شمارش و ارزیابی قدرت بقای سلولی(viability)

برای انجام هر آزمایش کشت سلولی می‌بایست از تعداد سلول‌ها آگاه باشیم. روش‌های مختلفی برای شمارش سلول وجود دارد.

سلول‌ها به دو روش مستقیم و غیر مستقیم مورد شمارش قرار می‌گیرند:

الف) روش مستقیم شمارش سلولی شامل:

۱. شمارش سلول با لام نئوبار (هموسیتومتر)

۲. شمارش هستهٔ سلول با هموسیتومتر

۳. شمارش هسته در حامل‌های کوچک دارای منافذ ریز (Microprous carriors)

۴. شمارش سلول با استفاده از دستگاه پارتیکل کانتر (Particle counter)

۵. تعیین غلظت تیرهٔ سلولی توسط مانیتور کردن تودهٔ زیستی (biomass monitoring)

۶. شمارش سلول توسط پروب فلورسانس

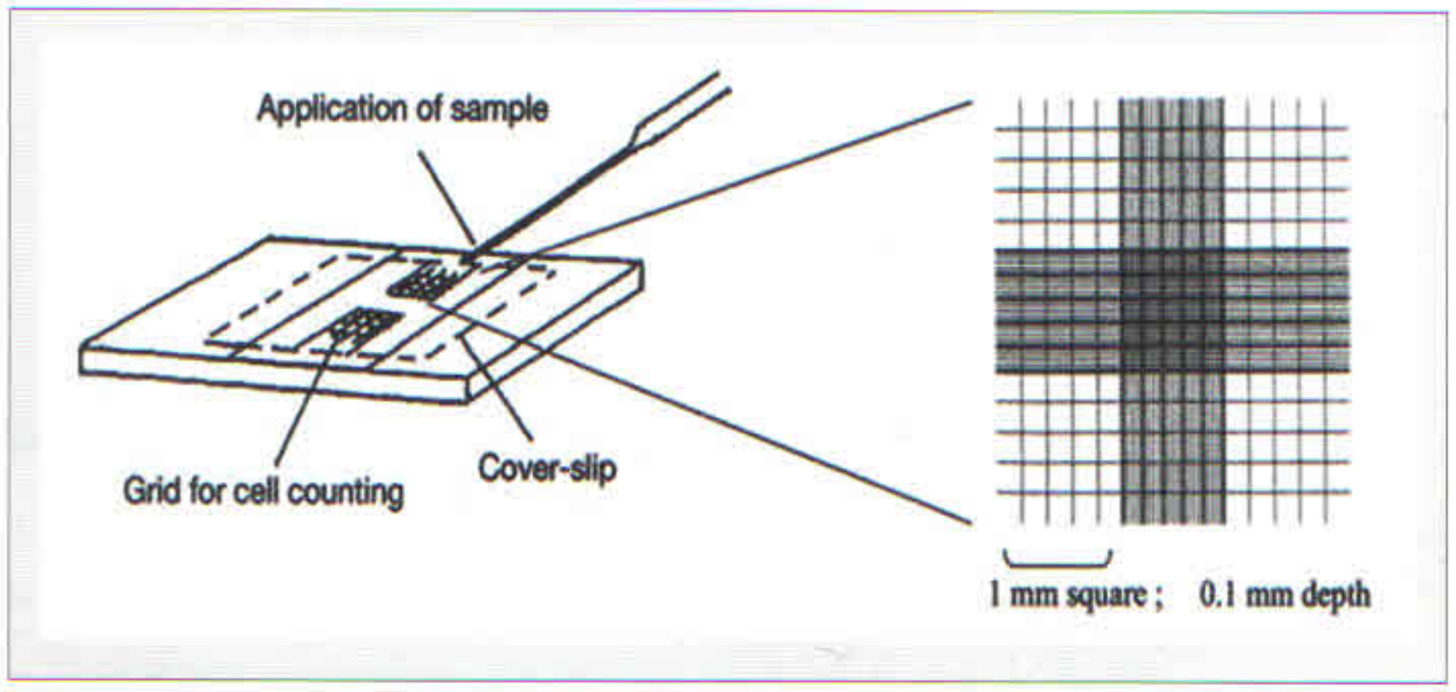
۷. شمارش سلول با تحلیل‌کردن تصویر کشت سلولی (Image analysis)

