سیتوژنتیک

(روش ها و کاربردها)

مولفان:

پیمان هادی

سعید پرشنگ

حدیث خاکپور عالی

انتشارات ارسطو

(چاپ و نشر ایران)

۱۳۹٤

سرشناسه : هادی، پیمان، ۱۳۶۸ -
عنوان و نام پدیدآور : سیتوژنتیک (روش‌ها و کاربردها)
مشخصات نشر : مشهد: ارسطو ، ۱۳۹۳.
مشخصات ظاهری : ۲۵۶ ص.مصور، جدول، نمودار.
شابک : 978-600-7558-44-7
وضعیت فهرست نویسی : فیپای مختصر
یادداشت : این مدرک در آدرس http://opac.nlai.ir قابل دسترسی است.
شناسه افزوده : پرشنگ، سعید، ۱۳۶۷ -
شناسه افزوده : خاکپور،حدیث، ۱۳۶۳ -
شماره کتابشناسی ملی : ۳۷۶۵۶۶۹

نام کتاب : سیتوژنتیک (روش‌ها و کاربردها)
مولف : پیمان هادی
ناشر : ارسطو (چاپ و نشر ایران)
صفحه آرایی ، تنظیم و طرح جلد : پروانه مهاجر
تیراژ : ۱۰۰۰
نوبت چاپ : اول – ۱۳۹٤
چاپ : مهتاب
قیمت : ۱۲۵۰۰ تومان
شابک : ۷-٤٤-۷۵۵۸-۶۰۰-۹۷۸
تلفن هاي مركز پخش : ۵۰۹۶۱٤۵ – ۳۵۰۹۶۱٤۶ - ۰۵۱
www.chaponashr.ir

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

پیشگفتار ۵

فصل اول: بررسی سیتوژنتیک کشت های اولیه و دودمان های سلولی ۸

فصل دوم: سیتوژنتیک و میکروتکنولوژی ۴۶

فصل سوم: آرایش CGH در تشخیص پزشکی جنین ۷۰

فصل چهارم: سیتوژنتیک در هماتوآنکولوژی ۹۵

فصل پنجم: مطالعات ژنتیکی در لوسمی حاد لنفوبلاستیکی، از تشخیص تا درمان بهینه بیماری ۱۱۴

فصل ششم: ناپایداری های سیتوژنتیکی در سلولهای لوسمیک میلوسیت حاد ۱۴۸

فصل هفتم: بررسی سیتوژنتیک: دوره جدید روش ها ۱۶۹

فصل هشتم: کروموزوم ها به عنوان ابزارهایی برای پی بردن به تنوع زیستی ۱۹۴

فصل نهم: خلاصه روش های کشت تا کاریوتایپینگ ۲۲۵

فصل دهم: بررسی سیتوژنتیکی سندرم ایکس شکننده ۲۳۶

تقدیم به:

شهیدان فاوا مرتضی محمدباقری و محمد محمدی‌سلیمانی

پیشگفتار

سیتوژنتیک، مطالعه کروموزوم‌ها به عنوان واحدهای وراثتی است که زمینه فعالی از تحقیقات را در طی بیش از یک قرن فراهم کرده و برای درک سازمانبندی کروموزوم‌ها، از اجزای ژنتیکی و غیر ژنتیکی استفاده کرده است و در نتیجه در سازماندهی ژنوم گونه‌های یافت شده، مشارکت دارد. در اواخر قرن اخیر، ادغام زمینه‌های سیتولوژی، ساختار سلول، عملکرد و تقسیم و ژنتیک و وراثت ویژگی‌های نسل را اداره کرده و منجر به ایجاد یک زمینه به نام سیتوژنتیک گشته است که به طور چشمگیری کاربردهای چندگانه‌ای مانند تشخیص گونه‌ها و تکامل آن‌ها بر پایه تعداد کروموزوم، ساختار و تنوع اسمی آن‌ها، نقش ناهنجاری‌های کروموزومی در علت شناسی نقایص تولد، سندرم‌ها و بافت‌های بدخیم را به دست آورده است. امروزه بررسی کلینیکی چندین موقعیت و مداخله درمانی آن‌ها برپایه سیتوژنتیک اجزا در سطح میکرو، با استفاده از فناوری‌های پیشرفته انجام می‌شود که با گذشت زمان گسترش می‌یابد. نخستین بنیاد برای این زمینه خیلی مهم سیتوژنتیک کلینیکی در سال ۱۹۵۶ زمانی که تیجیو و لوان، تعداد کروموزوم در انسان را ۴۶ عدد عنوان کردند که در آن زمان باور بیشتر بر این بود که همچون میمون ۴۸ کروموزوم دارند، ایجاد شد. تفسیر بر این بود که این تعداد به ۴۶ کاهش یافته است زیرا شکل‌گیری کروموزوم ۲ با توجه به ادغام با کروموزوم نیایی است. آماده‌سازی کاریوتیپ انسانی برای نخستین بار در سال ۱۹۵۹ تشخیص ناهنجاری‌های عددی و در سال‌های بعد، همراه با سندرم داون، ترنر و کلاین فلتر را منجر شد که اشاره به نیاز برای غربالگری جهت ناهنجاری‌های کروموزومی در شرایط کلینیکی مشخصی دارد. در این زمان، ناهنجاری ساختاری مانند حذف کروموزوم ۲۱ که اشاره به کروموزوم فیلادلفیا دارد به طور مداوم در بیماران لوسمی میلوئید مزمن، یک روش غربالگری جهت تنوع کروموزومی مانند حذف‌ها، مضاعف شدن‌ها و جابه‌جایی‌ها در بیماران با انواع مختلفی از تومورها را ایجاد کرد. توسعه بیشتر تکنیک‌های نواربندی و کروموزوم‌های پرومتافاز، تشخیص بهتر این تنوع ها را با وضوح بالا میسر ساخت. کشت آمنیوسنتز پیشرفت دیگری بود که منجر به تشخیص

ناهنجاری‌های کروموزومی همراه با ناهنجاری‌های تولد بود. این تکنیک‌های کلاسیکی سیتوژنتیک ملزم به چند شرایط کلینیکی بود و توسط خیلی از آزمایشگاه‌ها به عنوان یک روش معمول سازگار شد. بعدها با سازگاری تکنیک‌های زیست‌شناسی مولکولی مخصوصا تکنیک هیبریداسیون، زمینه سیتوژنتیک خود را به زمینه سیتوژنتیک مولکولی تغییر داد. کشف پروب‌های DNA و اتصال آن‌ها با رنگ‌های فلوروسنت یک تکنیک جدید به نام نشان‌دارکردن فلوروسنت در محل هیبریداسیون (FISH) را به وجود آورد که بررسی کروموزومی را در سطوح گوناگونی از جمله اختصاصیت مسیر نواحی DNA برای جایگاه‌های کروموزومی ویژه، تشخیص مناطق کروموزومی بینابینی مانند ریزحذف‌ها، مضاعف شدن‌ها و چندین تنوع ساختاری که نمی‌تواند توسط تکنیک‌های کلاسیکی قدیمی به دست آید را ممکن ساخت. سایر نقش‌های قابل توجه FISH، شامل مطالعه هسته‌های اینترفازی، نمونه‌های کشت شده و سلول‌هایی از نمونه‌هایی که در پارافین قرار داده شدند، می‌باشد. با وجود این پیشرفت‌ها، تغییرات کروموزومی ناهمگن منجر به ایجاد سلول‌های سرطانی می شود که تفسیر مشاهدات را پیچیده‌تر و چالش برانگیزتر می‌کند. بنابراین تعیین تغییرات کلی ژنومی در بافت‌های سرطانی متاثر شده از سرطان نیازمند ساعت‌ها زمان است. دو نوع تکنیک شامل هیبریداسیون ژنومی مقایسه‌ای (CGH) که اشاره به CGH متافاز دارد و آرایش بر اساس CGH، تشخیص انواع تعداد نسخه‌ها (CNVs) در ژنوم با سلول‌هایی که تعداد غیر عادی نسخه‌های را نشان می‌دهند، به عنوان مثال حذف‌ها یا مضاعف شدن‌ها را ممکن ساخت. CNVs ممکن است با بخش‌های DNA این شرایط کلینیکی ویژه ای همراه باشد و در پیش بینی خطر و تشخیص کمک کند. همه این دستاوردها نکات اصولی و غیر اصولی دارند و به طور کلی خسته کننده، زمان بر و نیازمند افراد توانمند است. این مورد به طور طبیعی توسعه چندین روش خودکار شده برای کشت سلول در مقیاس انبوه، استفاده از راکتورهای زیستی غشایی و بررسی تصویر جهت تفسیر مشاهدات سیتوژنتیک را بر می‌انگیزد. اکنون غربال کردن و تشخیص ناهنجاری‌ها با دقت بهینه برای کمک در مداخله درمانی و اجرای شرایط کلینیکی به خصوص تومورهای بدخیم افزایش یافته است. اکنون انتظار می‌رود تکنیک‌هایی که گران قیمت بودند جای خود را به تکنیک‌های جدید مقرون به صرفه و کارامد بدهند.

