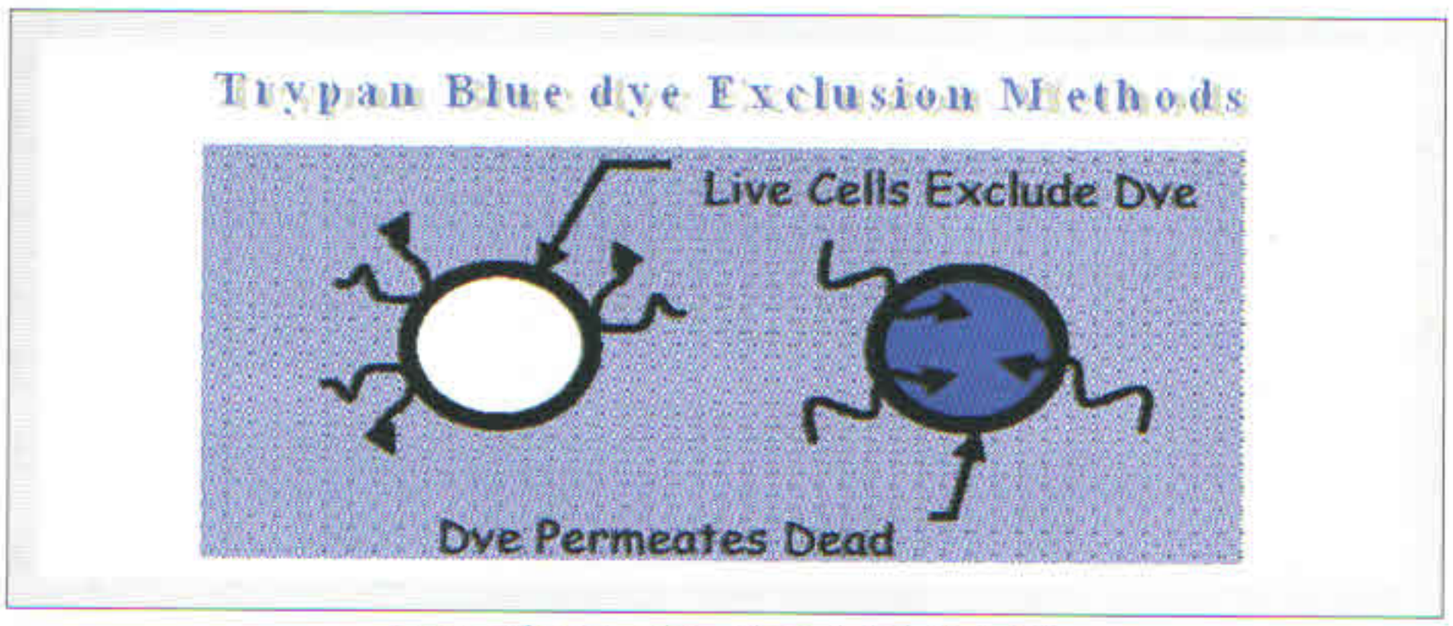
نکاتی در مورد اندازه‌گیری قدرت بقای سلول (Cell Viability)

۱. **Dye exclusion**: بـرای ارزیابی قدرت بقای سـلول از رنگ‌های حیاتی مثل تریپان بلو استفاده می‌شود. این روش Dye exclusion نام دارد.

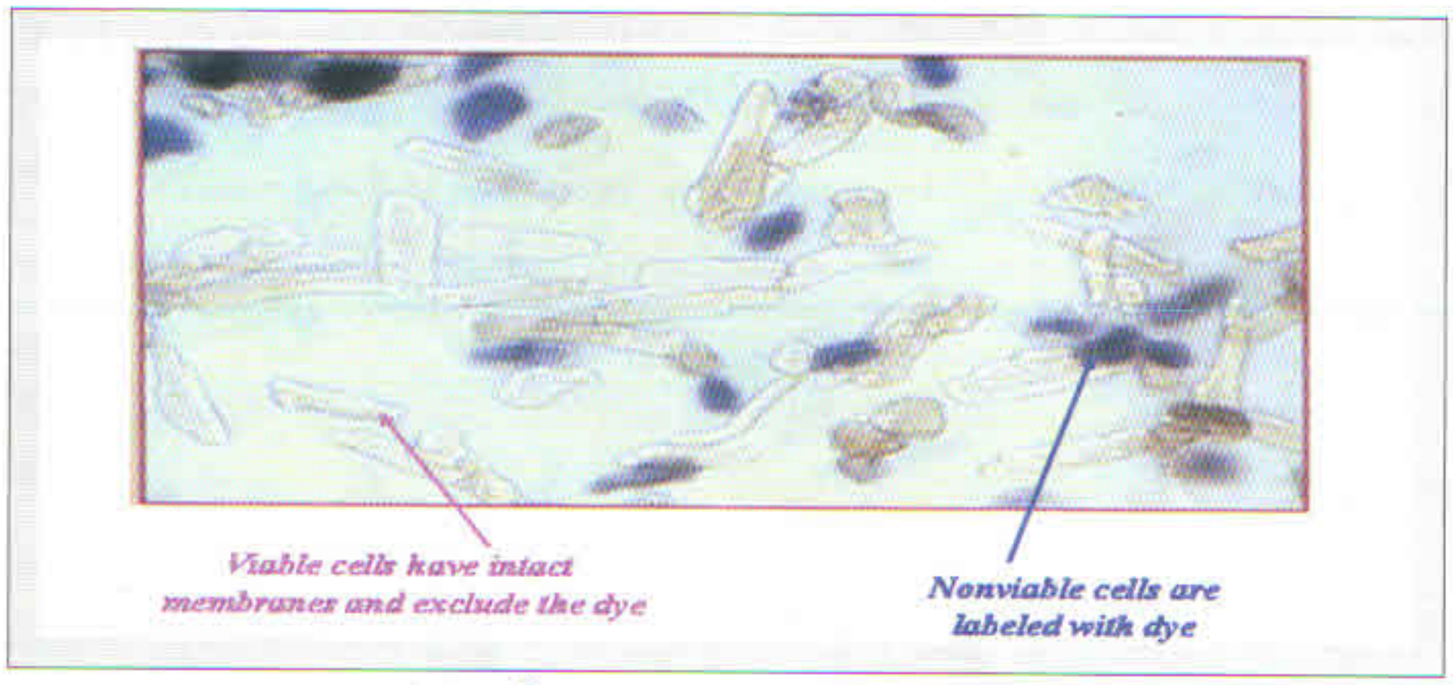
در این روش غشای سلول‌های مرده به رنگ تریپان بلو نفوذپذیر است(شکل۲-۴) و سلول از این رنگ پر می‌شود. درحالی‌که سلول‌های زنده شفاف و سفیدند. (از تریپان بلو ۰/۴درصد استفاده می‌شود.) برعکس، رنگ نوترال رد (nutral red) سـلول‌های زنده را قرمز می‌کند ولی سلول‌های مرده رنگ نمی‌گیرند. ارزیابی قدرت بقای سلول با این رنگ آسان نیست، چون زمینهٔ لام را هم قرمز می‌کند.