۱. شمارش سلول توسط هموسیتومتر :

در آزمایشگاه‌های کوچک برای شمارش سلول از لام‌های هموسیتومتر نئوبار استفاده می‌شود. این نوع لام در اصل برای شمارش گلبول‌های قرمز و سفید طراحی شده است. این لام دارای

خط کشـــی‌هایی با فواصل منظم و نیز دیواره‌های جانبی بلندتری نســـبت به اتاقک شمارش (Chamber) می‌باشد(شـــکل ۲ـ۱). هنگام پر کردن اتاقک شمارش(Chamber)، سلول‌ها بطور تصادفی در اتاقک مذکور پخش می‌شوند، بنابراین هر چه تعداد سلول‌های شمرده‌شده بیشتر باشد،دقت و صحت شمارش بیشتر خواهد بود.

برای رقیق کردن سلول‌ها در هنگام شمارش از محلول تریپان بلو۰/۴ درصد استفاده می‌شود. که به وسیلهٔ آن سلول‌های مرده آبی می‌شوند و می‌توان آن‌ها را از سلول‌های زنده که رنگ نمی‌گیرند به راحتی تشخیص داد.



شکل ۲ – ۱ – لام نئوبار (هموسیتومر)

مراحل شمارش سلولی توسط هموسیتومتر:

۱. تیره‌های سلولی چسبیده و نیمه‌چسبیده را به کمک تریپسین یا EDTA (محلول۰/۲۵ درصد تریپســـین و۰/۰۲درصد EDTAدر بافر PBS ایزوتونیک با pH=۷) از کف فلاســـک کشت سلول آزادکرده و در حجم کمی از محیط کشت به حالت سوسپانسیون درآورید.

۲. تیره‌های سلولی شناور وسلول‌هایی راکه به صورت تودهٔ سلولی رشد می کنند سانتریفیوژ کرده و در حجم اندکی از محیط کشت به صورت سوسپانسیون درآورید.

۳. سوسپانسیون سلولی را چندبار پیپتاژ کنید تا سلول‌ها بصورت یکنواخت و مجزا از هم درآیند.

۴. تحت شرایط اســـتریل ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی برداشته و هم‌حجم آن محلول تریپان بلو ۰/۴ درصد در بافر ایزوتونیک با pH =۷ اضافه و به آرامی پیپتاژ کنید. بدین ترتیب سلول‌ها ۲ بار رقیق خواهند شد.

۵. لام نئوبـار را تمیـز کنید و ۲ تا ۳ میکرولیتر آب مقطـر روی کناره‌های برآمدهٔ آن ریخته و یک لامل سـنگی روی آن قرار دهید. لامل را به آرامی روی لام فشـار دهید و چندبار به عقب و جلو حرکت دهید تا آب مقطر از کناره‌ها خارج شـده و لامل روی لام ثابت شود.

۶. سوسپانسـیون سـلولی را با تریپان بلو مخلوط کرده و هر دو طرف لام نئوبار را با آن پر کنید. حجم اتاقک زیر لامل در هر طرف حدود ۱۰ الی ۱۲میکرولیتر اسـت. برداشتن حجم بیش از این مقدار باعث افزایش حجم زیر لامل و در نهایت باعث افزایش خطا در شـمارش سلول‌ها می‌شود.

۷. چند لحظه صبر کنید تا همهٔ سـلول‌ها به طور یکسـان در کف لام ته‌نشین و بی‌حرکت شوند. سپس لام را با میکروسکوپ نوری و با درشت نمایی ۲۰ بررسی کنید.