این کتاب جنبه‌های مربوط به روندهای اخیر در سیتوژنتیک با جزئیات دقیق روش‌شناسی‌هایی که می‌تواند در آزمایشگاه‌های کلینیکی سازگار شود را پوشش می‌دهد. تمرکز این کتاب بر روش‌های بنیادی کشت‌های اولیه، دودمان‌های سلولی و کاربردهایشان، ریزفناوری‌ها و اتوماسیون CGH برای تشخیص شرایط جنینی، دستاوردهای سیتوژنتیکی

گوناگون با میزان لنفوبلاستیک حاد و لوسمی میلوبلاستیک در بازماندگان در معرض بمب اتمی، می باشد.

استفاده از فناوری تصویر دیجیتال در بررسی تغییرات سیتوژنتیک بر زنبورهای بی عسل از برزیل به عنوان یک مدل موجود زنده، تاکید دارد. استفاده از کروموزوم ها به عنوان ابزارهایی برای کشف تنوع زیستی در نمونه‌ای از خانواده ماهی اریترینیدا بحث شده است.

در کل محققان با مطالعات بیش تر روی روش‌های پیشرفته‌تری تمرکز دارند تا بتوانند با توسعه آزمایشگاه‌های مدرن سیتوژنتیک، تصمیم‌گیری‌های دقیق و موثرتری جهت درمان بیماران انجام دهند.

فصل اول:
بررسی سیتوژنتیک کشت های اولیه ودودمان های سلولی کلیات، کاربردها وپروتکل ها

۱.مقدمه

سیتوژنتیک درحال حاضر به منزله‌ی یک ابزار تشخیصی مهم برای تعیین و یا تایید یک سندرم خاص بکار می‌رود و ما را برای انتخاب درمان معطوف می‌سازد؛ در کل با استفاده از روش‌های مختلف به بیماران هشدار می‌دهد. این روش‌ها با بدست آوردن کاریوتیپ از خون محیطی و یا نمونه‌برداری از بافت‌های مختلف انجام می‌شوند (به عنوان مثال نمونه‌برداری از بیماران مبتلا به ملانوم، سرطان پستان، نمونه‌برداری پوست، نمونه‌برداری پوست ختنه‌گاه، محصولات سقط جنین و...). با این حال مطالعه ناهنجاری‌های کروموزومی در کشت سلولی به علت فرایندهای پیچیده مانند دستیابی به رشد سلولی و تعداد مناسبی از کروموزوم‌ها در مرحله متافاز برای بررسی کروموزومی، محدود شده است که به نوبه خود مانع فرصت برای بدست آوردن تعداد مفید گسترش متافاز به منظور انجام تجزیه و تحلیل سیتوژنتیک مناسب که قادر به نمایش مورفولوژی خوب، پراکندگی مناسب و صحیح باندهای حاصل باشد، شده است. دودمان سلولی به طور گسترده در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی به ویژه در نمونه‌های آزمایشگاهی برای تحقیقات سرطان استفاده می‌شود. (Burdall و همکاران,2003).

