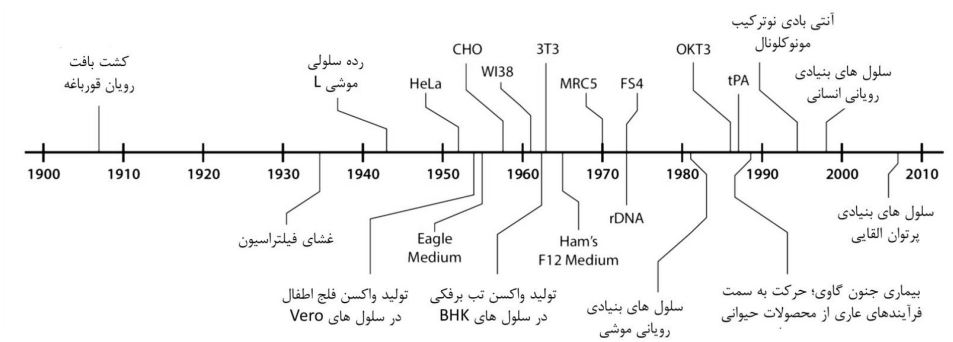
از آن جایی که، سلول‌های اولیه[1] جدا شده از بافت‌ها برای مدت زمان کوتاهی در آزمایشگاه باقی می‌مانند، استفاده از آن‌ها در تحقیقات با محدودیت همراه بود. با جدا کردن این سلول‌های رشد یافته و خارج شده از بافت کشت‌شده، می‌توان آن‌ها را به ظروف کشت جدید منتقل کرد تا بیشتر تکثیر شوند؛ به این روش پاساژ سلول‌ها[2] می‌گوییم. این روش باعث تولید رده‌های سلولی[3] با توانایی تکثیر و بقا در شرایط کشت می‌شود.

بقا و زنده‌مانی این رده‌های سلولیِ اولیه نیازمند پاساژهای متوالی است. در گذشته، سلول‌ها در یک محلول نمکی متوازن که با سرم[4]، مایع آسیت[5]، و عصاره جنین جوجه[6] غنی شده بود، رشد می‌یافتند. برای تهیه محیط کشت سلول[7]، باید مایع‌های بافت‌های جانوری به طور مداوم جداسازی می‌شدند، زیرا هنوز هیچ غشای فیلترکننده‌ای برای استریل کردن محیط کشت وجود نداشت؛ میزان سخت بودن عاری از آلودگی نگه‌داشتن سلول‌ها را در آن شرایط کشت تصور کنید. سپس، استفاده از تریپسین[8] برای جدا کردن سلول‌ها از سطحی که روی آن کشت داده شده بودند، معرفی شد و بنابراین، تریپسین جایگزین روش تکه تکه کردن برای پاساژ دادن سلول‌ها شد. اولین رده سلولی انسانی، HeLa، از سرطان دهانه رحم انسانی جداسازی شد و هنوز به صورت مداوم در آزمایشگاه‌های سراسر دنیا تکثیر می‌یابد و پاساژ داده می‌شود.

---

1. Primary cells
2. Cell passaging
3. Cell lines
4. Serum
5. Ascitic fluid
6. Chicken embryo extract
7. Cell culture medium
8. Trypsin

محققان پس از مشاهده و اطمینان از توانایی پاساژ و تکثیر جمعیت‌های سلولی، به فکر یافتن ملزوماتِ تغذیه‌ایِ سلول‌ها افتادند. برای تولید محیط‌های کشتِ جدید نیاز به روش‌های استریل کردن برای نگه‌داری طولانی‌مدت آن‌ها بود. پس از گذشت مدتی از آغازِ کشف روش‌های کشت، اتوکلاو[1] برای استریل کردن همه انواع مایعات، محلول‌ها و تجهیزات مورد استفاده قرار گرفت. برخلاف محلول‌های نمکی، دیگر ترکیبات محیط‌های کشت مانند مایعات بافتی را نمی‌توان به راحتی اتوکلاو کرد، زیرا در حرارتِ زیاد ناپایدار می‌شوند. در ادامه، تجاری‌سازی غشاهای نیتروسلولزی[2] برای فیلتر کردن، امکان استریل کردن محلول‌های مغذی پیچیده را نیز فراهم کرد. در سال ۱۹۵۵، تولید یک محیط کشت مغذیِ شیمیایی حاوی گلوکز، آمینواسیدها، ویتامین‌ها و نمک‌های متعادل باعث کاهش مشکلات جداسازی مایع‌های بافتی شد؛ به طوری که، محیط کشت سلول‌ها به جای دارا بودن بیش از ۵۰٪ سرم یا مایعات بافتی، حاوی بیش از ۸۰٪ محیط شیمیایی پایه گردید. یکی دیگر از ابداعات مهم در حوزه کشت سلول، یافتن روش نگه‌داری طولانی سلول به حالت فریز و انجماد[3] بود. این ابداع باعث کاهش نیاز به پاساژهای متوالی سلول در شرایط کشت شد و امکان استفاده از سلول به عنوان ابزار تحقیقاتی را برای محققان فراهم آورد. سیری از وقایع مهم در زمینه فناوری کشت سلول به صورت شماتیک در شکل ۱ نمایش داده شده است.



