کنترل کیفی در بانک‌های سلولی

زیبا قاسمی M.Sc.[1]، نریمان مصفا D.V.M., Ph.D.[2]*

۱. سازمان تامین اجتماعی، بیمارستان شهید دکتر فیاض‌بخش، واحد آزمایشگاه
۲. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۱۹۳۹۵۴۷۱۹، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
پست الکترونیک: Email: mosaffansar@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۱۰/۷

بانک سلولی عبارت است از مخزن نگهداری طولانی مدت ذخایر سلولی که نیازمند مراقبت ویژه و کیفیت بالای حمایتی به منظور اطمینان از سلامت موجودی حاضر در آن باشد .

اصلی‌ترین هدف برقراری و ثبات در بانک‌های بیولوژیک ،تامین منابع سلولی در اهداف مرتبط با کشت سلولی در یک مسیر جهانی و خدماتی است. چرا که تکنولوژی کشت سلول یک ابزار معتبر و قابل اعتماد برای محققان است و در پیشبرد اهداف علمی کاربرد زیادی دارد.

ثبات موفقیت‌آمیز و رو به رشد سلول‌ها نیازمند اطلاعات فراوان از اجرای روش‌های اساسی است. در بسیاری از فضاهای پژوهشی علوم پزشکی و برنامه های دارویی ،تیره یاخته‌های مداوم و سلول‌های موجود در بانک‌ها، جایگاه ویژه‌ای دارند. بر طبق راهبردهای ذکر شده فوق، تشکیلاتی که در آغاز مسیر جمع‌آوری و نگهداری سلول‌ها و جنبه‌های امنیتی و حفاظتی آنها پیش‌رو مطرح می‌گردد نیازمند کنترل کیفی است که اهمیت ویژه‌ای در ثبات بیولوژیک سلول‌های ذخیره شده دارد. در این مقاله مکانیسم‌هایی مطرح می‌شوند که به وسیله آنها ،ساختارهای جمعیتی سلولی مشخص می‌شود. همچنین روش‌هایی معرفی می‌شوند که پروسه‌های کامل منتهی به تکمیل مشخصات سلولی را در بررسی‌های مربوط به توان تکثیری و حیاتی سلول‌ها توضیح می‌دهند. خصوصیت رشد ثابت و یکنواخت سلول‌ها که اجازه عضویت آنها را در بانک‌های سلولی می‌دهد نیز با تکیه بر منشا سلول و روش نگهداری آن و روش‌های کنترل کیفی مداوم معرفی شده است. در این مقاله سعی شده است توصیه‌هایی در زمینهٔ استفاده از روش‌های حذف کننده مایکو پلاسما و سایر عوامل میکروبی که به شدت سیستم‌های بانک سلولی را در معرض خطر قرار می‌دهند ارایه گردد.

کلیدواژگان: بانک سلولی، مایکوپلاسما، کنترل کیفی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ٤، زمستان ۱۳۸۵، صفحات ۳۱٤-۳۰٤

مقدمه

امروزه با پیشرفت علم و گرایش روند مطالعات و تحقیقات به زمینه‌های بیولوژی مولکولی وژنتیک سلولی و گسترش روش‌های فوق العاده حساس نظیر آنالیزهای سلولی، پلی‌مورفیسم ژنتیکی، PCR و (Microarray) تجارب، تعداد و تنوع نمونه‌های جمع‌آوری شده و ذخیره شده برای مطالعات اپیدمیولوژیکی و کلینیکی افزایش چشم‌گیری یافته است و به روش‌های جدید جمع‌آوری و پردازش نمونه‌ها و بانک‌های سلولی پیشرفته احتیاج است تا بتوان حداکثر اطلاعات را از هر نمونه به دست آورد. به طوری که منابع در دسترس و جامعی جهت مطالعات آینده در اختیار باشند. در این راستا با ارایه هر تکنولوژی جدید به روند کنترل کیفی جدیدی نیاز است تا بدین وسیله نسل‌های آینده قادر به استفاده از این تجربیات باشند. این کنترل باید از زمان شروع جمع آوری، پردازش و آماده کردن نمونه‌ها و نیز در کلیه مراحل ذخیره‌سازی نمونه‌ها در بانک‌های سلولی به طور کامل و دقیق اعمال شود. در کشور ما نیز با توجه به رشد روزافزون بانک‌های سلولی و ملی و تاسیس مراکز جدید نگهداری سلول، لازم است با مطالعه وضعیت کنترل کیفی این مجموعه‌ها و توجه به نکات کلیدی، آن هم با استفاده از الگوهای مشابه در خارج از کشور روند رو به رشد تکنیک‌های تولید سلولی را شتاب بخشید.

جمع آوری نمونه و پردازش آن

برای هر تیره (Line) سلولی و محصولات آن به موارد زیر باید توجه کرد:

۱. تاریخچه و خصوصیات عمومی تیره سلولی
۲. سیستم بانک سلولی
۳. آزمایش‌های کنترل کیفی

۱. تاریخچه و خصوصیات عمومی تیره‌های سلولی

در این بحث کلیه خصوصیات مربوط به نمونه مورد مطالعه مشخص می‌شود. در بدو مطالعه، جهت نمونه‌گیری بایستی رضایت بیماران یا نمونه دهندگان فراهم و اطمینان خاطر آنان از بابت محرمانه بودن روند کار چه در مطالعات کنونی و چه در مطالعات آینده، به طور کامل فراهم شود. محققان باید دستورالعمل مکتوبی از شروع جمع‌آوری

Archive of SID
www.SID.ir

نمونه، نحوه انتقال آن، پردازش وچگونگی ذخیره آن در دست داشته باشند (۱).

جمع آوری نمونه

توجه به زمان و مکان و سرعت جمع آوری نمونه، حجم مورد نیاز، نوع مخازن قابل حمل مناسب جهت حمل نمونه‌ها ضروری است. در مواردی که نیاز به انتقال نمونه‌ها از محل جمع‌آوری به آزمایشگاه تحقیقاتی است باید حتما به نحوه جابجایی صحیح نمونه‌ها توجه شود و یک سیستم پست الکترونیکی یا تلفن در دسترس باشد تا در صورت بروز هر گونه مشکل بتوان با مراکز مربوطه تماس برقرار کرد. در زمان نمونه‌گیری، نمونه‌هایی که جهت اخذ آنها از روش‌های غیرتهاجمی استفاده می‌شوند (نمونه‌های ادرار یا سواپ دهان) را می‌توان در هر مکان جمع‌آوری و طی شرایط استاندارد مشخص شده در دستورالعمل نحوه جمع‌آوری و نگهداری نمونه به آزمایشگاه ارسال کرد. ولی در مورد نمونه‌های به دست آمده با روش‌های تهاجمی همچون استفاده از سرنگ و خون‌گیری یا تکه‌برداری علاوه بر نیاز به تعداد زیادتر پرسنل، محدودیت مکانی نیز اعمال می‌شود. در مورد پرسنل رعایت کلیه نکات مربوط به انتقال صحیح نمونه‌ها، چه از نظرمحافظت از نمونه در حین انتقال وچه از نظر محافظت از خود پرسنل به جهت عفونی الزامی است و در کشورهایی که نسبت بیماری‌های عفونی در آنها بالاست و امکانتماس با نمونه‌ها وجود دارد، این مراقبت‌ها در موارد کاربرد سوزن یا دیگر وسایل تیز جهت نمونه‌گیری بیشتر لازم است. البته همه نمونه‌ها حتی نمونه‌های مربوط به اهدا کنندگان سالم و کودکان نیز باید از نظر عوامل عفونی همچون هپاتیت و ایدز بررسی شوند (۱).