با توجه به اینکه نمونه‌های مهم مبتلا برای بررسی و دستکاری بالقوه مرتبط با فرایندهای سلولی ومولکولی بیماری‌های بدخیم استفاده می‌شود، بنابراین برای رسیدن به کاریوتیپ دقیق و جامع، نیاز به کشت رده‌های سلولی مختلف است. به نوبه خود تهیه کاریوتیپ یک دیدگاه نسبت به مکانیسم‌های مولکولی که منجر به تغییر شکل سلولی می‌شود را فراهم کرده و ناهنجاری‌های سیتوژنتیکی وابسته به ارائه داروها و مطالعه توسعه و پیشرفت انواع مختلف سرطان را امکان‌پذیر می‌سازد. استفاده از نشانگرهای زیستی مشاهده بروز سرطان را افزایش می‌دهد و ما را مجبور به انجام بیش‌تر مطالعه شناسایی نشانگرهای زیستی سیتوژنتیک مربوط به توسعه این بیماری می‌کند که برای درک بهتر از فرایندهای سرطان‌زایی و همچنین توسعه درمان‌های مفید ضد سرطان موثر است.

تهیه سلولهای متافاز برای بررسی کروموزوم نیاز به استفاده از یک سری از معرف‌ها، پروتکل‌ها و شرایط محیطی دارد که به ما اجازه‌ی جمع‌آوری کروموزوم‌ها را می‌دهد. برای تهیه تعداد مناسبی از تقسیمات سلولی، سلول‌های متافاز باید تحت شرایط خاصی کشت داده شوند که برای این منظور نیازمند یک محیط کشت خوب برای رشد و تقسیم سریع سلول‌ها هستیم، با توجه به تمام مسائل ذکر شده در بالا، به طور کلی ما نیازمند اطلاعات صحیحی از محیط کشت و شرایط آن و همچنین تکنیک‌ها و پروتکل‌هایی هستیم که رشد مناسب سلول‌ها را در محیط کشت و گسترش مجموعه کروموزومی را برای تهیه خصوصیات سیتوژنتیکی امکان‌پذیر سازد و اختلالات کروموزومی در سلول‌ها را شناسایی نماید.

در این فصل به جنبه‌های عملی انجام مطالعات سیتوژنتیک در کشت اولیه و دودمان سلول‌های سرطانی انسانی که قبلا در تحقیقات مرسوم بوده می‌پردازیم همچنین کاربرد آن در تشخیص و امکان درمان بیماری‌های مختلف نیز توصیف می‌شود.

۲.کلیات

استفاده از مطالعات سیتوژنتیک در بافت‌ها و دودمان سلول‌های سرطانی اهمیت زیادی دارد چرا که در سال‌های اخیر وقوع برخی از ناهنجاری‌های کروموزومی نشان داد که پیش آگهی از بیماری‌ها می‌تواند منجر به درمان موثر آن شود. معمول‌ترین برنامه کاربردی بالینی در مطالعات سیتوژنتیک روی بافت و دودمان سلول‌های سرطانی عبارتند از:

- تعیین انواع اختلالات کروموزومی و فرکانس آن‌ها
- تشخیص ژن‌های مستقر در مناطق کروموزومی بیمار به منظور درک نئوپلازیا

- ❖ مطالعه رفتارهای تومورزایی و متاستاتیک ،آپوپتوز و عملکرد آنها
- ❖ شناسایی مکانیسم واکنش های بکار رفته توسط هورمون ها
- ❖ ایجاد مدل هایی برای مطالعات مقاومت دارویی
- ❖ ایجاد پتانسیل درمانی درمانهای مختلف
- ❖ حمایت از تحقیقات بیشتر

دانش بازآرایی کروموزومی جدید و شناسایی نقاط شکست برای مطالعات بیشتر مولکولی، ژنتیک، و اپی ژنتیک در سرطان انسان می‌تواند مفید باشد چرا که ما را به درک مکانیسم‌های درگیر در توسعه و پیشرفت این بیماری سوق می‌دهد.