پس از تعیین تعداد سلول‌های زنده و مرده، قدرت بقا به صورت زیر محاسبه می‌شود:

Viability index: تعداد سلول‌های زنده/ کل سلول‌ها × ۱۰۰



شکل ۲-۴ - نفوذپذیری غشای سلول مرده به رنگ تریپان بلو



شکل ۲-۴ - نفوذپذیری غشای سلول مرده به رنگ تریپان بلو

شـــکل ۲-۵- ارزیابی بقای ســـلولی با اســـتفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو با میکروســـکوپ. سلول‌های زنده به رنگ روشن و سلول های مرده به رنگ آبی‌اند.

نکته: هنگام رنگ آمیزی ســـلول با تریپان بلو مدت زمان مهم اســـت، چون با گذشت زمان ســـلول‌های زنده هم رنگ می‌گیرند و باعث بروز خطا در شـــمارش سلول می‌شوند. حداکثر مدت زمان رنگ آمیزی با تریپان بلو ۳ دقیقه است.

۲. Tetrazolium assay: نام دیگر این روش رنگ‌آمیزی MTT است. سلول زنده می‌تواند متابولیسم اکسیداتیو انجام دهد. بنابراین میتوکندری سالم دارد و می‌تواند اکسیژن مصرف کرده و با اکسیداســـیون رنگ MTT را بشـــکند و رنگی در محدودهٔ زرد تا آبی تولید کند. با آزمایش رنگ‌سنجی (Colorimetric assay)تعداد سلول‌های زنده مشخص می‌شود.

مراحل آزمایش MTT:

(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)

مراحل آزمایش از ابتدای کشـــت سلولی تا بررسی نتایج با فتومتر در یک میکروپلیت انجام می‌شود بنابراین تکرارپذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالاست.

۱. اگر آزمایش روی ســـلول‌های چسبیده به پلیت انجام می‌شـــود، ابتدا باید تعدادمناسبی ســـلول (حدود ۲۰۰۰۰ سلول) را در هر یک از چاهک‌ها کشت داده و اجازه داد که سلول‌ها به کف پلیت بچسبند و ثابت شوند.

۲. چاهک‌های کنترل و آزمایش را انتخاب و مقدار مناســـبی از ماده میتوژن یا داروی مورد نظر را به چاهک‌های آزمایش اضافه کنید و پلیت را تا زمان مورد نیاز در انکوباتور قرار دهید تا مادهٔ مورد نظر روی سلول‌ها اثر کند.

۳. پس از پایان زمان انکوباســـیون محیط کشـــت رویـــی را دور بریزید و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی نیم میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول MTT اضافه کنید و دوباره به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور دی اکسیدکربن در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار دهید.

۴. در طـــی انکوباســـیون MTT با آنزیـــم سوکســـینات دهیدروژناز که یکـــی از آنزیم‌های چرخهٔ تنفســـی میتوکندری‌هاست، احیا می‌شود. احیا و شکستگی این حلقه منجر به تولید کریستال‌های آبی فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ به‌راحتی تشخیص داده می‌شوند. میزان رنگ تولیدشـــده با تعداد ســـلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال‌اند (سلول‌های زنده)

رابطه مستقیم دارد.کریستال‌های فورمازان در آب نامحلول بوده و قبل از رنگ سنجی باید با مادهٔ حلالی نظیر دی متیل سولفوکساید محلول شود.

۵. در نهایت جذب نوری محلول به دست‌آمده را می‌توان در طول موج ۵۷۰ نانومتر خواند و به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول‌ها را محاسبه نمود. ارتباط خطی بین تعداد سلول‌ها و جذب نوری محلول نهایی برای هر تیرهٔ سلولی مخصوص آن تیره است. بنابراین، برای بررسی هر نوع سلول باید منحنی استاندارد همان تیرهٔ سلولی را رسم نموده و استفاده کرد.

۶. در مورد سلول‌های معلق باید پس از پایان مراحل کار کشت سلولی پلیت را در دور ۴۰۰ g سانتریفیوژ کرد تا سلول‌های معلق در کف پلیت رسوب کنند. در صورت لزوم می‌توان سلول‌ها را با الکل یا فرمالدئید در کف پلیت ثابت نمود. برای حفظ خصوصیات آنزیمی عمل تثبیت باید در زمان کوتاهی انجام شود. سپس سلول‌ها را با بافر فسفات سرد شستشو دهید و بر روی آن‌ها محیط کشت حاوی MTT بیفزایید. بقیهٔ مراحل شبیه سلول‌های چسبیده است.