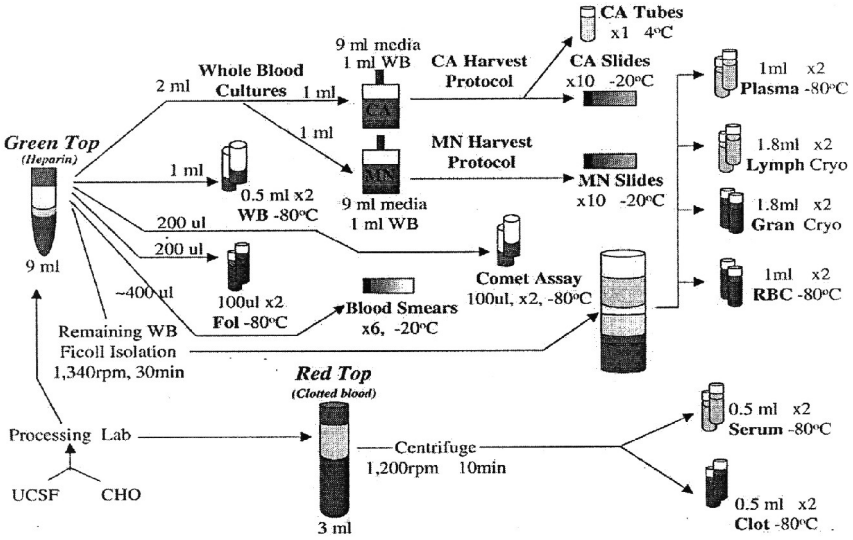
در مورد نمونه‌های ناپایدار، فاکتورهایی همچون زمان، حرارت، استفاده از پایدارکننده‌های شیمیایی و بافرها مورد توجه قرار می‌گیرند. در مورد استفاده از ضد انعقادها و عوامل پایدار کننده، بهتر است ابتدا در یک نمونه کوچک امتحان شود و سپس برای مطالعات بزرگ‌تر استفاده شوند (۱).

زمان بین جمع‌آوری و پردازش نمونه‌ها نیز مهم است.در برخی موارد حتی می‌توان کشت سلول را ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از جمع‌آوری نمونه انجام داد اما در شرایط دیگری مثل جستجوی سایتوکاین‌ها، عملیات باید بلافاصله بعد از جمع‌آوری نمونه آغاز شود (۲).

نمونه‌های ناپایدار باید در همان مکان جمع‌آوری و پردازش شوند و سپس به آزمایشگاه مورد نظر انتقال یابند. کنترل حرارت نیز در تمامی مراحل جمع‌آوری، انتقال، پردازش و ذخیره نمونه مورد توجه قرار می‌گیرد. مثلا ترکیبات متفاوت خون در دمای مختلف ذخیره می‌شوند (۳). شکل یک چگونگی پردازش نمونه خون را در یک بانک سلولی نشان می‌دهد.

با توجه به اینکه تکرار عمل ذوب و انجماد نمونه، موجبات کاهش اثر نمونه را فراهم می‌سازد بهتر است نمونه‌ها را از ابتدا بر حسب مقدار مورد نیاز در هر بار استفاده، درلوله‌های کوچک جداگانه (Aliquot) ذخیره کرد. سترون کردن و ممانعت از آلودگی‌های میکروبی نیز بسیار حایز اهمیت است که در بخش آزمایش‌های کنترل کیفی به تفصیل مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت (۱).

همچنین تاکید می‌شود که برچسب نمونه حتما شامل این اطلاعات باشد: نام ، سن ،جنس ، تاریخ تولد، عکس، آدرس، تاریخچه تیره سلولی، آلودگی ویروسی ممکن، آلودگی با ویروس‌ها، خصوصیات فیزیکو شیمیایی، نحوه پردازش، حرارت، پایداری، تاریخ تهیه، روش تنظیم، حجم نمونه، نحوه حمل نمونه، درجه خلوص محصولات نهایی، خصوصیات مولکولی و بیولوژیکی و سایر خصوصیاتی که معرف هر نوع ویژگی نمونه مورد نظر باشد. برای دسترسی آسان به این حجم وسیع اطلاعات و نمونه ها، نمونه باید در کوچک‌ترین شکل ممکن ذخیره شود تا امکان ذخیره‌سازی بیشترین نمونه در کمترین فضا امکان‌پذیر باشد.



شکل ۱: مراحل پردازش و حرارت‌های لازم جهت ذخیره ترکیبات مختلف خون

www.SID.ir

بر همین اساس کلیه نمونه‌ها دارای کد شناسایی خاصی می‌شوند که همه اطلاعات فوق را در خود ذخیره دارد. همچنین جهت به حداقل رساندن اطلاعات کدها روش‌هایی به کار گرفته می‌شود از جمله استفاده از ریزپردازنده‌های رمزدار (Barcode). این بارکدها شامل مقادیر زیادی از اطلاعات در یک ناحیه خیلی کوچک‌اند و به صورت برچسب روی مخازن حاوی نمونه قرار دارند که این روش برای استفاده عمومی در ۵ تا ۸ سال آینده به کار می‌آید. نکته قابل توجه این است که دسترسی به این اطلاعات عمومی نیست و این اطلاعات به صورت محرمانه فقط در دسترس رییس آزمایشگاه و افراد خاص است (۳).

در پایان یادآوری می‌شود بهتر است نمونه‌ها به صورت دوتایی و در صورت امکان در تانک‌های مختلف ذخیره شوند تا در صورت ایجاد نقص در یکی، استفاده از دیگری امکان‌پذیر باشد. نمونه‌ها پس از پردازش در بانک‌های سلولی جهت استفاده‌های کلینیکی یا استفاده در تحقیقات آینده نگهداری می‌شوند (۱).

۲. سیستم بانک سلولی

هنگامی که یک تیره سلولی به عنوان منشای بیولوژیکی یک محصول انتخاب شود، بانک سلولی جهت ذخیره این محصولات برای استفاده در فواصل زمانی متفاوت مطرح می‌شود بانک‌های تولید شده برای مصارف انسانی و درمان‌های جراحی نظیر بانک‌های فیبروبلاستی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در واقع هدف اصلی یک بانک بیولوژیکال، ذخیره نمونه‌های جمع شده حاصل از مطالعات علمی است که حد اکثر اطلاعات هر نمونه را جهت آزمایش‌های آینده فراهم می‌سازد. شکل دو بیان‌گر مراحل یک مطالعه بیولوژیک است (۴).

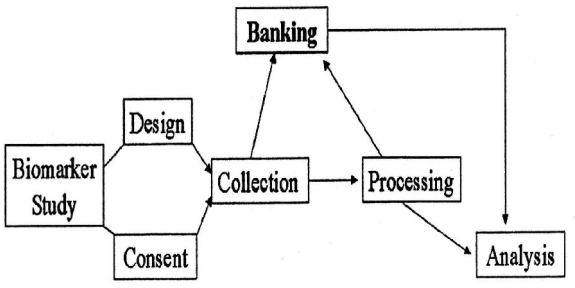
بانک‌های سلولی به دو صورتند:

۱. Master Cell Bank : MCB

۲. Manufacturer's working cell Bank : MWCB

بانک MCB

شامل مجموعه‌ای از سلول‌های همسان است که هر دسته از یک بافت مشخص مشتق شده‌اند.

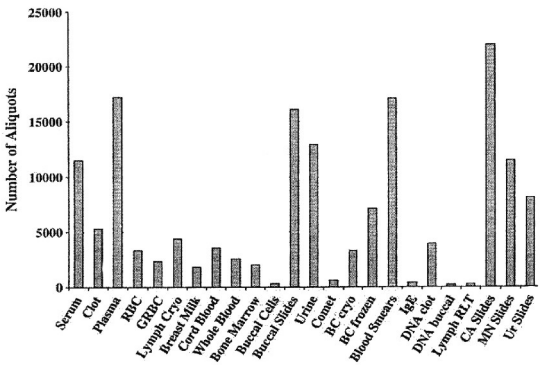


شکل ۲: مراحل مختلف در ایجاد بانک‌های سلولی

MCB در واقع محل ذخیره تیره‌های سلولی جدید است که ابتدا سلول ذخیره شده مورد ارزیابی کنترل کیفی قرار می‌گیرد. اگر تمامی آزمایش‌های کنترل کیفی نتایج قابل قبولی داشتند روند کار ادامه می‌یابد. این تیره‌های سلولی به صورت تقسیمات مجزا در سرما نگهداری می‌شوند. سرمای مورد نیاز توسط مخازن مایع یا گاز حاوی نیتروژن مایع تامین می‌شود. در مواردی مثل مطالعات کروموزومی که به کشت سلولی احتیاج است مواد محافظت کننده سلول از یخ‌زدگی مانند (دی متیل سولفاکساناید) DMSO برای حفاظت سلول‌ها از تخریب هنگام انجماد و نگهداری در نیتروژن مایع آن هم در برودت کمتر مورد نیاز است. در مجموع MCB محل ذخیره تیره‌های سلولی جهت استفاده بعدی در MWCB محسوب می‌شود (۵).