۱.۲ ویژگی‌های کشت سلولی

کشت سلولی براساس سوبسترای مورد استفاده برای رشد سلول‌ها به دو گروه تقسیم می‌شود:

کشت سوسپانسیون: سلول‌ها در محیط کشت مایع با هم زدن‌های دائمی کشت داده می‌شوند. محیط کشت سلول با سوسپانسیون رقیقی تهیه شده است.

کشت تک لایه‌ای: سلول‌هایی که به یک سطح جامد (شیشه‌ای یا پلاستیک) و یا نیمه‌جامد (آگار، لخته‌خون) متصل هستند که تشکیل یک سطح سلولی را می‌دهند که توسط میکروسکوپ نوری و یا فاز کنتراست مشاهده می‌شوند. کشت‌ها توسط سلول‌های آزاد شده از سوبسترا با استفاده از روش‌های مکانیکی و آنزیمی حفظ می‌شوند که چرخه‌ی زندگی‌شان در محیط کشت سلولی جدیدی ادامه می‌یابد.

۱.۱.۲ شرایط رشد سلولی

متغیرهای متعددی وجود دارد که توانایی یا عدم توانایی تکثیر سلول در آزمایشگاه را تعیین می کند. برخی از این متغیرها مستقیماً بستگی به شرایط محیط رشد دارند.

- محیط رشد باید حداقل مواد متعادل و ضروری را داشته باشد که شامل تمام مواد خام لازم برای شروع سنتز ماکرومولکول‌های سلولی است، همچنین برای متابولیسم (انرژی) و ویتامین‌ها ومواد معدنی (برای اعمال اولیه کاتابولیکی) و تعدادی از یون‌های معدنی برای اعمال متابولیکی سوبسترایی فراهم گردد.

- پارامترهای فیزیولوژیکی: دما، pH، افزایش اسمولاریته، پتانسیل کاهش- اکسایش که باید در حد قابل قبولی نگه داشته شود.
- غلظت سلولی و حالت محیط کشت ثانویه(جدید)
- برای تحریک تکثیر سلولی و تعامل با متغیرهای دیگر موجود در سیستم به محیط کشت اصلی سرم اضافه می‌شود. این در واقع به عنوان منبعی از فاکتورهای رشد ماکرومولکولی عمل می‌کند. سرم یک مکمل بسیار موثری برای شروع تقسیم سلولی است زیرا فاکتورهای لازم برای شروع رشد را دارد. سرم کامل حاوی بیشتر مواد مغذی با وزن مولکولی کم مورد نیاز برای تکثیر سلولی است. سرم ممکن است تریپسین و سایر پروتئازها را خنثی کند و یک پروتئین حامل تولید نماید که توانایی حل مواد نامحلول درآب (مانند چربی‌ها) را داشته باشد و بدین طریق هورمون و عوامل رشد را در سلول فراهم کند.

۲. ۱. ۲ آلودگی‌های محیط کشت

محیط کشت سلول ممکن است توسط قارچ‌ها، باکتری‌ها، مایکوپلاسما، ویروس‌ها، انگل‌ها یا سلول‌هایی از دیگر بافت‌ها آلوده شود. تصور اینکه بافت‌های به دست آمده از حیوانات ظاهراً سالم که با استفاده از تکنیک‌های ضدعفونی کننده استریل می‌شوند آلوده نیستند، اشتباه است چرا که مشاهده‌ی باکتری‌ها، مایکوپلاسماها، ویروس‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها در این بافت‌ها معمول است. باکتری‌ها و قارچ‌ها عموماً در طبیعت پخش شده‌اند و در برابر عوامل محیطی مثل دما، تابش نور، خشکی، و... نسبتاً مقاوم‌اند.