۸. تعداد سـلول‌های زنده (سلول‌های شـفاف یا رنگ نگرفته) و غیر زنده(سلول‌های آبی) را شمارش کنید.

۹. در صورت پخش یکنواخت سلول‌ها بر روی لام، حداقل باید سلول‌ها در یکی از چهار مربع ۱۶ خانه‌ای مخصوص شمارش گلبول‌های سفید شمرده شوند.

۱۰. حجـم یک مربـع ۱۶ خانه‌ای ۰/۱ میلی‌متر مکعب می‌باشـد. لذا اگـر میانگین تعداد سـلول های موجود در یک مربع ۱۶ خانه‌ای را در عکس ضریب رقت و عدد ۱۰۰۰۰ ضرب کنید،تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی به دست می‌آید.

۱۰۰۰۰× عکـس ضریب رقت × میانگین تعداد سـلول‌ها در یک مربع ۱۶ خانه‌ای = تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی

توجه: برای افزایش دقت کار بهتر است حداقل ۱۰۰ سلول شمرده شود. به تعداد مربع‌هایی که شـمرده اید تا به ۱۰۰ سلول برسـید توجه کنید. عکس ضریب رقت مثلا عدد ۲، نشان دهندهٔ حجم محلول رنگ تریپان بلو مورد استفاده می‌باشد.

۱۱. برای محاسبه تعداد کل سلول‌های سوسپانسیون، عدد مذکور را در حجم سوسپانسیون (به میلی لیتر) ضرب کنید.

حجم سوسپانسـیون × تعداد سـلول‌ها در یک میلی متر سوسپانسیون سلولی = تعداد کل سلول‌های سوسپانسیون

توجه: در شرایط ایده آل بیش از ۹۵درصد سلول‌ها باید زنده باشند.

۱۲. برای محاسبه درصد سلول‌های زنده (درصد بقا)، تعداد کل سلول‌های زنده در هر میلی‌متر مکعب را در عدد صد ضرب نموده و عدد به دست آمده را بر تعداد کل سلول‌ها تقسیم کنید.

۱۰۰×(کل سلول های شمارش شده/ تعداد سلول زنده) =درصد بقای سلولی (Viabilityدرصد)

به طور مثال اگر تعداد سلول‌های زنده ۲۰۰ باشد، نسبت به ۳۰۰ سلول موجود، درصد بقای سلول‌ها ۶۷ درصد خواهد بود.

نکات کلیدی

۱. هنگام شمارش ابتدا تعداد کل سلول‌ها را بدست آورده (یعنی هم سلول‌های بی رنگ و هم آبی شمارش شوند) سپس تعداد سلول‌های رنگ گرفته یا نگرفته محاسبه شوند.

۲. هر یک از دو اتاقک شمارش از ۵ خانه مربعی شکل بزرگ تشکیل شده‌است. سطح هر یک از این خانه‌های مربعی شکل یک میلی‌متر مربع است.

۳. مربع‌های کناری هرکدام از ۱۶ مربع کوچک‌تر تشکیل شده و در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به نام نواحی شمارش گلبول‌های سفید معروف هستند.

۴. مربع مرکزی از ۲۵ مربع کوچک‌تر تشکیل شده و در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به نام ناحیه شمارش گلبول‌های قرمز معروف است.

توجه: ارتفاع اتاقک شمارش، یعنی فاصلهٔ بین لام و لامل ۰/۱ میلی‌متر است. بنابراین، حجم هر یک از این مربع‌های ۱۶ خانه‌ای ۰/۱ میلی‌متر مکعب است.