بانک MWCB

این بانک سلولی محل انجام کارهای تحقیقاتی است که یک یا چند نمونه از سلول‌های موجود در MCB در این مراکز کشت داده می‌شوند و با انجام (sub cultures) روش‌های پاساژ سلولی به دفعات، تعدادی از سلول‌های MCB جهت تولید و تهیه تیره‌های سلولی مورد نیاز انتخاب می‌شوند. این تیره‌های سلولی درلوله‌های (vials) منفرد توزیع و در سرما نگهداری می‌شود تا جهت تولید محصولات بیولوژیکی به مصرف MWCB برسد. در صورت مصرف دو نمونه MCB باید محتوای سلولی هنگام ذوب شدن با هم مخلوط شود. در هر دو سیستم MCB و MWCB در مورد تیره‌های سلولی diploide باید تعداد بسیار کمی از سلول‌های تقسیم شونده ذخیره شوند. همچنین نمونه‌ها باید دارای برچسب مشخصات باشد و به صورت دوتایی و در دو منطقه جداگانه ذخیره شود تا ازکاهش ذخایر تیره‌های سلولی جلوگیری و از همه نمونه‌های موجود در بانک‌ها فهرست جامعی تهیه شود (۵). نمودار یک انواع نمونه‌های جمع‌آوری شده و ذخیره شده در یک بانک سلولی را معرفی و تفکیک می‌کند:



نمودار ۱: منابع مختلف تهیه و اخذ نمونه‌های سلولی به تفکیک و بر اساس تقسیمات حجمی و عددی معرفی شده‌اند.

آزمایش‌های کنترل کیفی

در این قسمت به مجموعه روش‌هایی که جهت ارزیابی تیره‌های

www.SID.ir

سلولی موجود در بانک‌های سلولی طراحی شده است می‌پردازیم.

برخی از آزمایش‌های قدیمی امروزه محدود یا اصلاح شده‌اند که در ابتدا نگاهی اجمالی به آنها داریم:

الف) کاریولوژی: جهت بررسی تیره‌های حاوی سلول‌های دیپلویید که امروزه دیگر انجام نمی‌شود (۶).

ب) تومورو‌ژنیسیتی: کلیه سلول‌های پایدار و تیره‌هایی با منشا جوندگان سرطان‌زا است لذا نیازی به انجام این آزمایش برای بررسی قدرت سرطان‌زایی ندارند. اما تیره‌های سلول‌های اپی‌تلیال انسانی و همه سلول‌های مورد استفاده جهت تولید واکسن ویروس زنده در این آزمایش بررسی می‌شوند.

علاوه بر این، در برخی موارد سلول‌های مورد استفاده در مطالعات سلولی یا ژن درمانی ممکن است به این آزمایش نیاز داشته باشد. اندازه‌گیری پروتیینهای داخل سلولی و فرآورده‌های سرطان‌زا مانند Ras، Bax، Bid و غیره می‌توانند در یک روند سیتوشیمیایی به مطالعات سرطان شناسی سلول‌ها کمک شایانی نمایند (۷).

ج) آزمایش آنکوژن: که امروزه دیگر مورد استفاده قرار نمی‌گیرد (۶).

سنجش کمی سلول‌های دارای حیات (Haemocytometer)

در این روش از شمارش مستقیم تعداد سلول‌ها با استفاده از یک میکروسکوپ معمولی، همراه با استفاده از یک رنگ حیاتی (تریپان بلو Trypan blue) جهت تمایز بین سلول‌های دارای حیات و سلول‌های فاقد حیات استفاده می‌شود.

این آزمایش قادر به تمایز بین سلول‌های دارای اندازه مختلف و توده‌های سلولی نیست. این روش ساده، سریع و ارزان است و فقط به مقدار بسیار کمی از سلول‌های معلق احتیاج دارد.

استفاده از دستگاه الکترونیکی شمارش سلولی رایج‌ترین روش دقیق و موثر شمارش سلول‌ها است: که شامل یک ستون شمارنده با قطر ۰/۱ میلی‌متر و یک میدان جداسازی تسهیل‌کننده شمارش است.

با استفاده از یک رنگ حیاتی همانند تریپان‌بلو می‌توان شمارشی از سلول‌های زنده و غیرزنده به دست آورد. به طوری که با استفاده از این رنگ سلول‌های زنده بی‌رنگ باقی می‌مانند و سلول‌های مرده رنگ آبی به خود می‌گیرند. از آنجایی که این رنگ دارای خاصیت سمی برای سلول‌ها است تاخیر در شمارش باعث ایجاد اختلال در وضعیت حیاتی سلول‌ها می‌شود. رنگ‌پذیری سلول‌ها ناشی از اختلالات غشایی، نفوذپذیری رنگ به درون سلول و عدم قابلیت حیات این سلول‌ها است (۸).

در حین شمارش سلول‌ها توسط دستگاه فوق دقت در نمونه‌برداری، رقت صحیح و پرکردن دقیق ستون شمارش ضروری است. پرکردن بیش از اندازه ستون، وجود حباب‌های هوا و عدم نظافت کامل ستون باعث ایجاد خطا در روند آزمایش می‌شود. انجام شمارش سلولی به صورت دوتایی از ایجاد خطاهای آماری ناخواسته جلوگیری می‌کند (۸).

نکته مهم این که شمارنده‌های الکتریکی فقط در موارد سوسپانسیون‌های فاقد توده مفیدند. در غیر این صورت اگر توده‌های سلولی بزرگ وجود دارد و در مواردی که سلول‌ها غیرقابل دسترس هستند و یا امکان استفاده از تریپسین برای معلق کردن سلول‌ها وجود ندارد شمارش هسته‌های سلول‌ها پس از حل کردن سیتوپلاسم توصیه می‌شود (۸).

روش نشان‌گر تقسیم سلولی یا (Mitotic Index) برای شمارش سلول‌های زنده دارای قدرت تقسیم نیز مطرح است. در برخی موارد سنجش توده سلولی بر سنجش تعداد سلول‌ها ارجح است. در چنین مواردی اندازه‌گیری وزن خشک توده سلولی (احتیاج به مقادیر زیاد نمونه)، اندازه‌گیری پروتیین (بهترین پارامتر)، تعیین میزان DNA، نیتروژن و یا لیپیدها توصیه می‌شود. گاهی در کشت‌های تک لایه‌ای یا سلول‌های ثابت، شمارش مستقیم سلول‌ها امکان ندارد و لازم است از یک روش سنجش غیرمستقیم استفاده شود. تعدادی از این روش‌ها عبارتند از: محاسبه نسبت از دست دادن و مصرف گلوکز یا اکسیژن توسط تعداد مشخص سلول‌ها با استفاده از منحنی‌های استاندارد و نیز تغییرات سوخت و ساز موادی چون لاکتیک اسید، پیرویک اسید و دی اکسید کربن که البته در مراحل مختلف چرخه رشد یک سلول خاص تغییر می‌یابند و یا ممکن است تغییرات محیط کشت بر این نسبت‌ها تاثیر بگذارد. با تمامی احوال این پارامترها نشانه خوبی از حجم سلول‌های زنده در یک کشت سلولی محسوب می‌شوند. لازم به ذکر است تغییرات حاصله از قندی شدن (glycation) و ترکیب با قند (glycozylation) سلول‌های تحت کشت که ناشی از تغییرات قند در محیط‌اند اثر بالقوه‌ای بر فعالیت‌های اکسیداتیو سلول‌ها در آینده دارد (۹).

همچنین برخی ازتیره‌های سلولی مانند سلول‌های بنیادی مزانشیم انسانی برای رشد و بقا نیاز به مقدار کمی گلوکز دارند. که این سلول‌ها با منشا و روشی متفاوت با پدیده فوق هستند و نیاز آنها به گلوکز محیط کشت در غلظت بالایی قرار دارد.

گاهی اوقات هدف از برآورد و تعیین میزان حیات سلول‌ها، سنجش میزان فعالیت‌های هسته‌ای سلولی و وقوع تقسیم میتوز سلولی است. به عنوان مثال در موارد خاصی از رادیو ایزوتوپ‌ها جهت بررسی نسبت ساخت پروتیین، DNA و RNA استفاده می‌شود . با استفاده از رادیو ایزوتوپ‌ها می‌توان چنین مواردی را با دقت ارزیابی کرد. مثلا در برخی مطالعات، کرومیوم رادیواکتیو به پروتیین‌های موجود متصل می‌شود و در سلول آسیب دیده یا مرده این پروتیین نشان‌دار در مایع روی محیط کشت سلول‌ها آزاد باقی می‌ماند (Chromium Release Assay) اندازه‌گیری رادیوایزوتوپ موجود در محیط، بیان‌گر میزان حیات سلول‌ها است (۱۰).