۷. برای تهیه منحنی استاندارد، ابتدا یک سوسپانسیون سلولی با غلظت کاملاً مشخص، (یک میلیون سلول در میلی لیتر) از سلول‌های مورد نظر تهیه کرده و پس از بررسی درصد سلول‌های زنده تعداد مشخصی از آن را به صورت تکرارهای چهارتایی (quadruplicate) در پلیت ۹۶ چاهکی کشت سلولی کشت دهید.

۸. پلیت را به انکوباتور دی‌اکسیدکربن منتقل و چند ساعت انکوبه کنید تا سلول‌ها به پلیت بچسبند (در مورد سلول‌های شناور به انکوباسیون نیازی نیست). سپس، برای چاهک‌های فوق تست MTT انجام دهید و با به‌دست آوردن مقادیر جذب نوری در مقابل تعداد سلول منحنی استاندارد مربوطه را رسم کنید.

۳. شمارش تعداد کلونی‌ها Colony – forming assay

این روش عمومیت ندارد و بیشتر برای سلول‌هایی که تشکیل کلونی می‌دهند استفاده می‌شود. درواقع قدرت کلونی‌زایی سلول (یعنی سلول بتواند یک کلونی اطراف خود ایجاد کند) را می‌سنجد.وقتی می‌گویند سلول ۹۰درصد قدرت کلون زایی دارد، یعنی ۹۰درصد سلول زنده است و توانایی تولید کلونی را دارد.

۴. تعیین (LDH Determination): وقتی سلول قدرت بقای خود را از دست می‌دهد، آنزیم‌هایی را آزاد می‌کند که در زمان حیاتش در خود نگه می‌دارد. با اندازه‌گیری این آنزیم‌ها،

که معروف‌ترین آن‌ها لاکتات دهیدروژناز (LDH) است، می‌توان نسبت سلول‌های مرده به زنده را حساب کرد.

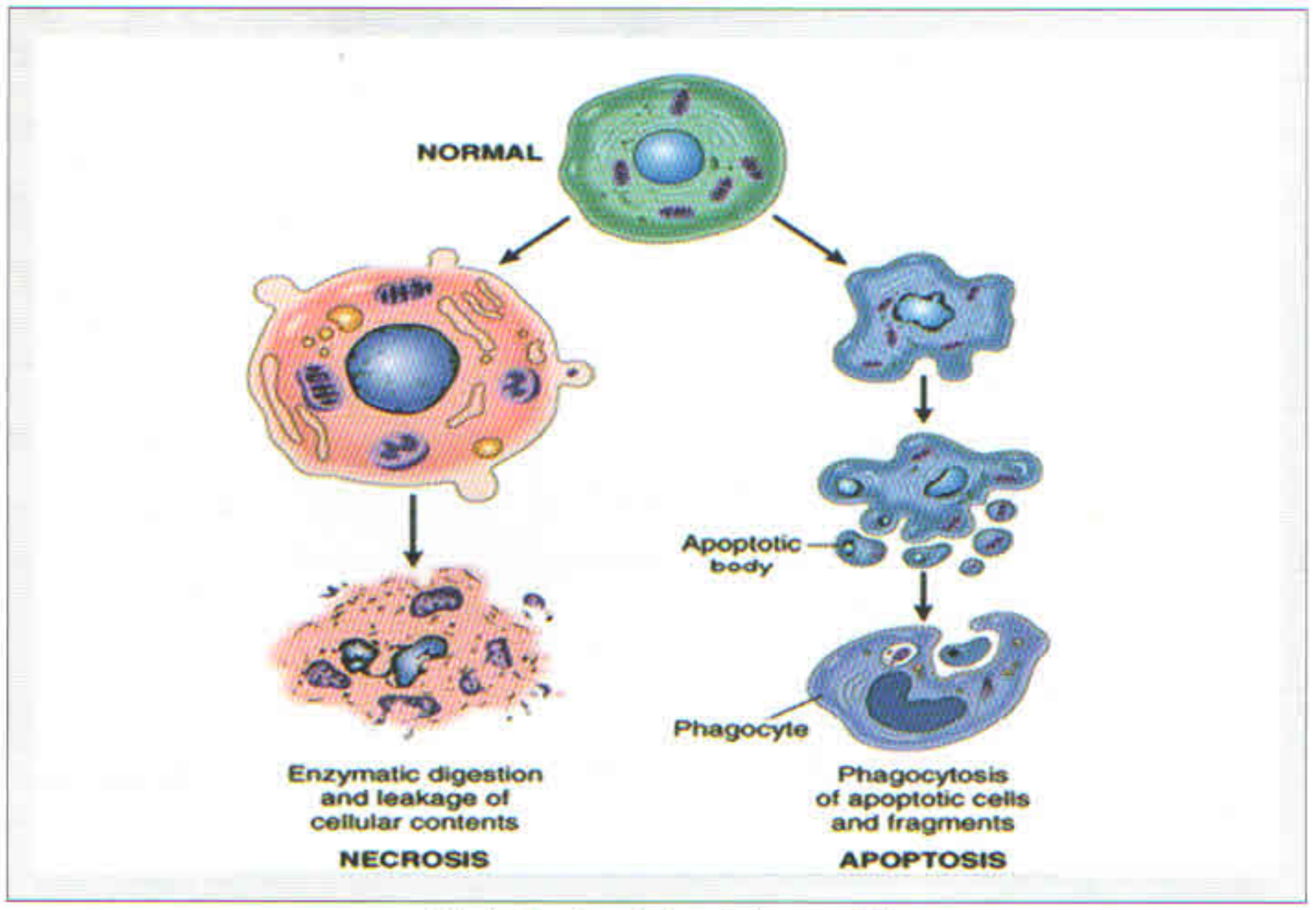
۵. اندازه‌گیری انرژی درون‌سلولی(Intracellular energy charge): با اندازه‌گیری انرژی درون سلول‌ها، بقای آن‌ها را می‌توان تخمین زد. سلولی که بتواند ATP تولید کند زنده است. با مقایسهٔ این مقدار ATP با یک مقدار استاندارد می‌توان قدرت بقای کشت سلول را تخمین زد.