توجه: عوامل زیادی می‌توانند باعث خطا در شمارش سلولی شوند که عبارتند از:

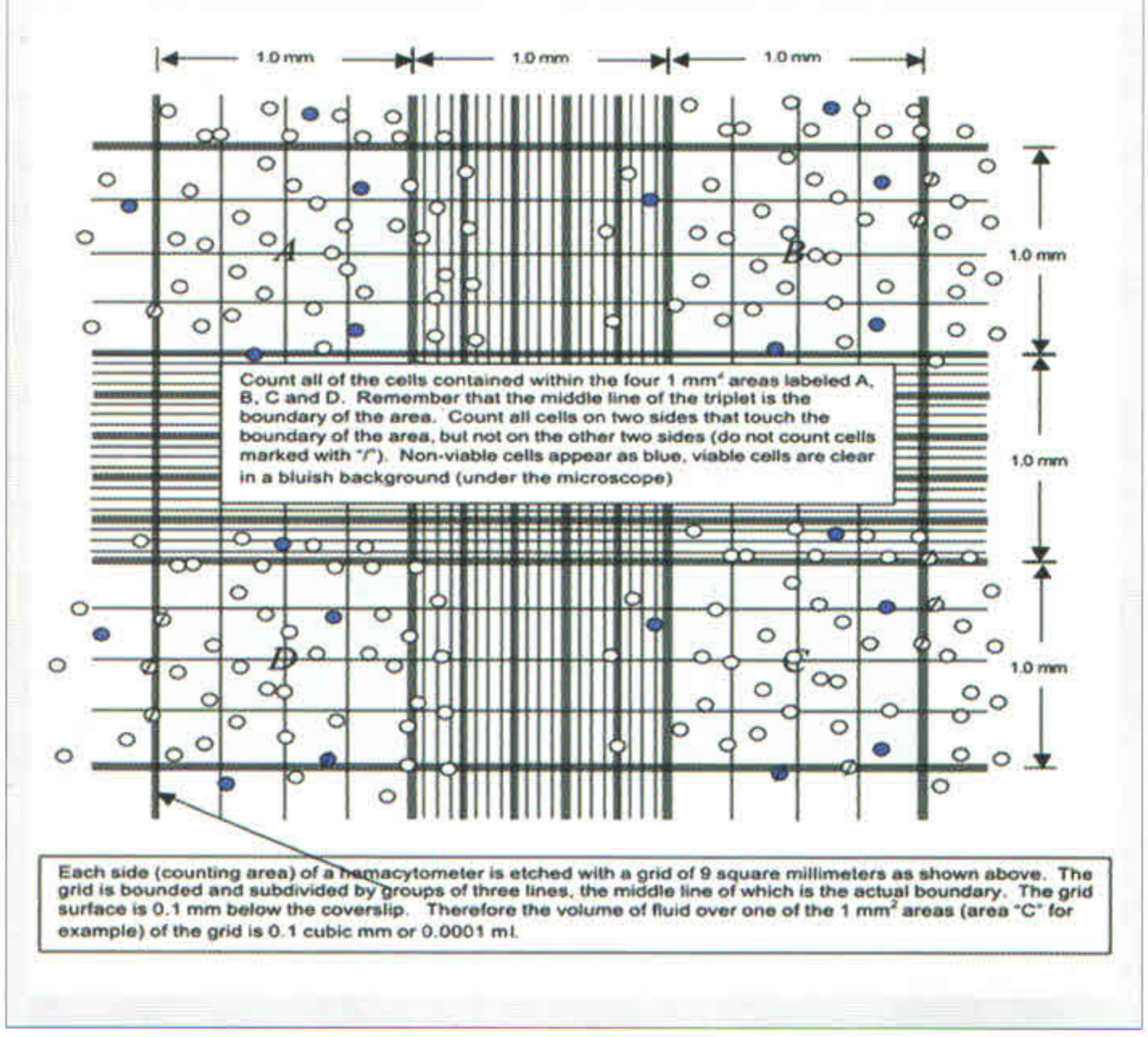
۱. ورود حباب هوا به اتاقک شمارش سلول هنگام پر کردن آن.

۲. وجود سلول‌های قطعه قطعه شده در سوسپانسیون سلولی.

۳. پر کردن بیش از حد اتاقک، به طوری‌که سوسپانسیون سلولی وارد کانال‌های کناری اتاقک شده یا وارد اتاقک مقابل شود.