شکل ۱: سیر زمانی اتفاقات مهم در تاریخِ فناوری کشت سلول. *کلمه‌ی rDNA معادل فناوری DNA نوترکیب است.*

۱-۳: انواع سلول‌های مورد استفاده در فناوری کشت سلول

تاکنون، انواع گوناگونی از سلول‌های جانوری و انسانی از منابع مختلف در آزمایشگاه جداسازی، تولید و کشت داده شده‌اند و از آن‌ها در مقاصد مختلف تحقیقاتی، صنعتی و بالینی استفاده شده است. همان‌طور که در بالا اشاره شد، محققان در ابتدا سلول‌های اولیه‌ی جداسازی شده از بافت‌های مختلف را در آزمایشگاه کشت می‌دادند و سپس موفق به تولید رده‌های سلولی از پاساژهای متوالیِ سلول‌های جداسازی شده

1. Autoclaving
2. Nitrocellulose membranes
3. Cryopreservation

می‌شدند. لازم به ذکر است که اولین رده‌های سلولی تولیدشده در آزمایشگاه، مانند رده سلولی L موشی یا رده سلولی HeLa، از بافت‌های سرطانی جداسازی شدند، ولی تلاش برای تولید رده سلولی از بافت‌های سالم با تأخیر زمانی همراه بود، زیرا سلول‌های سالم در شرایط آزمایشگاه دچار پیری[1] می‌شدند. برای مثال، فیبروبلاست‌ها می‌توانستند از رویان جوجه[2] رشد یابند و در کشت تکثیر شوند، ولی پس از چند پاساژ متوالی، به سرعت از توانایی تکثیر آن‌ها کاسته می‌شد. با این وجود، پاساژهای متوالیِ فیبروبلاست‌های جداسازی شده از یک رویان جوجه، تولید رده سلولیِ به ظاهر طبیعیِ 3T3 را در پی داشت. سلول‌های 3T3 از نظر فنوتیپی[3] (ریخت سلولی) طبیعی و برای رشد و زنده‌مانی، وابسته به اتصال به کفِ پلیتِ کشت بودند. هم‌چنین، در کشت ویژگی مهار تماسی[4] نشان می‌دادند؛ این ویژگی برای سلول‌هایی است که اگر تراکم آن‌ها در پلیت کشت از حدی بیشتر شود، باعث مهار تکثیر و رشد یکدیگر می‌شوند و ممکن است آپوپتوز یا نکروز در آن‌ها رخ دهد. یک ویژگی مهم این سلول‌ها این بود که آن‌ها با کشتِ طولانی‌مدت دچار پیری نشدند، چون کاریوتایپ آن‌ها آناپلوئید و نه دیپلوئید بود. به تدریج، رده‌های سلولی بسیاری از بافت‌های جانوری مختلف مانند کلیه بچه همستر (BHK)[5] از همستر سوری[6]، Vero از کلیه‌ی میمون سبز[7]، و تخمدان همستر چینی (CHO)[8] از همستر چینی، جداسازی و تولید شدند. با این وجود، برخلاف سلول‌های 3T3، این سلول‌ها از نظر فنوتیپی طبیعی نبودند و از خود ویژگی مهار تماسی نشان نمی‌دادند.