مرگ سلولی (Cell Death)

دو نوع مرگ سلولی وجود دارد:

۱. مرگ سلول در اثر نکروز: طی یک فرآیند پاتولوژیک غشای سلولی صدمه دیده و از بین می‌رود.

۲. مرگ سلول در اثر آپوپتوز: این مرگ که نوعی خودکشی برنامه‌ریزی‌شده سلول است، از راه تعدادی از مسیرهای پیام رسانی درون سلولی روی می‌دهد. مشخصهٔ اصلی آپوپتوز تشکیل لاشه‌های آپوپتوزی(apoptotic bodies) است.



شکل ۲– ۶ – فرایند های آپوپتوز و نکروز سلولی

روش‌های اندازه گیری آپوپتوز:

۱. DNA gel electrophoresis

۲. Fluorescent microscopy

۳. Sub-G1 peak

۴. Annexin V- FITC

۵. TUNEL

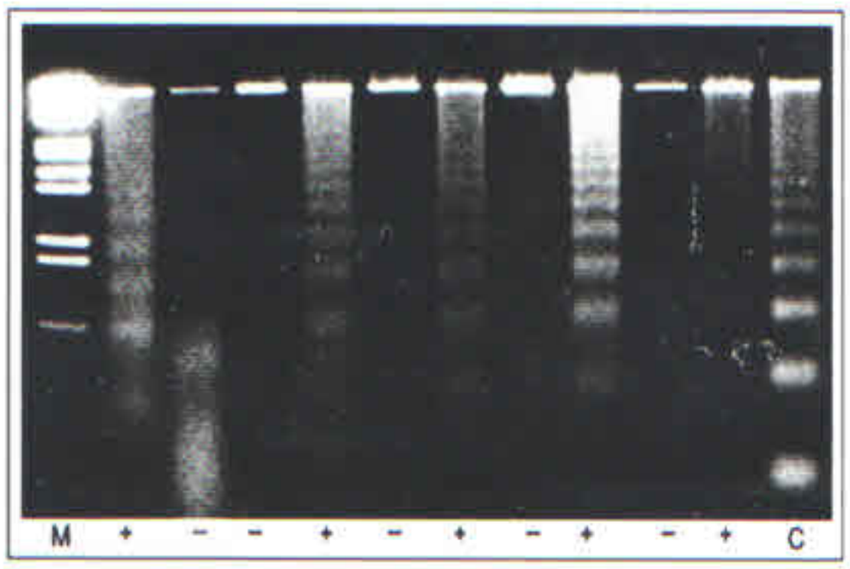
۶. Rhodamine-123 uptake and PI exclusion

۷. Detection of caspase - 3 activiation

۱. روش ژل الکتروفورز (DNA gel electrophoresis):

در آپوپتوز غشا خاصیت نفوذپذیری انتخابی (selectivity) خود را از دست می‌دهد و آنزیم‌ها می‌توانند به داخل هسته وارد شوند. یکی از این آنزیم‌ها، آنزیم‌های اندونوکلئاز است که DNA را می‌شکند (در ساختار DNA هر ۲۰۰ نوکلئوتید یک دانهٔ تسبیح به نام نوکلئوزوم را تشکیل می‌دهد و نوکلئازها در حد فاصل این‌ها، باعث بریدگی نوکلئوزوم‌ها می‌شوند).

اگر DNA یک سلول در حال آپوپتوز جمع‌آوری و روی ژل برده شود، به دلیل عمل اندونوکلئاز قطعاتی با ضریب ۲۰۰ روی ژل به‌صورت نردبانی(Ladder) دیده می‌شود. هرچه زمان بیشتری سپری شود، میزان قطعات کوچکتر افزایش می‌یابد.این امر نشان‌دهندهٔ عملکرد طولانی مدت اندونکلئازها است.

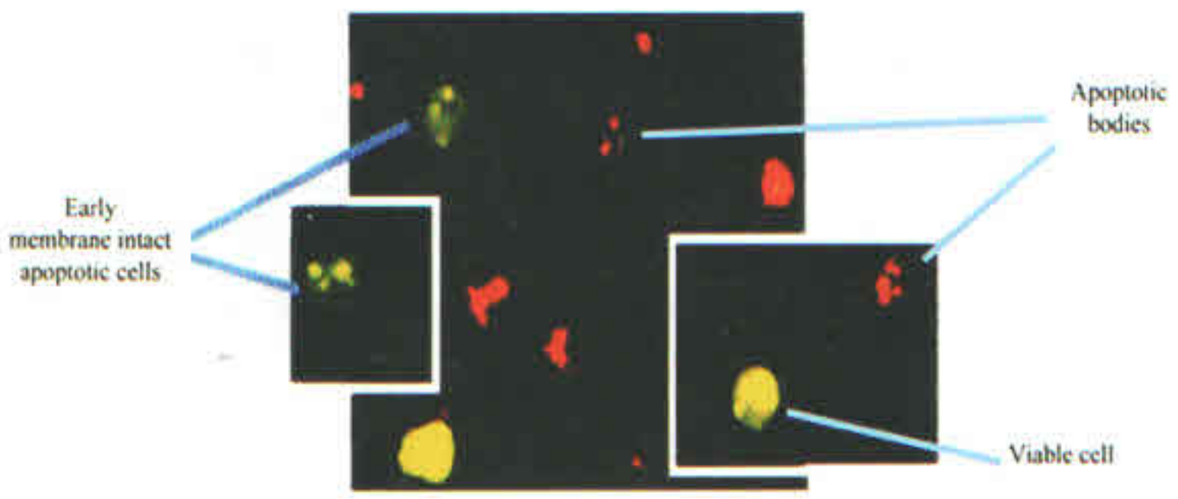


شکل ۲-۷ - ژل الکتروفورز برای DNA سلول‌های آپوپتوتیک شده با Camptothecin.M اندازهٔ مارکر، سلول‌های کنترل بدون Camptothecin ، + سلول‌های مواجهه شده با Camptothecin و C سلول‌های کنترل مثبت