اثر تشکیل توده‌های سلولی (Colony - Forming Efficiency)

در برخی از بانک های سلولی نظیر مواردی که هدف، تولید یاخته‌های بنیانی است از نظر تشکیل توده‌های سلولی، مورد توجه‌اند. از آنجایی که حرکت رو به مرکز این سلول‌ها با ایجاد شبکه‌های به هم

www.SID.ir

پیچیده یا استقرار پایدار آنها در محیط هماهنگی دارد، لذا توجه به ریخت‌شناسی دستجات سلولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و به خصوص از حیث وجود عوامل سمی در محیط کشت که مانع بروز این پدیده می‌شود، اطلاعات لازم را در اختیار می‌گذارد. همانطور که می‌دانیم پرورش و نگهداری سلول‌های پیش‌ساز خون‌ساز در آزمایشگاه و بانک‌های سلولی و بررسی ریخت‌شناسی آنها از طریق آزمایش سنجش ایجاد توده سلولی مقدور است. از این سلول‌ها در تمایز به رده‌های مختلف با عنوان سلول‌های مولد توده نام برده می‌شود. آنها در محیط‌های نیمه جامد قادر به تشکیل توده سلولی هستند و بنابراین یکی از راه‌هایی که می‌تواند از حیث کنترل کیفی سلول‌های بنیادی و کسب اطمینان از خلوص و یکنواختی آنها در آزمایشگاه بانک سلول مورد استفاده قرار گیرد، آزمون بررسی توان‌مندی آنها در ایجاد توده Colony Forming Efficiency است (۱۱).

بانک MTT

در این روش با استفاده از رنگ ۳- (۵، ۴ دی متیل تیازول، ۵، ۲ دی فنیل برومید تترازولیوم) فعالیت آنزیم‌های داخل میتوکندری با رنگ سنجی اندازه‌گیری می‌شود. این روش بر مبنای احیای نمک تترازولیوم است که سلول‌های زنده در معرض نمک قرار می‌گیرد و آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سیتوکروم b، c در سلول زنده شکل زرد نمک تترازولیوم محلول را در اثر احیا به یک فورمازان ارغوانی داخل سلولی غیرمحلول تبدیل می‌کند. با طیف سنجی، مقدار فورمازان ایجاد شده که معرف تعداد سلول‌های زنده در کل سلول‌ها است مشخص می‌شود (۱۲).

جهت ارزیابی و تعیین قدرت حیات (vitality) سلول‌های محیط کشت چه به صورت چسبنده و چه در مورد تیره‌های یاخته‌های شناور همچون سلول‌های سرطانی مشتق از خون و مغز استخوان (مانند K562) می‌توان از این روش با ارزش مولکولی بهره جست. در مورد آزمایش‌های برآورد سمیت سلولی و اعمال مراقبتی لنفوسیت‌های کشنده سلول‌های سرطانی و برآورد فعالیت ضد تکثیری آنها نیز روش M.T.T یک روش ارزشمند و مقرون به صرفه محسوب می‌شود (۱۳).

دقت شود که هرگونه آلودگی سیستم‌های بانک سلولی با عوامل میکروبیولوژیک به خصوص پروبیوتیک‌ها که قدرت تقسیم‌شدگی سلول‌ها را تغییر می‌دهند، می‌تواند بر نتایج آزمون M.T.T اثر بگذارد (۱۳).

فعالیت لاکتات دهیدروژناز LDH

اساس این روش بر رهایی LDH توسط سلول‌های مرده و آسیب دیده در محیط کشت استوار است که در یک روش رنگ‌سنجی میزان LDH آزاد شده اندازه‌گیری می‌شود و در واقع این آزمایش نشان‌دهنده سلول‌های غیرزنده است. البته طی یک روند رقت‌شناسی (Titration) معکوس می‌توان همه سلول‌ها را به طور مصنوعی منهدم و LDH توتال سلول‌ها را اندازه‌گیری کرد. با توجه به نوع سلول، پایداری LDH متغیر است و همچنین آزادی LDH به شدت آسیب غشایی و یا انهدام کامل سلول بستگی دارد. وضعیت کشت نیز در سطح LDH داخل سلولی اثر دارد. در مواردی که سلول‌های بانک به منظور اهداف سمیت سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند و در مطالعات سرطان‌شناسی و بررسی اثر داروهای شیمی‌درمانی طی یک دوره طولانی کشت از حیث وضعیت نیز می‌توان از روش LDHactivity بهره جست (۱۴).

قرمز خنثی (Neutral Red)

این ماده یکی از رنگ‌های مهم در تعیین سلول‌های زنده و فعال است که در لیزوزوم‌های سلول‌های زنده جمع می‌شوند و توسط انکسار نورشناسی (spectrophotometery) سنجیده می‌شود. این روش ساده، سریع، حساس و مقرون به صرفه است و مهمترین مزیت آن اجتناب از ورود سرم به محیط است. لازم به ذکر است هیچ یک از روش‌های فوق جهت بررسی قدرت حیات سلول‌ها بر دیگری برتری ندارد و بهتر است دو یا چند روش همزمان استفاده شود تا دقت لازم را ایجاد گردد. این آزمایش‌ها قادر به آشکارسازی فشارهای موجود بر سلول‌ها (رقیق شدن، مخلوط شدن، کهنه شدن و یا قرار گرفتن تحت اثر تریپسین شدن و غیره) هستند (۱۵).

قدم بعدی در روند کنترل کیفی بانک‌های سلولی، بررسی و تشخیص عوامل غیرطبیعی در تیره سلولی موجود است. آزمایش‌های تشخیصی برای بررسی عوامل غیرطبیعی شامل آزمایش‌های تشخیص آلودگی با مایکو پلاسما، باکتری، قارچ و ویروس است (۵).

مایکوپلاسما

مایکوپلاسما یک اصطلاح کلی برای ارگانیسم‌های راسته مایکوپلاسما تالها است که قادر به آلوده کردن کشت‌های سلولی هستند و به خانواده مایکوپلاسماتاسیه (مایکوپلاسما) و اکولپلاسماتاسیه (اکولپلاسما) تعلق دارند.

وجود مایکوپلاسما در محیط‌های کشت باعث اثراتی چون بروز کروموزوم‌های غیرطبیعی، تبدیل و تحول (Transformation)، تغییرات نسبت رشد و رقابت مایکوپلاسما با سلول‌ها جهت مصرف غذا می‌شود. برخی گونه‌های مایکوپلاسما پاتوژن‌اند و یا ممکن است مواد فعال بیولوژیکی تولید کنند. بنابراین حضور آن‌ها درتیره‌های سلولی مورد استفاده جهت تهیه محصولات درمانی پزشکی قابل قبول نیست. محصولاتی چون واکسن‌های ویروسی، آنتی‌بادی‌های تک ستونی (monoclonal Abs)، تنظیم کننده‌های ایمونولوژیکی، اینترفرون‌ها و سایر سایتوکاین‌ها، اریتروپوییتین، فاکتورهای رشد و سایر محصولات حتما باید از لحاظ فقدان آلودگی با مایکوپلاسما قبل از استفاده بررسی شوند.

آلودگی کشت‌های سلولی با مایکوپلاسما اولین بار در سال ۱۹۵۶ توسط رابینسون گزارش شد. ورود چنین عفونتی از آن زمان تا به امروز در آزمایشگاه‌های متفاوت متغیر است. در حال حاضر حدود ۱۲درصد تیره‌های سلولی آلوده هستند.

Archive of SID

www.SID.ir

تفاوت مایکوپلاسماها نسبت به سایر پروکاریوت‌ها نبود دیواره سلولی و اندازه کوچک آنهاست. مایکوپلاسما کوچکترین پروکاریوتی است که مستقلا تکثیر می‌کند و قطری معادل ژنوم اشرشیاکلی دارد (۱۶).

آلودگی محیط کشت تنها با مایکوپلاسما می‌تواند این اثرات را در پی داشته باشد:

القای تغییرات کروموزومی

القای تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های آسیب دیده

دخالت در سرعت رشد سلول‌ها

اثر بر متابولیسم اسیدهای نوکلییک و اسیدهای آمینه

القای تغییرات غشای سلول‌ها و حتی تغییر و تحول سلولی (۷)

پنج گونه مایکوپلاسما مهم‌ترین عوامل آلودگی محیط‌های کشت به شمار می‌روند که عبارتند از:

M.hyorhinis در خوک، M.arginini و M.laid Lawii در گاو و M.orale و M.fermentans در انسان (۱۷).