۴. تعلل در ریختن سوسپانسیون، به طوری‌که سلول‌ها به صورت یکنواخت پخش نشوند. در این حالت، سلول‌ها به علت سنگین‌تر بودن رفته رفته در حین عبور روی لام رسوب

می‌کنند، بنابراین انتهای اتاقک، سلول کمتری خواهد داشت.
شمارش سلول بر روی لام نئوبار با میکروسکوپ به صورت دستی انجام می‌گیرد. اما روش راحت‌تر وگران‌تر اســتفاده از دستگاه شمارشگر ســلول (Cell counter) است که بیشتر در بانک‌های ســلولی، که تعداد سلول‌های زیادی می‌بایست شمارش شوند، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

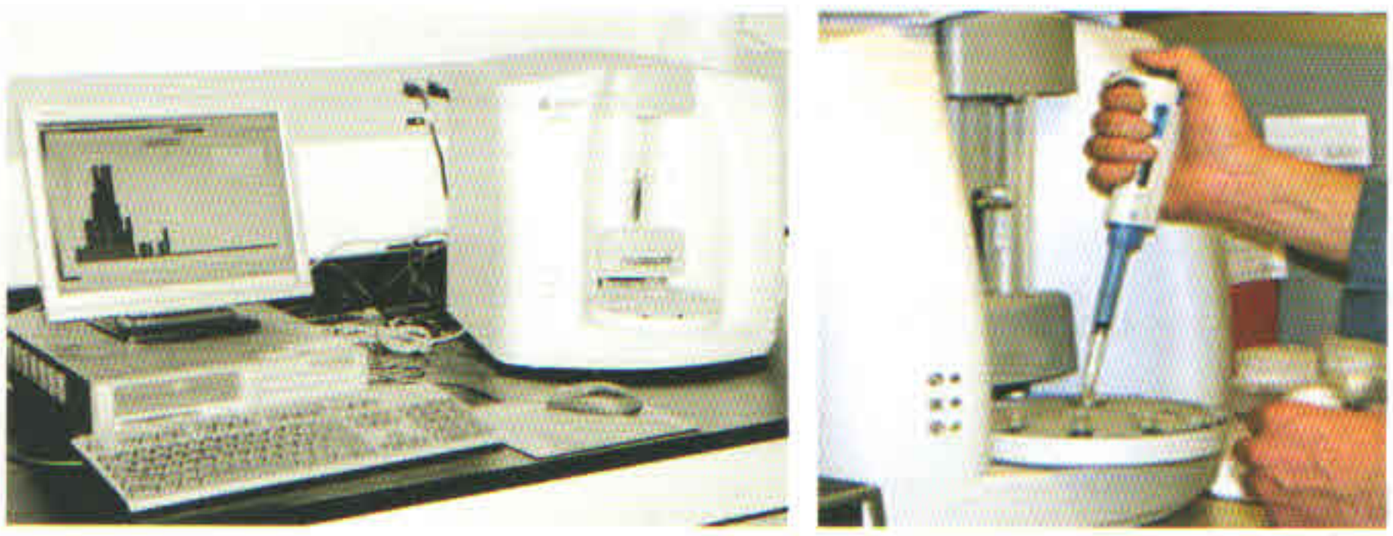


شکل ۲-۲- شناسایی سلول های زنده بر روی لام نئوبار با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو. سلول های زنده (دایره های سفید) و سلول های غیر زنده (دایره های تیره)

۲. شمارش هستهٔ سلول با استفاده از هموسیتومتر: در این روش سلول را بوسیله اسید ســیتریک لیز کرده، سپس با کریستال ویوله رنگ می‌کنند. هســتهٔ ارغوانی را می‌توان زیر میکروسکوپ مشاهده کرده و شمارش نمود.