۲. روش میکروسکوپی فلورسانس (Fluorescent microscopy):

غشای سلول سالم اجازهٔ ورود بعضی از رنگ‌ها (پروپیدیوم آیداید یاPI) را به سلول نمی‌دهد، اما رنگ‌هایی مثل آکریدین نارنجی Acridine Orange می‌توانند از داخل غشـا رد شـده و بـه هسـته وارد شـوند. این رنگ‌ها در DNA نفـوذ می‌کنند و بین بازهـای DNA قرار می‌گیرند(Stacking) و نور فلورسانس را منعکس می‌کنند.

آپوپتوز دو مرحله دارد. در مراحل اولیه هنوز غشـا خاصیت نفوذپذیری انتخابیش را دارد و اجازهٔ ورود PI را به سلول نمی‌دهد، در حالی‌که آکریدین نارنجی وارد هسته شده و می‌تواند جریان شـروع تکه‌تکه‌شدن DNA سـلول در حال آپوپتوز را نشان دهد. در مراحل انتهایی آپوپتوز، غشـا خاصیت نفوذپذیری خود را از دسـت می‌دهد. در نتیجه،سلول به یک سلول نکروتیک تبدیل می‌شـود(این سـلول غشـا دارد، اما خاصیت نفوذپذیری انتخابی ندارد) و به‌راحتی با PI رنگ می‌شود(شکل ۲-۸).



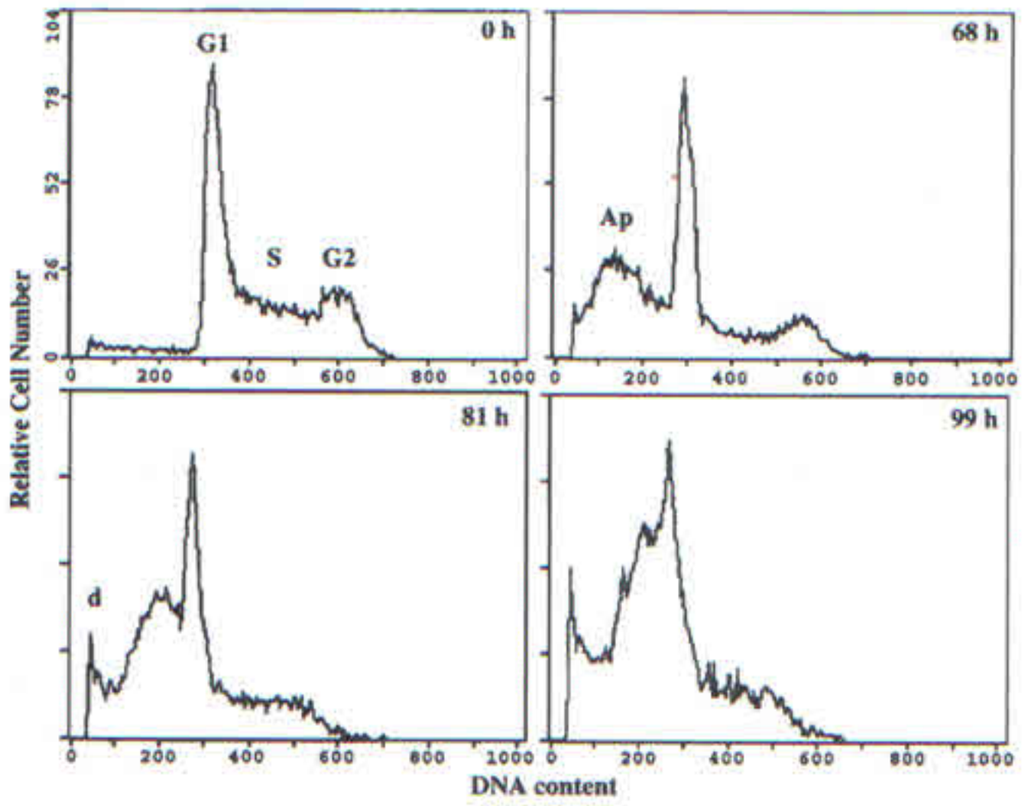
شکل ۲-۸ - آنالیز میکروسکوپ فلورسانس از سلول‌های هیبریدوما تحت تأثیر رنگ‌های حیاتی آکریدین نارنجی و پروپیدیوم آیداد

سلول‌های قرمز، به رنگ PIنفوذپذیرند. این نفوذپذیری نشان‌دهندهٔ مراحل انتهایی آپوپتوز اسـت. سـلول‌های نارنجی، به رنگ آکریدین نارنجی نفوذپذیرند که این نفوذپذیری نشـان دهندهٔ سلول‌های زنده یا مراحل ابتدایی آپوپتوز است.

۳. روش peak Sub-G۱:

هنگام آپوپتوز اندونوکلئاز اثر می‌کند و DNA را می‌شـکند و تکه هایDNA از غشا بیرون می‌آیند. بنابراین، میزان DNA کم می‌شود.با روش فلوسیتومتری می‌توان تعداد سلول‌هایی را که DNA کمتری دارند مشـخص کرد. فلوسیتومتری تعداد و شدت وقایع فلورسانس را

اندازه‌گیری می‌کند و به‌صورت کلی نشان می‌دهد.