اما آنچه که از دید کنترل کیفی مهم است تکنیک‌های موجود جهت آشکار ساختن وجود آلودگی با مایکوپلاسما در تیره‌های سلولی از جمله رنگ‌آمیزی، کشت، نشانگرهای DNA و کشت هم‌زمان است. لازم به ذکر است که جهت به حداقل رساندن اثر عوامل ایجادکننده مثبت کاذب و منفی کاذب بهتر است حداقل دو روش هم‌زمان به کار گرفته شود. چون مقاومت گونه‌های مایکوپلاسما به صورت ماکروسکوپی و یا با میکروسکوپ‌های نوری استاندارد قابل تشخیص نیست و باکتری به راحتی می‌تواند در (Aerocells) قطرات و مواد حاصله از کشت‌های سلولی آلوده مخفی شود لذا به راحتی می‌تواند در کشت‌ها و حتی بین آزمایشگاه‌های مختلف گسترش یابد و لازم است که روش‌های مورد استفاده دارای حساسیت کافی باشند. در ذیل به شرح برخی از ا ین روش‌ها می‌پردازیم (۱۷).

رنگ آمیزی DNA

این رنگ‌آمیزی دارای حساسیت بالایی است. سمیت رنگ Hoechst 33258 ناشناخته است و لذا هنگام کار با پودر یا محلول رنگ به صورت دستی حتما بایستی از دستکش استفاده شود. در تمامی مراحل از آب دوبار تقطیر شده استفاده و محلول رنگ در هر بار آزمایش به صورت تازه به تازه تهیه شود.

قبل از هر توضیحی لازم به ذکر است که در هر دو روشی که هم‌زمان برای آشکار شدن آلودگی مایکوپلاسما استفاده می‌شود قاعده کلی بر این اساس استوار است که سلول‌های مورد بررسی از نظر مایکوپلاسما قبل از هر گونه امتحانی حداقل دو مرتبه در محیط فاقد هرگونه آنتی بیوتیکی تجدید کشت داده می‌شوند. چرا که حضور آنتی‌بیوتیک ممکن است عفونت را مخفی کند. همچنین سلول‌هایی که در لوله‌های منجمد شده نگهداری می‌شوند نیز نیاز به دو مرتبه تجدید کشت (passage) دارند چرا که نگهدارنده‌های سرمازا نیز گاه عفونت را مخفی می‌سازند (۱۸).

جهت رنگ‌آمیزی DNA از دو محیط Mycoplasma broth base و Mycoplasma agar base استفاده می‌شود که این محیط‌ها نیز باید در صورت نیاز تازه تهیه شود.

در ابتدا تعداد مورد نیاز از سلول‌های تیره مورد آزمایش ($5x10^5$ cell ml^{-1}) را توسط یکی از روش‌های از قبل توضیح داده شده شمارش می‌کنیم و تعداد مشخصی از سلول‌ها را به محیط نیمه چسبنده حاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) اضافه می‌کنیم. به طوری که سلول‌ها در سطح چسبنده انتشار یابند. در انتها، روز اول و سوم پس ازرشد در گرم‌خانه (Incubation) سلول‌ها را از نظر وضعیت حیات مشاهده می‌شوند.

در صورتی که احتمال از دست رفتن خاصیت سلول‌ها پس از سه روز رشد در این محیط باشد باید محیطی مخلوط از محیط اولیه و اصلی سلول‌ها و محیط فعلی تهیه شود و سلول‌ها در آن معلق شوند.

سپس ۲ تا ۳ میلی‌لیتر از سلول‌های مورد نظر را به هر یک از دو محیط کشت بافت (آگار و آب‌گوشت) اضافه می‌کنیم و در شرایط ۱±۳۶ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت رشد می‌دهیم. پس از ۴۸ ساعت یکی از ظرف‌ها را جهت اطمینان از عدم آلودگی باکتریایی و قارچی برداشته و با میکروسکوپ معکوس (invert) با درشت‌نمایی ×۱۰۰ مشاهده می‌کنیم. سپس سلول‌ها را با تقریبا ۲ میلی‌لیتر ماده ثابت کننده carnoy's که به صورت قطره قطره به جدار ظرف اضافه می‌شود ثابت می‌کنیم و به مدت ۳ دقیقه در حرارت اتاق قرار می‌دهیم. اضافه کردن قطره قطره خصوصا برای سلول‌های معلق مهم برای جلوگیری از رانده شدن سلول‌ها به یک طرف ظرف است.

سپس ماده ثابت کننده را خالی می‌کنیم و اجازه می‌دهیم تا در سطح چسبنده محیط به مدت ۳۰ دقیقه در هوا خشک شود.

در مرحله بعد ۲ میلی‌لیتر از رنگ هوخست (Hoechst) را به مدت ۵ دقیقه روی محیط کشت قرار می‌دهیم به طوری که سطح ظرف را بپوشاند و ظرف در تاریکی قرار گیرد. پس از طی این مدت رنگ را خارج می‌کنیم و سطح چسبنده محیط را روی یک صفحه شفاف (slide) قرار می‌دهیم و زیر اشعه ماورای بنفش Epifluresance با درشت‌نمایی ×۱۰۰ و روغن ایمرسیون بررسی می‌کنیم (۱۹). در اکثر موارد برای استاندارد کردن سیستم، افزایش سطح سیتوپلاسم جهت آشکار کردن مایکوپلاسما و نیز جستجوی مایکوپلاسمای سرم و دیگر مواد شیمیایی موجود در محیط کشت سلول از یک محیط کشت معرف یا نشان‌گر (Indicator) استفاده می‌شود.

این محیط کشت معرف به عنوان کنترل مثبت و منفی به کار می‌رود. هر چند برای تعدادی از آزمایشگاه‌های بالینی و تحقیقاتی رشد دادن مایکوپلاسماها روی محیط‌های کشت به عنوان کنترل مثبت غیرممکن است.

یک تیره نشان‌گر معمول، تیره سلولی کلیه میمون سبزآفریقایی یا تیره سلولی Vero است که نسبت سیتوپلاسم به هسته بالایی دارد و به عنوان مخزن استاندارد به کار می‌رود. مایکوپلاسما روی این تیره سلولی به عنوان کنترل مثبت کشت داده می‌شوند (۱۹).

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی نتایج کشت

رنگ فلوروکروم Hoechst 33258 قادر به اتصال اختصاصی به DNA است. برای بررسی نتیجه، کشت‌های مورد آزمایش را زیر میکروسکوپ فلورسانس بررسی می‌کنیم. در کشت‌های غیرآلوده فقط فلورسانس هسته سلول‌ها (محل وجود DNA) در یک پس زمینه تیره مشخص است. اما کشت‌های آلوده به مایکوپلاسما دارای فلورسانس خارج هسته‌ای ناشی از اتصال رنگ به DNA مایکوپلاسما هستند. مایکوپلاسما ممکن است زیر میکروسکوپ به صورت اشکال رشته‌ای، شاخه‌ای (مرحله رشد لگاریتمی باکتری) و یا گرد و کروی (کشت کهنه) دیده شود. گاهی فلورسانس خارج هسته‌ای توسط هسته‌های خرد شده سلول‌های تخریب شده ایجاد می‌شود که نباید با مایکوپلاسما اشتباه شود. برای جلوگیری از این اشتباه بهتر است نمونه‌ها (مایع رویی کشت یک تیره سلولی) قبل از انجام آزمایش توسط یک صافی غشایی با قطر سوراخ‌هایی برابر صافی شوند که ۹۰درصد مایکوپلاسما در این صافی به دام می‌افتد و ۱۰درصد مایکوپلاسمای عبور کرده توسط رنگ‌آمیزی DNA مشخص می‌شود. این روش قادر به نشان دادن مقادیر بسیار کم مایکوپلاسما نیز هست. نکته دیگر اینکه در مورد ایجاد نتایج مثبت کاذب توسط خرده‌های هسته یا آلودگی با سایر باکتری‌ها و قارچ‌ها، فلورسانس‌های خارج هسته‌ایی از نظر اندازه متنوع‌اند و بسیار بیشتر و بزرگ‌تر از آلودگی با مایکوپلاسما هستند. صفحات شفاف مثبت و منفی از نظر آلودگی برای چندین هفته در تاریکی پایدار می‌ماند. در این روش نتایج سریع به دست می‌آید و همچنین جهت گونه غیرقابل کشت M.hyorhinis روش قابل استنادی محسوب می‌شود (۲۰).