در همان دوران، یک نژاد فیبروبلاستی به ظاهر طبیعی انسانی، به نام WI38، جداسازی شد. این سلول‌ها دیپلوئید، دارای ویژگی مهار تماسی و وابسته به اتصال به کفِ پلیتِ کشت هستند. ولی یک رده سلولیِ همیشگی (دائمی) مانند 3T3 نبودند؛ به طوری که، بعد از تقریباً ۴۰ پاساژ دچار پیری می‌شدند. این مشاهدات منجر به چیزی شد که امروزه به عنوان پدیده Hayflick می‌شناسیم، که در آن سلول‌های دیپلوئید طبیعی تنها تعداد محدودی از تقسیمات سلولی را قبل از توقف کامل تقسیمات انجام می‌دهند. در ادامه، جداسازی مداوم رده‌های سلولیِ اولیه مانند MRC-5 و FS4 منجر به استفاده از آن‌ها به ترتیب در تولید واکسن‌های ویروسی و تولید اینترفرون شد. سلول‌های MRC-5 کماکان برای تجاری‌سازی بسیاری از واکسن‌های ویروسی استفاده می‌شوند.

پس از سلول‌های HeLa، سلول‌های انسانیِ بیشتری از بافت‌های تمایزیافته سالم یا سرطانی جداسازی شدند. هنوز، برخی از رده‌های سلولی ویژگی‌های فنوتیپی بافتی که از آن جدا شدند، را دارا هستند. برای

1. Senescence
2. Chicken embryo
3. Phenotype
4. Contact inhibition
5. Baby hamster kidney (BHK)
6. Syrian hamster
7. Green monkey kidney
8. Chinese hamster ovary (CHO)

مثال، سلول‌های HepG2 که از کارسینومای کبدی[1] جداسازی شده‌اند، بسیاری از شاخص‌های[2] کبدی را بیان و آلبومین را ترشح می‌کنند. سلول‌های Jurkat، رده سلولیِ لنفوسیت‌های T انسانی جداسازی شده از لوسمی، نیز شاخص‌های اختصاصی سلول‌های T مانند CD4، CD3 و CD45 را بیان می‌کنند. این سلول‌ها و دیگر رده‌های سلولی تمایزیافته ابزاری ارزشمند در مطالعات حوزه زیست پزشکی هستند.

برخی رده‌های سلولی در صورت تیمار با ترکیبات پیام‌رسان مناسب می‌توانند در شرایط آزمایشگاه[3] به رده‌های متعهدتر تبدیل شوند که این فرآیند تمایز[4] نام دارد. برای مثال، یک کلون از سلول‌های 3T3 به نام 3T3-L1، می‌تواند به سلول‌های چربی (ادیپوسیت[5]) تمایز پیدا کند. این رده سلولی نمایانگر ایده استفاده از سلول‌های تمایزیافته برای مطالعات آزمایشگاهی و در نهایت، برای درمان است.

۱-۳-۱: رده‌های سلولی دائمی با دست‌کاری ژنتیکی

تاکنون رده‌های سلولی گوناگونی با کمک تغییرات ژنتیکی به منظور تولید سلول‌های نامیرا[6]، تولید شده‌اند. برای این منظور، وکتورهای ویروسی مختلفی به سلول‌های بافت‌های مختلف وارد و سلول‌ها دست‌ورزی شده‌اند. برای مثال، رده سلولی HEK293 از سلول‌های کلیه‌ی انسانی در مراحل رویانی با وارد کردن DNA آدنوویروسی نوع 5E1 به وجود آمده است. هم‌چنین، ژنِ آنزیم رونوشت بردار معکوس تلومراز انسانی (hTERT)[7] نیز برای تولید رده‌های سلولی با توان مقابله با کاهش تلومراز، در بعضی سلول‌ها وارد شده است؛ این سلول‌ها ژنوتیپ پایدار دارند و بیان شاخص‌های فنوتیپی خود را حفظ می‌کنند.

سلول‌های نامیرا باعث غنای ذخیره‌ی رده‌های سلولیِ مورد استفاده در مطالعات زیست پزشکی شده‌اند. بعضی از آن‌ها در تولیدات زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند. برای مثال، سلول‌های HEK293 برای تولیدِ تجاری پروتئین C و تولید ویروس‌های adeno-associated مورد نیاز در ژن‌درمانی استفاده می‌شوند. آن‌ها هم‌چنین رده سلولی مطلوب برای بیان موقتی ژن‌ها به منظور تولید مقادیر تحقیقاتی از پروتئین‌ها در صنایع بیوتکنولوژی هستند. با این وجود، به لحاظ عملکردی، رده‌های سلولی نامیرا یا جداسازی شده از بافت‌ها، از نظر ویژگی‌های زیستی مشابهت کمی با سلول در داخل بدن موجود زنده[8] دارند، زیرا بسیاری از ویژگی‌های کلیدیِ بافت اولیه در این رده‌های سلولی باقی نمانده است. برای مثال، آنزیم‌های سیتوکروم P450 تنها به میزان بسیار کم در سلول‌های HepG2 یا دیگر رده‌های سلولی کبدی بیان می‌شوند، با