شکل ۲-۹ – توزیع DNAسلول‌های هیبریدومای در حال آپوپتوز در کشت سلولی. سلول‌های آپوپتوتیک (AP) سطح پایینی از G Peak دارند که پس از ۸۱ ساعت بدترین حالت را خواهند داشت

سیکل سلولی شامل میتوز و اینترفاز(G1 ، S ، G2) است. اگر در منحنی که فلوسیتومتری نشان می‌دهد، پیک(Peak) تشکیل‌شده در فاز G1 تغییر یافته باشد، نشان‌دهندهٔ کم شدن DNA در داخل سلول ودر نتیجه آپوپتوز است.

۴. استفاده ازAnnexin V-FITC

آنکسین- پنج در واقع لیگاند فسفاتیدیل سرین است، که به‌طور طبیعی در سمت سیتوپلاسمی لایهٔ غشا قرار دارد. در آپوپتوز غشای میتوکندری در مراحل اولیه تخریب می‌شود. بدین صورت که شارژ غشا از بین رفته و نفوذپذیری خود را از دست می‌دهد. در نتیجه، باعث آزادسازی سیتوکروم C می‌شود که خاصیت فلیپازی فسفولیپیدها را دارد یعنی می‌تواند فسفولیپیدها را در عرض غشا جابجا کند. بنابراین، فسفاتیدیل سرین از لایه سیتوپلاسمی غشا وارد لایه خارجی می‌شود.

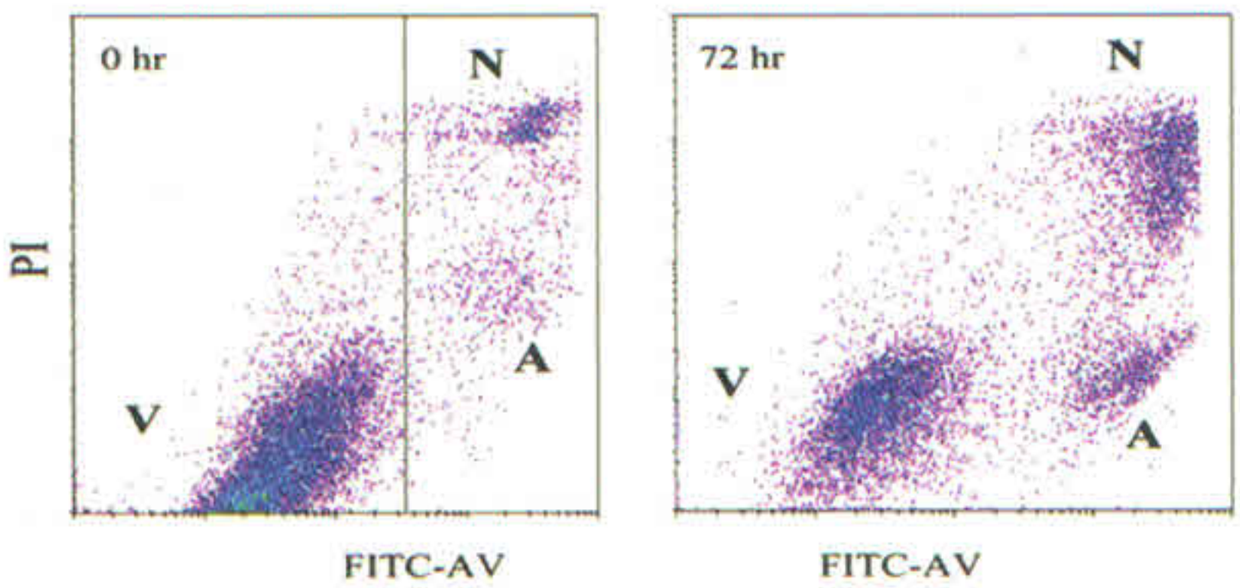
در این روش از آنکسین- پنج کونژوگه با رنگ فلورسانس FITC استفاده می‌شود. (Annexin V- FITC) در صورت القای آپوپتوز، بعد از ۷۲ ساعت میزان سلول‌های آپوپتوز شده زیاد می‌شود. درنتیجه، Annexin V- FITC به سلول‌های آپوپتوتیک متصل شده و به

Annexin V-FITC and PI negative → viable
Annexin V-FITC positive and PI negative → early apoptosis
Annexin V-FITC and PI positive → end stage apoptosis and death

Biotin -> also known as Vitamin H or coenzyme R, is a water soluble
It is made from two precursors, alanine and pimeloyl-CoA via 3
enzyme.

رنگ سبز در می‌آید. این سلول‌ها با فلوسیتومتری و میکروسکوپ فلورسانس تشخیص‌پذیر است. برای شناسایی مراحل آپوپتوز و تفکیک نکروز از آپوپتوز هم‌زمان از رنگ PI استفاده می‌شود. همان‌طورکه قبلاً اشاره شد، رنگ PI در صورت از بین رفتن غشای سلول، وارد سلول شده و به رنگ قرمز در فلوسیتومتری و با میکروسکوپ فلورسانس قابل ردیابی است. اگر در نمودار فلوسایتومتری سلول‌ها به FITC پاسخ مثبت دهند ولی به رنگ PI پاسخی ندهند، سلول در مراحل اولیهٔ آپوپتوز است.

اگر با هر دو رنگ FITC و PI رنگ شوند سلول‌ها در مراحل آخر آپوپتوز هستند. چون سلول در هر دو حالت نکروز و مراحل آخر آپوپتوز خاصیت نفوذپذیری انتخابی خود را از دست داده‌است با کمک این روش نمی‌توان این دو پدیده را از هم تفکیک کرد.