کشت

نمونه‌های موجود در بانک‌های سلولی خصوصا مواردی که با سرم حیواناتی مانند سرم خوک یا سرم اسب سر و کار داریم را می‌توان جهت کنترل کیفی کشت داد. بدین صورت که با استفاده از یک سواپ استریل مقداری از سلول‌های چسبنده را درمحیط کشت FBS معلق می‌کنیم به طوری که غلظت سلولی 5×10^5 سلول در ml^{-1} ایجاد گردد. ابتدا این سلول‌ها را توسط یکی از روش‌هایی که قبلا توضیح داده شد از نظر قدرت حیات بررسی می‌کنیم. سپس با ۰/۱ میلی‌لیتر از این نمونه یک محیط آگار و با ۰/۲میلی‌لیتر از نمونه فوق یک محیط آبگوشت تهیه می‌کنیم. سپس ظروف کشت را در وضعیت بی‌هوازی در دمای ۱±۳۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ روز نگهداری می‌کنیم. روزهای ۷ و ۱۴ پس از کشت از محیط‌های آگار و آبگوشت محیط‌های تجدید کشت (sub cultures) تهیه و در ۳۶ درجه سانتی‌گراد به طور بی‌هوازی نگهداری می‌کنیم. در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پلیت‌های آگار را با میکروسکوپ معکوس و با درشت‌نمایی ×۱۰۰ و ×۴۰ بررسی می‌کنیم. کشت‌های مثبت ممکن است به عنوان کنترل مثبت در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند.

در مورد هر دو محیط آگار و آبگوشت قبل از استفاده، خود محیط نیز جهت بررسی آلودگی با مایکوپلاسما درکنار کنترل مثبت و کنترل منفی آزمایش می‌شوند. کنترل منفی در مورد هر دو محیط، یک محیط آماده نشده از همان نوع است. در صورت وجود آلودگی، مایکوپلاسماها رشد و توده سلولی ایجاد می‌کنند که این توده در محیط کشت قابل رویت (میکروسکوپی) است. از مشخصه‌های کلونی مایکوپلاسمای خالص فرم مشخص تخم مرغی شکل روی آگار است. لازم است توجه داشته باشیم گاهی کلونی‌های کاذب و یا تجمعات سلولی ممکن است با کلونی‌های مایکوپلاسما اشتباه شوند که psudocoloniها از تشکیلات کریستالی به وجود می‌آیند و به وسیله رنگ Dienes رنگ نمی‌پذیرند. در صورتی که مایکوپلاسما با استفاده از این رنگ آبی می‌شود و این نکته وجه تمایز آنها است. از طرفی تجمعات سلولی و توده‌های کاذب با گذشت زمان افزایش اندازه ندارند. در صورتی که مایکوپلاسما به علت رشد باکتری با گذشت زمان بزرگتر می‌شود. توده‌های سلولی قارچی و باکتریایی نیز در رنگ‌آمیزی فوق بی‌رنگ باقی می‌مانند (۲۱).

PCR

PCR یک روش مهم و بسیار حساس و سریع به ویژه جهت آشکارسازی سطوح آلودگی بسیار پایین که به علت ممانعت از رشد مایکوپلاسماها توسط برخی آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد می‌شود؛ محسوب می‌شود. PCR با مشخص کردن ترادف ژنوم RNA ریبوزومی $16s$ مایکوپلاسمایی و اکولوپلاسمایی آلودگی را در صورت وجود محرز می‌کند.

روش کار بدین صورت است که ابتدا یک میلی‌لیتر از مایع رویی محیط کشت مورد آزمایش را در یک لوله از نوع ependrof می‌ریزیم درب آن را محکم می‌بندیم. این لوله را داخل یک لوله آزمایش پر از آب در حال جوشیدن می‌گذاریم و اجازه می‌دهیم به مدت ۵ دقیقه در حال جوشیدن باقی بماند. سپس لوله را بیرون می‌آوریم و در حرارت اتاق سرد می‌کنیم که نمونه حاصله یا برای استفاده فوری مصرف می‌شود و یا در ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد می‌شود.

در مرحله بعدی به هر لوله حاوی نمونه مواد زیر را اضافه می‌کنیم:

- ۱۰ میکرو لیتر از بافر ×۱۰
- ۱/۵ میکرولیتر کلراید منیزیوم Maniuzium chloride
- ۵۰ picomol (pmol) از هر primer
- ۰/۲ میلی‌متر داکسی‌نوکلیوتید تری‌فسفات Deoxy nucleotide 3 phosphate
- ۰/۲ میکرون آنزیم Taq

سپس حجم آن‌را با آب دو بار تقطیر به ۹۰ میکرولیتر می‌رسانیم. همه مواد باید در یخ نگهداری شوند و نمونه همراه با کنترل مثبت و منفی آزمایش شود. لازم به ذکر است که کنترل مثبت همان کشت سلول‌های Vero است.

۱۰ میکرولیتر از این مخلوط را به لوله‌های مخصوص اضافه و خوب

Archive of SID

www.SID.ir

مخلوط و سپس لوله را سانتریفیوژ می‌کنیم. در مرحله بعد دستگاه چرخه دهنده (Thermo cycler) قادر به ایجاد چرخه‌های زمانی لازم است که عبارتند از: ۱ ساعت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ ساعت در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۲ ساعت در ۷۲ درجه سانتی‌گراد که این دوره‌ها ۴۰ مرتبه تکرار می‌گردد.

سپس محصول را روی ژل آگارز ۲درصد پخش و به مدت ۴۵ دقیقه در ۱۰۰ ولت الکتروفورز می‌کنیم. سپس ژل حاصله را با رنگ اتیدیوم بروماید (Etidium Bromide) در ۱درصد EB ۱۰۰میلی‌لیتر به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی می‌کنیم. در صورت وجود ژن rRNA16s آلودگی با مایکوپلاسما اثبات می‌شود. روش‌های جدید PCR قادر به آشکارسازی زیرگونه‌های مایکوپلاسما نیز هستند.

تفاوت در روش‌های PCR مربوط به ماشین cycler (ماشین چرخه دهنده) است که در زمان نگهداری در دمای ۳۷ درجه و نسبت سرد و گرم کردن در ماشین‌های مختلف ممکن است تغییر کند.

لازم به ذکر است که جهت کنترل کیفی محیط‌های کشت سلولی، PCR بهترین روش است و نسبت به سایر موارد بانک‌های سلولی، محیط کشت اولین انتخاب جهت PCR است (۲۲، ۲۳).

باکتری‌ها و قارچ‌ها

از دیگر موارد موجود جهت کنترل کیفی بانک‌های سلولی، بررسی آلودگی با باکتری‌ها و قارچ‌ها است.خصوصا در مواردی که باکشت سلولی بدون مصرف آنتی‌بیوتیک سر و کار داریم احتمال این آلودگی زیاد است. گاهی باکتری‌ها در کشت سلولی به کندی رشد می‌کنند و در مراحل اولیه قابل تشخیص نیستند که با توجه به مراحل زیر می‌توان آلودگی‌ها را آشکار ساخت:

استفاده از میکروسکوپ معکوس و در صورت امکان میکروسکوپ تنظیم کننده دو مرحله‌ای عبور نور (Phase contrast) و بررسی دقیق تک تک ظروف کشت سلولی جهت بررسی وجود باکتری یا قارچ در محیط کشت خصوصا در مواردی که تولید مقادیر بالای محصول از محیط‌های کشت سلولی مدنظر باشد (۲۴).

اگر محیط‌های کشت سلولی از منطقه‌ای به منطقه دیگر حمل شوند باید نمونه‌های مایع از کشت‌ها جدا و جهت بررسی آلودگی با میکروسکوپ‌های با قدرت بالا فرستاده شود. اقدام بعدی تهیه گسترش از محیط کشت، ثابت کردن گسترش با گرما و رنگ‌آمیزی با یکی از روش‌های رنگ‌آمیزی موجود و مشاهده نمونه رنگ‌آمیزی شده با روغن ایمرسیون جهت وجود آلودگی‌های باکتریایی یا قارچی و در پایان تهیه photomicrograph از آلودگی جهت پی بردن به جزییات بیشتر مجموعه مواردی است که به صورت اولیه در بررسی میکروبی صورت می‌گیرد. البته این آزمایش‌های میکروسکوپی تنها برای آشکار کردن آلودگی‌های با مقادیر زیاد مناسب است و برخی آلودگی‌های اندک یا مخفی با یک مشاهده ساده قابل ردیابی نیستند و به آزمایش‌های پیچیده و گران‌تری نیاز است (۲۴). از جمله این آزمایش‌ها عبارتند از: استفاده از کشت‌های تک لایه و سلول‌های معلق فاقد هر نوع آنتی بیوتیک.