۳. میکروکریرها (microcarrier): سطوحی با خلل و فرج زیادند که سلول‌ها داخل آن‌ها رشد کرده و نمی‌توان به طور مستقیم سلول‌ها را شمارش کرد. میکروکریرها بیشتر در مورد کشت انبوه به وسیلهٔ بیوراکتورها کاربرد دارند. برای شمارش سلول‌ها توسط میکروکریرها باید با استفاده از سرنگ، چندین بار آن‌ها را پیپتاژ کرده تا سلول کاملا لیز و هستهٔ آن آزاد شود. سپس، هسته‌ها با استفاده از کریستال ویوله رنگ شده و شمارش می‌شوند.

۴. پارتیکل کانتر (Particle counter): گاهی تعداد سلول‌هایی که باید شمارش شوند خیلی زیادند. در چنین مواردی برای شمارش کل سلول‌ها، از دستگاه‌های شمارشگر سلولی(شکل ۲-۳) استفاده می‌شود. شمارش سلول با دستگاه پارتیکل کانتر آسان‌تر است. این شمارش به دو صورت شمارش‌گر Coulter و CASY انجام می‌شود. مواقعی که سلول‌ها تحت تاثیر هورمون‌ها، فاکتورهای رشد و یا عوامل سیتوتوکسیک(داروهای ضد سرطان) قرار می‌گیرند از دستگاه‌های شمارشگر سلولی کولتر(Coulter) استفاده می‌شود. پارتیکل کانتر دارای لوله‌ای به قطر ۷۰میکرومتر است که سلول از داخل لوله رد می‌شود. دو الکترود یکی در خارج و یکی در داخل لوله قرار گرفته و جریان بین این دو برقرار می‌شود. با عبور سلول از داخل آن جریان بین این دو لوله قطع و یک شماره ثبت می‌شود. این دستگاه کلاهک‌هایی (Cap) دارد که سوسپانسیون سلولی را در آن می‌ریزند. رنگ تریپان بلو در خود دستگاه وجود دارد. روش کار این دستگاه چنین است که مقداری از سلول همراه با کمی رنگ تریپان بلو مخلوط شده و درصد بقای سلول را همراه با منحنی به آزمایشگر می‌دهد. یکی از مشکلاتی که هنگام کار با این دستگاه ممکن است با آن مواجه شویم گرفتگی مکرر لوله‌هاست که برای رفع آن می‌بایست سوسپانسیون سلولی یکدست و هموژن باشد.



شکل ۲-۳- دستگاه شمارشگر سلولی

در مورد تکه‌ها یا خرده‌های سلولی (debris) بسیار زیاد، از فیلتر یا مش استفاده می‌شود.
توجه: خطای شمارش هنگام کار با هموسیتومتر ۲۰ درصد است و با استفاده از Particle Counter خطای شمارش سلول به ۵ درصد کاهش می‌یابد.

۵. ردیابی توده سلولی(Biomass Monitroing): این روش درشمارش سلول با بیوراکتور به کار می‌رود که در آن از پروبی استفاده می‌شود که امواج رادیویی تولید می‌کند. مقدار امواج جذب شدهٔ سلول را می‌توان محاسبه کرد. این مقدار با میزان تودهٔ سلولی برابر است.

۶. استفاده از پروب فلورسانس: در این روش، به‌دنبال تحریک سلول با اشعهٔ ماورای بنفش (uv) پروب فلورسنس با احیای NAD (نیکوتین آمید آدنوزین) در سلول نور تولید می‌کند. به این ترتیب، تعداد سلول در محیط کشت با استفاده از نمودار استاندارد محاسبه می‌شود.

۷. آنالیز تصویر (Image analysis):

با استفاده از دوربین(Charge-Coupled Device) CCD از کشت سلول عکس گرفته می‌شود و با انتقال داده‌ها به نرم افزار مناسب بر روی کامپیوتر، اطلاعاتی از قبیل تعداد، اندازه و شکل هر سلول را می‌توان ارزیابی کرد.