شکل ۲-۱۰- آنالیز بیان فسفاتیدیل سرین و اینتگریتی غشای پلاسمایی در کشت سلول‌های هیبریدوما. سلول‌ها با دو رنگ فلورسنت ایزوتیوسیانید-آنکسین V(V - FITC) و پروپیدیوم آیدایید(PI) نشان‌دار شده‌اند و مراحل اولیهٔ آپوپتوز و نکروز را با فلوسیتومتری آنالیز می‌کنند. V نشان دهندهٔ سلول‌های زنده، A نشان‌دهندهٔ سلول‌ها در مراحل ابتدایی آپوپتوز و N نشان‌دهندهٔ سلول‌ها در مرحلهٔ انتهایی آپوپتوز و نیز سلول‌های نکروز شده است.

۵. روش TUNEL:

این روش بیشتر در جنین شناسی استفاده می‌شود. هنگام آپوپتوز DNAی قطعه قطعه و درنتیجه انتهاهای 3′-OH زیادی تولید می‌شود. در این روش تشخیصی از نوکلئوتیدهایی که با بیوتین کونژوگه شده‌اند، استفاده می‌شود. در ابتدا Digoxigenin کونژوگه شده با بیوتین به محیط کشت اضافه می‌شود و DNA پلی‌مراز که در اینجا TdT است، آن‌ها را به جای تیمیدین در داخل DNA قرار می‌دهد. بنابراین، Digoxigenin با آنزیم TdT (تری داکسی نوکلئوتیدیل ترمینال ترانسفراز) که بدون استفاده از الگو نوکلئوتیدهای محیط را

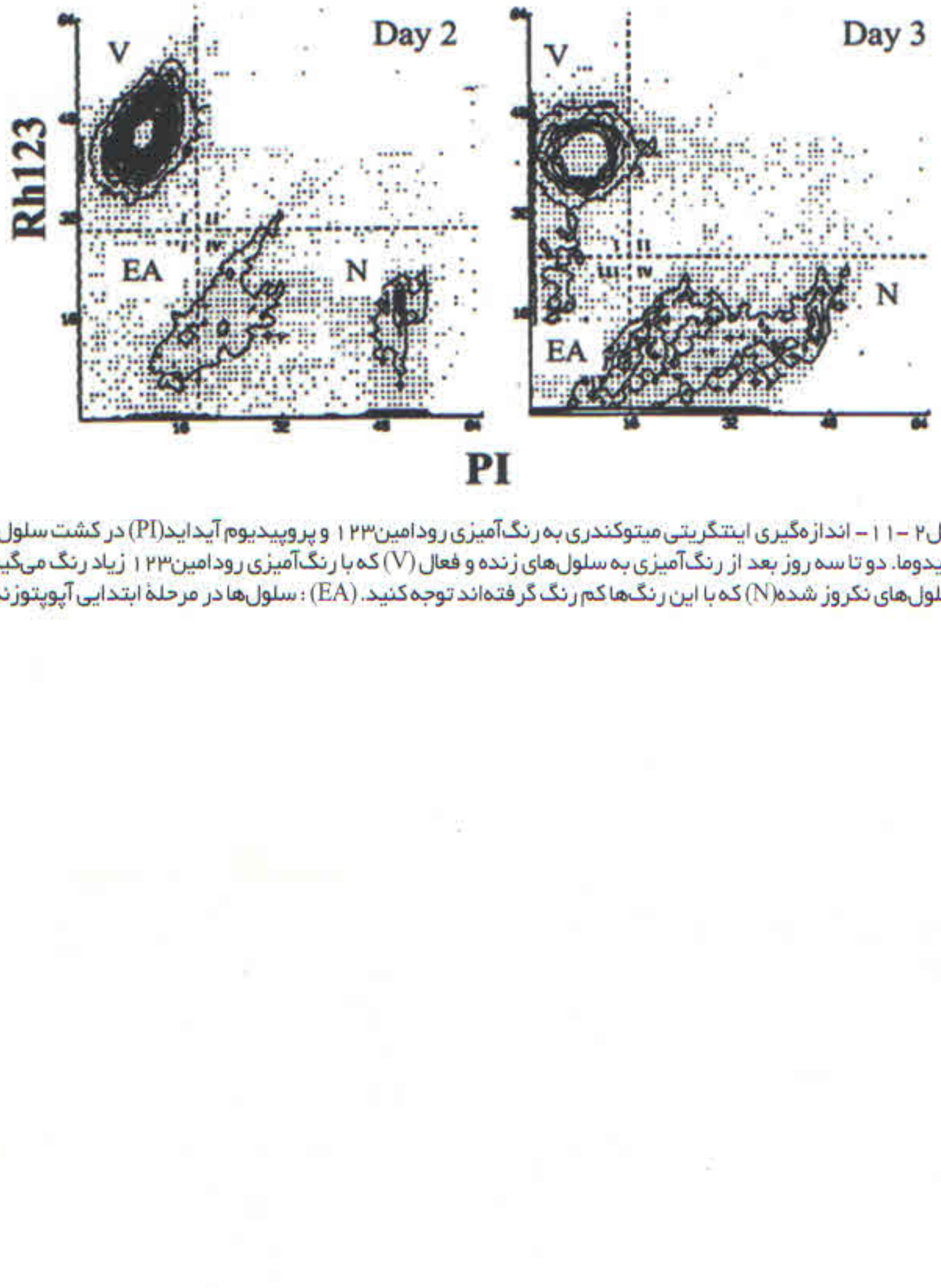
بـــه انتهـــای ۳.´OH آزاد اضافه می‌کند، به DNA وارد می‌شـــود. بنابراین، با توجه به وفور انتهاهای ۳.´OH آزاد در ســـلول‌های آپوپتوتیک، ســـلول‌های آپوپتوز شـــده به طور زیاد با Digoxigenin نشان‌دار شده و با استفاده از آنتی بادی‌های ثانویهٔ نشان‌دار زیر میکروسکوپ فلورسانس شناسایی می‌شوند.