1. Hepatocellular carcinoma
2. Markers
3. In vitro
4. Differentiation
5. Adipocyte
6. Immortal cells
7. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT)
8. In vivo

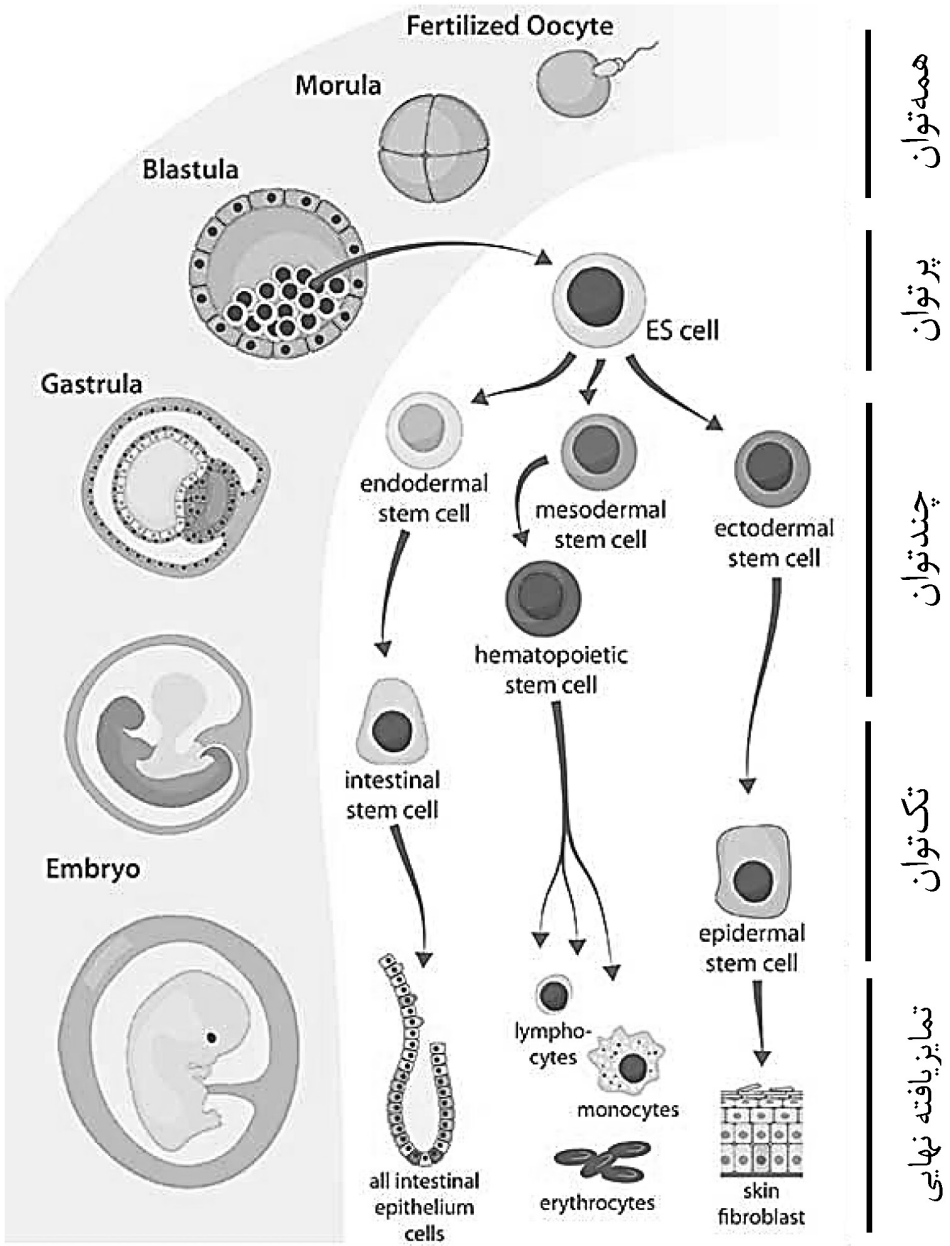
وجودی که آلبومین و دیگر پروتئین‌های کبدی را ترشح می‌کنند. بنابراین، اگرچه رده‌های سلولی نامیرا در صنعت بیوتکنولوژی کاربرد فراوان دارند، به دلیل وجود این تفاوت‌های عملکردی با سلول‌های داخل بدن، سلول مطلوب برای مطالعات حوزه پزشکی بازساختی مانند سلول درمانی، مهندسی بافت و ژن‌درمانی نیستند. در عوض، سلول‌های بنیادی یا سلول‌های تمایزیافته حاصل از آن‌ها برای مطالعات حوزه پزشکی بازساختی از محبوبیت بیشتری برخوردار هستند، که در قسمت‌های بعد، بیشتر توضیح داده خواهند شد.