ب) روش‌های غیر مستقیم شمارش سلولی:

شناسایی تعداد سلول با استفاده از شواهد غیر مستقیم به سه روش زیر انجام می‌گیرد:

۱. تعیین میزان پروتئین سلول(Protein Determination)
۲. تعیین میزانDNA سلول(DNA Determination)
۳. تعیین میزان گلوکز مصرفی(Glucose determination)

۱. تعیین میزان پروتئین سلول: پروتئین سلول مقیاسی از زیست توده (کل مواد سلولی) محسوب می‌شود. معمولاً محتوای پروتئین یک سلول پستاندار pg/cell ۵۰۰ -۱۰۰ است. این اندازه‌گیری‌ها همچنین در تعیین فعالیت آنزیم خاص مفید است،که معمولاً بیان‌کننده حداکثر سرعت واکنش اندازه‌گیری شدهٔ یک آنزیم به کل پروتئین موجود در سلول است. رایج‌ترین روش آزمایش رنگ‌سنجی‌ها روش لوری (Lowry) و برادفورد (Bradford) است. روش برادفورد به دلیل سرعت، حساسیت و دخالت ناچیز دیگر اجزای سلول بر روش لوری برتری دارد. در این روش به سلول‌های لیزشده معرف کوماسی بلو اضافه می‌شود و در عرض ۱۰ دقیقه رنگ آبی ایجاد می‌گردد. می‌توان توسط یک رنگ‌سنج یا اسپکتوفتومتر آن را

اندازه‌گیری و با پروتئین های استاندارد مقایسه کرد.

۲. تعیین میزان DNA سلول: مراحل اجرای این روش شامل لیزشدن سلول‌ها در معرف فلورسانس است. معرف به DNAسلول باند می‌شود. ردیابی فلورسانس با معرف‌هایی با حساسیت بالا مانند هوخست ۳۳۲۵۸ یا (DAPI) indole - 4,6- diamidino-2- phenyl صورت می گیرد.

۳. تعیین میزان گلوکز مصرفی سلول: رشد سلول را با تغییر در غلظت ترکیبات محیط کشت می‌توان ردیابی کرد. یک روش سنجش غیر مستقیم تعداد سلول، اندازه‌گیری تغییر در محتوای گلوکز محیط است. از دیگر ترکیبات محیط کشت که می‌توان به این منظور استفاده کرد، اندازه‌گیری میزان تولید اسید لاکتیک و یا میزان مصرف اکسیژن است.

ارتباط بین تعداد سلول‌ها و میزان مصرف یا تولید این ترکیبات نشان دهندهٔ این است که این ارتباط برای یک نوع تیرهٔ سلولی در شرایط یکسان، ثابت است، حتی اگر تیرهٔ سلولی یا هر یک از شرایط کشت تغییر کند، ارتباط بین مصرف سوبسترا یا تشکیل محصول و تعداد سلول نیز تغییر خواهد کرد.

میزان گلوکز مصرفی سلول با سه آزمایش ارزیابی می‌شود:

۱. سنجش گلوکز اکسیداز: میزان گلوکز سلول با یک آزمایش رنگ سنجی و با کمک دو آنزیم گلوکز اکسیداز و پراکسیداز اندازه‌گیری می‌شود.

$$\text{D-glucose} + H_2O + O_2 \rightarrow \text{D-gluconic acid} + H_2O_2 \quad (1)$$

$$H_2O_2 + \text{reduced O-dianisidine} \rightarrow 2H_2O + \text{Oxidized O-dianisidine (brown)} \quad (2)$$

$$\text{Oxidized O-dianisidine} + H_2SO_4 \rightarrow \text{Oxidized O-dianisidine(pink)} \quad (3)$$

معادلهٔ ۱ با گلوکز اکسیداز (GOD)و معادلهٔ ۲ با پراکسیداز(POD) کاتالیز می‌شود. سپس، محصول حاوی رنگ o-dianisidine hydrochloride با کمک پراکسید هیدروژن به محصولی - که در حضور اسید سولفوریک صورتی می‌شود - احیا می‌شود (معادلهٔ ۳) سرانجام، گلوکزاکسیداز با روش رنگ سنجی اندازه‌گیری می گردد.