اگر محیطی مورد آزمایش است که قبلا آنتی‌بیوتیک دریافت کرده است ابتدا مایع روی محیط را به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ و رسوب حاصله را در محیطی عاری از آنتی‌بیوتیک معلق می‌کنیم. سپس نمونه را ۳ بار با محیط فاقد آنتی‌بیوتیک شستشو می‌دهیم تا غلظت آنتی بیوتیک ممانعت کننده از بروز آلودگی به حداقل ممکن برسد.با استفاده از جدول یک محیط مناسب را انتخاب و ۰/۳ میلی‌لیتر از نمونه را در محیط به صورت یک حالت معلق سلولی درمی‌آوریم و با توجه به جدول یک، رشد می‌دهیم. و در روزهای ذکر شده در جدول، محیط را بررسی می کنیم.

در صورت وجود آلودگی، تجمع میکرو ارگانیسم‌های آلوده‌کننده روی محیط‌های جامد ظاهر می‌شود و در صورت استفاده از ظروف منقسم مایع، وجود آلودگی با بررسی شفافیت یا کدورت محیط مایع (کدر شدن در اثر حضور باکتری یا قارچ) ثابت می‌شود. برخی عوامل شایع موجود در آلودگی‌ها عبارتند از:

Escherichia coli, pseudomonas aeruginosa, penicillium notatum, Bacteriodes distasonis, Micrococcos salviarius,Aspergillus niger and candida albicans

اما در یک مطالعه، ۹ مورد آلودگی کشت‌های سلولی از آزمایشگاه‌های متفاوت در آمریکا با عاملی پنهان که از دید و آشکارشدن فرار می‌کنند، مشاهده شد که این ارگانیسم با رشد بسیار آهسته قادر به ظهور در محیط کشت پس از ۳ هفته گردید. این نمونه‌های مشکوک را روی محیط‌های آگار خون گوسفندی و آبگوشت Newyork City کشت دادند. پس از ۶ هفته نگهداری در ۳۷ درجه ارگانیسم ظاهر گردید که آنتی‌بیوتیک‌ها نیز بر این باکتری‌ها تنها اثر توقف رشد (Bactreiostatic) داشته و فاقد اثر کشندگی (Bactericidal) هستند. با استفاده از آزمایش‌های تعیین حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها، باکتری مذکور احتمالا یک کورینه باکتریوم مشخص شده است (۲۵).

ویروس‌ها

در پایان، محصولات باید از لحاظ اثرات آسیب‌زایی سلولی یا cytopathic ویروسی بررسی شوند. در این بررسی نمونه‌ها باید تا حد ممکن رقیق شوند و در کشت‌های سلول‌های دوتایی ویروسی و به مدت دو هفته مورد بررسی قرار گیرند. در مواردی که برر سی وجود سیتومگالو ویروس مطرح باشد نمونه تا ۴ هفته تحت بررسی قرار می‌گیرد. موارد مایع و پیکره‌های منهدم شده جهت بررسی از نظر آلودگی ویروسی به حیوانات تزریق و اثر وجود ویروس در بدن حیوان بررسی می‌شود.

ویروس‌های موجود درتیره‌های سلولی جوندگان با استفاده از تلقیح نمونه مشکوک به بدن حیواناتی چون موش، جنین تخم مرغ، خوکچه هندی، خرگوش و میمون بررسی می‌شوند.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: شرایط مورد استفاده جهت محیط‌های کشت گوناگون

Test medium	Temperature	Aerobic state	Observation time (dys)
Blood agar with:			
Fresh defibrinated	37	Aerobic	14
rabbit blood (5%)	37	Anaerobic	
Thioglycollate broth	37	Aerobic	14
	26		
Trypticase soy broth	37	Aerobic	14
	26		
Brain heart infusion broth	37	Aerobic	14
	26		
Sabouraud broth	37	Aerobic	21
	26		
YM broth	37	Aerobic	21
	26		
Nutrient broth with 2%	37	Aerobic	21
yeast	26		

جستجوی آنتی‌بادی تولید شده در بدن حیوان با آزمایش‌های RAP (آنتی بادی در رت)، MAP (آنتی بادی در موش) و HAP (آنتی بادی در هامستر) قابل پیگیری است.

ویروس‌های بیماری‌زای موجود در تیره‌های سلولی انسانی از جمله Hepatitis B virus, cytomegalovirus virus, Eptiten Bar virus, Hepatitis C virus

با توجه به منبع بافت و تاریخچه پزشکی بیماری که تیره سلولی از آن مشتق شده، مورد بررسی قرار می‌گیرند (۲۶). آزمایش‌های تکمیلی جهت آشکارسازی آلودگی ویروسی عبارتند از:

استفاده از میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن (Transmission Electron Microscope: TEM)

روش ترانس کریتیاز معکوس (Reverse Transcriptase) بر روی محیط‌های حاوی رسوب سانتریفیوژ با دور بالای نمونه‌ها (۱ ساعت در ۱۲۵۰۰۰ گرم)

روش عفونت‌زایی با تلقیح به حیوان آزمایشگاهی مناسب و بررسی اثر حضور ویروس (۲۷)

- Tumorgenicity test

جدول ۲: آنتی‌بیوتیک‌های مناسب جهت باکتری‌ها

Antibiotic	Working concentration	Gram-positive Bacteria	Gram-negative bacteria
Ampicillin	100 mg 1^{-1}	✓	✓
Cephalothin	100 mg 1^{-1}	✓	✓
Gentamicin	50 mg 1^{-1}	✓	✓
Kanamycin	100 mg 1^{-1}	✓	✓
Neomycin	50 mg 1^{-1}	✓	✓
Penicillin V	100 mg 1^{-1}		
Polymyxin B	50 mg 1^{-1}		✓
Streptomycin	100 mg 1^{-1}	✓	✓
Tetracycline	10 mg 1^{-1}	✓	✓

همان‌طور که قبلا اشاره شد امروزه این روش کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد و فقط توسط PCR، ژن‌های معیوب ردیابی می‌شوند.

اقداماتی جهت رفع و کنترل آلودگی

در صورتی‌که وجود هر یک از آلودگی‌های مایکوپلاسما، باکتری یا قارچی در کشت سلولی محرز گردد، بهترین کار دور ریختن کشت، چک کردن مواد تشکیل دهنده کشت سلول ازحیث آلودگی، گندزدایی کامل همه قفسه‌ها و سطوح کار و تهیه یک کشت تازه ازموجودی ذخیره منجمد است. در مواردی که ارگانیسم آلوده کننده قادر به تشکیل هاگ (spore) باشد و یا نمونه مورد مطالعه بدون هیچ ذخیره قابل جایگزین و تنها نمونه موجود باشد از درمان با آنتی‌بیوتیک جهت کاهش آلودگی استفاده می‌شود.