۱-۳-۲: سلول‌های بنیادی و رده‌های سلولیِ دارای عملکردِ مشتق از آن‌ها

سلول‌های بنیادی با دو ویژگی اصلی شناخته می‌شوند: توانایی خودنوزایی[1] و توانایی تمایز به سلول‌های تعهدیافته تر. این سلول‌ها بر اساس توانایی تمایز به چندین گروه تقسیم می‌شوند: همه‌توان[2]، پرتوان[3]، چندتوان[4] و تک‌توان[5]. سلول‌های همه‌توان مانند سلول تخم، می‌توانند به تمام سلول‌ها از جمله تمام سلول‌های تشکیل‌دهنده جنین[6] و نیز بافت‌های خارج رویانی[7] (مانند جفت) تبدیل شوند؛ بنابراین، این سلول‌ها می‌توانند یک موجود کامل را تولید کنند. در عوض، سلول‌هایی که توان تولید انواع مختلفِ سلول‌های سه لایه زایای جنینی یعنی اکتودرم، مزودرم و اندودرم را دارند ولی نمی‌توانند سلول‌های خارج رویانی را تولید کنند، سلول‌های پرتوان نامیده می‌شوند. از طرف دیگر، سلول‌های بنیادی چندتوان می‌توانند به تعداد محدودی از سلول‌های یک موجود زنده تمایز یابند. برای مثال، سلول‌های بنیادی خون‌ساز[8] و سلول‌های بنیادی مزانشیمی[9] دو نوع از سلول‌های بنیادی چندتوان هستند. اغلب سلول‌های بنیادی چندتوان از بافت‌های بزرگسالان جدا می‌شوند ولی از بافت‌های بدن نوزادان و کودکان، جفت و بندناف نیز قابل جداسازی هستند. ممکن است در محیط زندگی خود که کنام[10] نام دارد، به صورت خاموش[11] باشند، و تنها در صورت نیازِ بافت تکثیر و تمایز یابند. این نیاز یا می‌تواند به دلیل شرایط طبیعی بافت از جمله بزرگ شدن باشد، یا به دنبال آسیب بافت، برای ترمیم و جبران آسیب‌دیدگی باشد. سلول‌های بنیادی چندتوان پس از جداسازی از بافت و تکثیر در آزمایشگاه، به دلیل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیاییِ شرایط کشت، ممکن است وادار به تکثیر شوند. به دلیل عدم شناسایی دقیق شرایط کشت بهینه این سلول‌ها، توانایی تکثیر آن‌ها در آزمایشگاه محدود است و ممکن است پس از چند پاساژ، توانایی خودنوزایی و تمایز خود را

1. Self-renewal
2. Totipotent
3. Pluripotent
4. Multipotent
5. Unipotent
6. Fetal cells
7. Extra-embryonic tissues
8. Hematopoietic stem cells (HSCs)
9. Mesenchymal stem cells (MSCs)
10. Niche
11. Quiescent

از دست بدهند. انواع سلول‌های بنیادی به صورت شماتیک در شکل ۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲: انواع سلول‌های بنیادی و درخت توان تمایزی آن‌ها. *هرچه سلول‌ها به سمت تکوین بیشتر پیش می‌روند، از قدرت تمایزی آن‌ها کاسته شده و به رده‌های محدودتری متعهد می‌شوند. برخی مثال‌های سلول‌های بنیادی چندتوان نمایش داده شده است.*