۲. سنجش هگزوکیناز: میزان گلوکز سلول به روش آنزیمی در دو واکنش کاتالیزشدهٔ زیر توسط هگزوکیناز(HK) و گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز(G۶PDH) اندازه‌گیری می‌شود.

$$\text{D-glucose} + ATP \rightarrow \text{glucose-6-P} + ADP \quad (1)$$

$$\text{glucose-6-P} + NAD \rightarrow \text{6-phosphogluconate} + NADH + H^+ \quad (2)$$

هگزوکیناز گلوکز را در حضور ATP به گلوکز ۶- فسفات تبدیل می کند (معادلهٔ ۱). بلافاصله

همراه کیت یک محلول گلوکز استاندارد هم وجود دارد.

گلوکز ۶- فسفات توسط G6PDH به ۶- فسفوگلوکونات تبدیل می‌شود (معادلهٔ ۲). ارتباط تشکیل NADH با تغییر در جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر ردیابی می‌شود. این نتیجه با غلظت گلوکز اصلی متناسب است.

۳. آنالیز کننده گلوکز: در این روش سنجش گلوکز اکسیداز در یک دستگاه آنالیز کننده صنعتی مانند آنالیزکنندهٔ صنعتی YSI مدل ۲۷ (Yellow Spring Instrument Co) انجام می‌شود. در این دستگاه غشاهای تثبیت شدهٔ حاوی آنزیم‌هایی قرار داردکه در نهایت می‌تواندمتابولیت‌های گلوکز و اسیدلاکتیک را تولید کند. این متابولیت‌ها از طریق تغییر جریان الکترون شناسایی می‌شوند.مثلاً آنزیم‌های تثبیت شده در غشا گلوکز را متابولیزه می‌کنند و پراکسیدهیدروژن تولید می‌کنند. با تجزیهٔ پراکسیدهیدروژن (معادلهٔ ۱) الکترون تولید می‌شود که با حسگر کلارک (الکترود کلارک) مشخص می‌شود.سپس، الکترون باعث تجزیهٔ کلریدنقره (معادلهٔ ۲) می‌شود و جریان الکتریکی تولید می‌کند. این جریان با یک آمپرسنج اندازه‌گیری می‌شود و به صورت پتانسیل الکتریکی نمایش داده می‌شود.در اینجا جریان سیگنال با مقدار گلوکز مصرف‌شدهٔ سلول متناسب است.با مقایسهٔ گلوکز مصرفی با منحنی استاندارد می‌توان تخمین دقیقی از تعداد سلول داشت.

$$H2O2 \rightarrow 2H^{+} + O2 + 2e^{-} \quad (1)$$

$$AgCl + e^{-} \rightarrow Ag + Cl^{-} \quad (2)$$

اهمیت قدرت بقای(Viability) سلول:

در صورت تشخیص زنده یا مرده بودن سلول می‌توان تصمیم به توقف یا ادامهٔ کار گرفت.

کاربرد قدرت بقای سلول(Cell Viability) :

۱. در مطالعهٔ سلول‌های سرطانی

۲. برای تشخیص ردکردن یا ردنکردن بافت پیوندی به انسان یا موجود مورد مطالعه. هر چه تعداد سلول‌های زنده در محل پیوند (graft) بیشتر باشد، نشاندهنده موفقیت عمل پیوند است.

۳. محاسبهٔ میزان سمیت مواد سمی (Toxified) در *in vitro* و تعیین دوز مناسب دارو.

۴. محاسبهٔ اثر تخریب‌کنندگی توکسین‌ها در محیط

مقایسهٔ درصد سلول‌های مرده هنگام شمارش سلول و بعد از مرحلهٔ انجماد نشان‌دهندهٔ این است که شرایط انجماد برای سلول مناسب بوده یا نبوده است.