۶. استفاده از رودامین ۱۲۳ و PI exclusion (پروپیدیوم آیداید):

اولین رویداد در آپوپتوز از بین رفتن شـــارژ غشـــا میتوکندری است. یعنی خاصیت انتقالی و نفوذپذیری اختصاصی غشـــای میتوکندری از بین می‌رود و سوراخ‌های بسیار بزرگی در غشا تولید می‌شود که مولکول‌های بزرگ می‌توانند از آن عبور کنند.

در حالت طبیعی رودامین ۱۲۳ وارد میتوکندری می‌شـــود و به دلیل وجود غشـــای فعال و باردار نمی‌تواند از آن خارج شـــود و ســـلول با این ماده رنگ می‌شـــود. در سلول‌های نکروز و یا مراحل انتهایـــی آپوپتوز (Late apoptosis) میتوکندری قادر به نگه‌داری رودامین ۱۲۳ نیست و از طرفی با PI رنگ می‌شود.

در مراحل اولیهٔ آپوپتوز سلول‌ها به مقدار کم با رودامین ۱۲۳ رنگ می‌شوند، ولی با PI رنگ نمی‌گیرند. هرچه آپوپتوز پیش برود، میزان پاسخ‌گویی سلول‌ها به رودامین کم می‌شود.

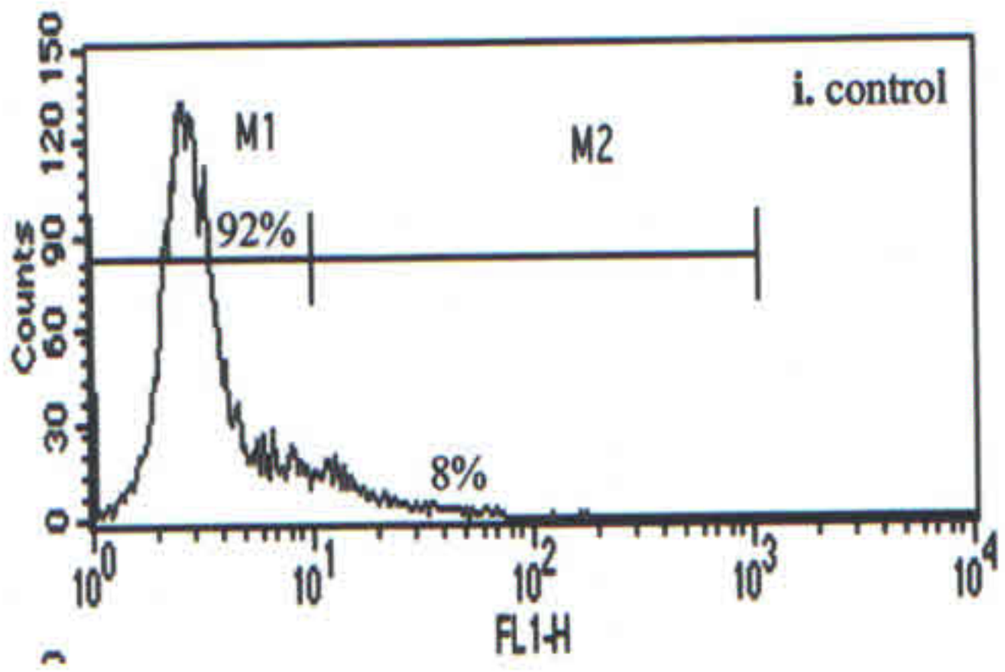


شکل۲ – ۱۱ – اندازه‌گیری اینتگریتی میتوکندری به رنگ‌آمیزی رودامین۱۲۳ و پروپیدیوم آیداید(PI) در کشت سلول‌های هیبریدوما. دو تا سه روز بعد از رنگ‌آمیزی به سلول‌های زنده و فعال (V) که با رنگ‌آمیزی رودامین۱۲۳ زیاد رنگ می‌گیرند و سلول‌های نکروز شده(N) که با این رنگ‌ها کم رنگ گرفته‌اند توجه کنید. (EA) : سلول‌ها در مرحلهٔ ابتدایی آپوپتوزند.

۷. بررسی فعالیت کاسپاز ۳ (سیتئین آسپارتات سرین پروتئاز ۳):

در این روش از آنتی بادی پروتئین کاسپاز ۳ استفاده می‌شود.کاسپاز آبشاری از پروتئازها را در سلول فعال می‌کند. کاسپاز ۸ شروع‌کنندهٔ فرایند پروتئازی و کاسپاز ۳ ، آخرین کاسپاز از نظر فعال‌کنندگی و کاسپاز عملکردی (فانکشنال) است.

در این روش با اســتفاده از آنتی‌کاســپاز ۳ (کاسپاز فانکشنال) سلول‌های آپوپتوز را نشان‌دار کرده و سپس فلوسیتومتری انجام می‌شود و تعداد سلول‌های نشان‌دار شمرده می‌شوند. اگر سلول‌ها طبیعی باشند۹۲درصد آن‌ها با آنتی بادی نشان‌دار نشده و سالم‌اند. (کاسپاز ۳ در ســلول‌های طبیعی وجود دارد، اما فانکشــنال نیست و با آنتی‌بادی شناسایی نمی‌گردد. این کاسپاز غیرفعال با کاسپازهای ۷ و ۶ فعال می‌شود.)



شکل ۲-۱۲ - میزان فعالیت کاسپاز ۳ با استفاده از آنتی‌بادی کاسپاز3Phycoerythrin یا PE . سمت راست سلول‌هایی که در معرض Compothecin قرار نگرفته‌اند (کنترل) و سمت چپ سلول‌هایی که در معرض Compothecin قرار گرفته‌اند. القای آپوپتوز در سلول‌های گروه دوم در مقایسه با گروه اول (کنترل) ۳۰درصد است.
(رنگ PIکارسینوژن است. به‌طورکلی هنگام استفاده از همه فلونورکروم‌های باندشونده با DNA باید از دستکش استفاده کرد.)