قبل از پرداختن به چگونگی بهره‌گیری از آنتی‌بیوتیک درمانی لازم است یادآور شویم کلیه کشت‌ها و مواد آلوده باید قبل از دور ریختن اتوکلا شود (۲۸). با توجه به جداول دو، سه و چهار ابتدا آنتی‌بیوتیک مناسب را انتخاب می‌کنیم:

جدول ۳: آنتی‌بیوتیک‌های مناسب جهت قارچ‌ها

Amphotericin B (Sigma)	2.5 mg 1^{-1}
Ketaconzole (Sigma)	10 mg 1^{-1}
Nystatin (Sigma)	50mg 1^{-1}

جدول ۴: آنتی‌بیوتیک‌های مناسب جهت مایکوپلاسما

Sigma)Ciprofloxacin (Bayer)	20 mg 1^{-1}
MRA (Mycoplasma Removal Agent- ICN-Flow)	0.5 mg 1^{-1}

پس از تهیه محیط کشت سلول، سلول‌ها را در حضور آنتی‌بیوتیک انتخاب شده به مدت ۱۰ تا ۱۴ روز کشت می‌دهیم. اضافه کردن آنتی‌بیوتیک باید بر روی بیشترین رقت سلولی انجام گیرد که در آن رقت هنوز رشد سلولی رخ می‌دهد. پس از این مدت با توجه به روش‌های ذکر شده قبلی، محیط را از لحاظ وجود آلودگی بررسی می‌کنیم. اگر هنوز آلودگی وجود داشته باشد، مصرف آنتی‌بیوتیک موفقیت‌آمیز نبوده و آنتی‌بیوتیک دیگری استفاده می‌شود. تست‌های غربال‌گری آلودگی جهت باکتری و قارچ در روزهای پنجم تا هفتم کشت و جهت مایکوپلاسما در روزهای ۲۵ تا ۳۰ با یک روش مناسب

Archive of SID
www.SID.ir

انجام می‌گیرد. بهتر است با روش‌های تعیین حساسیت مناسب‌ترین آنتی‌بیوتیکی را انتخاب کنیم که با کمترین غلظت قادر به اثر بر عامل آلوده کننده باشد (۲۹).

در مورد مایکوپلاسما با توجه به مقاومت این باکتری به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز حضور سطوح پایین مایکوپلاسما، در برخی موارد قابل ردیابی با روش‌های موجود نیست که اهمیت انتخاب آنتی‌بیوتیک بیشتر می‌شود. تاریخچه آنتی‌بیوتیک درمانی مایکوپلاسما حاکی از آن است که Moncyclin، Tiasolin و Tylosin نتیجه بهتری نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. امروزه آنتی‌بیوتیک‌های ciprofloxacin و MRA به عنوان درمان‌گر سلول‌های آلوده به مایکوپلاسما معرفی شده‌اند. اما نکته مهم در اهمیت نگهداری سالم سلول‌ها در محیط عاری از آنتی‌بیوتیک پس از آنتی‌بیوتیک درمانی است. چرا که در بسیاری موارد ممکن است سطح آلودگی کمتر از حد قابل آشکارسازی باشد و ادامه رشد چنین سلول‌هایی در محیط فاقد آنتی‌بیوتیک باعث گسترش رشد مایکوپلاسماها تا حد قابل آشکار می‌گردد. استفاده از روش‌های دیگر مثل استفاده از موش‌های nud بدون تیموس، خرگوش یا سرم خوکچه هندی و نیز استفاده از ترکیبات مشابه اسیدنوکلییک هنوز در درجه متغیری از موفقیت قرار دارند (۲۹، ۳۰).

در پایان لازم به ذکر است که چندین مرکز بانک سلولی معتبر در جهان وجود دارد که تمامی برنامه‌های مدون کنترل کیفی سلول‌های موجود را به طور دقیق انجام می‌دهند و سپس سلول‌های کنترل شده را به سایر مراکز ارسال می‌کنند.

References

1. Holland NT, Pfleger L, Berger E, Ho A, Bastacki M. Molecular epidemiology biomarkers – sample collection and processing considerations. Toxicology and Applied pharmacology 2005; 206: 261-268

2. Albertini RJ, Anderson D, Dauglas CR, Hagmer I, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppah Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A. Ipcs guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International programmedonchemicalsafety. Mutat. Res 2000; 463(2): 111-113

3. Bingham Riboli E. Ditand cancer- The European prospective investigataion into cancer and nutrition. Nat. Rev, Cancer 2004; 4(3): 206-215

4. Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. Matat. Res. 2003; 543(3): 217-234

5. Eskenazi B, Bradman A, Gladstone E, Jaramillo S, Birch K, Holland NT. Chamaccos a longtiudinal birth cohort study: lessons from the s.J. child.Health1 2003; (1): 3-27

6. Duramad P. Mcmahon CW, Habbard A, Holland N. Flowcytometric detection of intracelluar Th/Th cytokines using whole blood. validation of immunological marker for use in epidomological studies. cancer EpldemlTSP Biomarkerprej . 2004; 13(9): 1452-1458

7. Wise KS, crassel GH. Modification of amino acid concentrations induced by myco plasma in cell culture medium. Nature new biology, 1971; 232: 242- 244

8. Wiley J. Sons cell and Tissue culture for medical Research, Inc, 2005; 48-65

9. Avadi SJ, Mosaffa N, Taheri S, Karimzadeh K. The effect of Glycation of culturc medium on phago cytic and respiratory brust of peritoneal macro phages from Balb/c mice. Immunology J Montral, 2004; 180-184

10. Doyle A, Griffiths JB. Cell and Tissue culture: laboratory procedures. Wiley 1998; 720- 725

11. Ulloa F, Montoya C, Verfailie M, wei- shov hu. Culture system of pluripotential stemcells. Journal of Bio Science and Bio engineering. 2005; 100(1): 12- 27

12. Seag Heo D, Gahopark J, Hata K, Day R, Ronald B, Herbermanand Th. Evaluation of tetra zolium based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human anti tumor cy totoxicity cancer. Res, 1990; 50: 3681-3690

13. Zymozan Z, Ghasemy B, Farrokhi F, Miraghasi A, Ejaz Ahmad N. Mosaffa Release of s-fas-l buy monocytes and lymphocytes Triggered by Betaglucan and zymozan. Iranian Jurnal of Immounology, 2006; 3: 121-125

14. Mossafa N, Labibi F. Isolation and purification of natural killer cell subpopulation using suppernatant culture of mononuclear leukocyte culture by pIIA and evaluation of cytotoxic activity" The journal of faculty medicine.1999; 1: 9-16

15. Babich H. B oren freunde, Neutral red assay for toxicology in vitro. In: Watson RR (ed) Invitro methods in Toxico logy, 1992; 17: 237- 251

16. Crarrity MC, Phillips CY, Vaidya A. Mycoplasmal infection of lymphoyte cultures": Infection with M. salivarium In vitro, 1980; 16: 346- 356

17. Ohno T, Takeuchi M. Test for mycoplasma contamination "Standardized protocols for quality control of animal cell lines. Re port from J TCA cell bank committ. Tissue culture Research communica tions 9: suppl. 1990; 9-11

Archive of SID

www.SID.ir

18. Freshney RI. culture of Animal cells- A manual of basic Techniques, 2 end edn. Alan Rliss Inc, 1987
19. Wyeth C, Alliknets E, Nichols Amy H, Plumm Er Dorothy J. Serum- free vero cell banking process. Ipc (1-7), 2004; 1210- 1219
20. Levine Ex, Thomas I. Altered nucleic acid meta bolism in human cell cultures infected with myco plasma proceedings of the national Academy of sciences of the USA 60, 1968; 583- 589
21. Rottims D. Sub version and exploitation of host cells by mycopalsmas, Trends microbiol. 1998; 6: 436-440
22. Van Kuppeveld FJ, Johansson KE, Galamajm Kissing J, Bolske G, Van Der Logtjt, Mechers WJ. Detection of mycoplasma in cell cultures by a mycoplasma group specific pcr. Appl. Environ. Microbiol. 1994; 60: 149-152
23. Prucker JM, Ades EW. Detection by polymerase chain reaction of all common mycoplasma ina cell culture facility, Pathobiology. 1995; 63: 9-11
24. Cour I, Max Well G, Hay RJ. Tests for bacterial and fungal conta minats in cell cultures as applied at the ATCC. Tissue culture Association manual, 1979; 5: 1157-1190
25. Wi NN, Reichman DM, Gunter ME. Epidemiologic issues in the design and use of biologic specimentbank. Epidemiol. Rev 12, 1990; 56-70
26. Mathew A, Van Buskrik R, Baust J. Improved hypothermic preservation of human renal cells through supression of both apoptosis and necrosis. cell preserv. Technol. 2003; 1(4): 239-253
27. Schulte PA, Perera FP. Molecular Epidemiology principles and practices. Academic press, San Diegor. 1993; 5: 153-159
28. Marcusm L, Nattenberg A, Rohens MW. Siective killing of mycoplasma from contminated cells in cell culture. Nature 1980; 285: 659-699
29. Van Diggeln OP, Shins Philips DM. Reduction ic celluar tumorgencity after mycoplasma infection and elimination of myco plasma from infected culture by passage in nud mice. Cancer Research 1977; 37: 2680-2687
30. Mowles JM. The use of cipro floxacin for the eli mination of myco plasma from naturally infected cell lines. Otech nology 1988; 1: 355-358

Archive of SID

www.SID.ir