این موجودات می‌توانند در محیط کشت با توجه به عوامل مختلف ظاهر شوند:

- ❖ از طریق ذرات گرد و غبار موجود در جریان هوا
- ❖ آئروسل‌های ایجاد شده توسط متصدیان در طول حمل و نقل
- ❖ از طریق تجهیزات غیر استریل

ویروس‌ها و مایکوپلاسماها عمدتاً در سلول‌ها و مایعات بدن یافت می‌شوند بنابراین نسبت به قارچ‌ها و باکتری‌ها به عوامل محیطی حساس‌ترند. مهم‌ترین منابع آلودگی با مایکوپلاسماها ذرات معلق در هوا و سرم استفاده شده در محیط کشت است. مسیرهای ورود برای ویروس، محیط کشت سلولی آلوده، سرم یا افشانه است. سه عامل تعیین کننده اثر بخشی آزمون استریل عبارتند از:

- ❖ حساسیت و طیف محیط به کار رفته
- ❖ شرایط و زمان انکوباسیون
- ❖ حجم نمونه

محیط کشت مورد استفاده برای این آزمون باید حساس باشد و طیف گسترده‌ای از باکتری‌های بی‌هوازی، قارچ‌ها، مایکوپلاسماها در این آزمون شناسایی گردد.

کشت برای باکتری و مایکوپلاسما باید در هوازی و بی‌هوازی انکوبه شود تا همه‌ی میکروارگانیسم‌های موجود تشخیص داده شوند. توصیه می‌شود برای آزمون در زمان‌های مختلف شروع و برداشت از کشت سلولی استریل انجام شود (ابتدا، وسط، پایان)

۲. ۱. ۳ آلودگی محیط کشت سلول توسط سلول‌های دیگر

به طور کلی به دلیل عدم توجه محققان در حین کار، آلودگی در محیط کشت سلول بسیار معمول است، و بین کشت سلول هم در داخل و هم در بین گونه‌ها آلودگی متقاطع وجود دارد. *(MacLeod et al., 1999; Marcovic&Marcovic 1998; Masters et al., 2001; van Bokhoven et al., 2001; Masters 2002)*

در سال‌های اخیر چندین مورد از آلودگی‌های متقاطع بین کشت‌های سلولی مشاهده شده است، راه حل ممکن استفاده از منابعی هستند که دودمان سلولی تایید شده را فراهم می‌کنند تا وقتی که محیط کشت مشکوک به آلودگی است از آن‌ها استفاده شود.

حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد از کشت سلول در داخل و یا در سطح بین گونه‌ای آلوده بوده‌اند و اعتقاد بر این است که این مقدار بالاتر به دلیل آلودگی محیط کشت بوده است و راحت‌ترین راه برای جلوگیری از آلودگی استفاده از استریلاسیزاسیون خوب و تکنیک‌های آسپتیک و همچنین پاکسازی از آلودگی قبل از انجام هر کاری است. محل کار نیز باید به صورت روزانه پاکسازی شود مخصوصاً زمانی که دودمان سلولی مختلفی را به کار می بریم.

۲. ۲ دودمان سلولی سرطان انسانی :

بسیاری از رده‌های سلولی سرطان انسانی توسعه یافته اند و به طور گسترده در پژوهش‌های آزمایشگاهی استفاده می‌شود، به طور عمده در مطالعات رفتارهای تومورزا و متاستاز، آپوپتوز، قابلیت و پتانسیل درمانی به ویژه در نمونه های آزمایشگاهی در پژوهش‌های سرطان استفاده می‌شوند. چند نمونه از این دودمان سلولی عبارتند از: Mcf-7 ، skbr3 ، Bt474 ، Td47 .

۲. ۲. ۱ ویژگی‌ها:

MCF-7 یک دودمان سلولی کشت شده از سرطان پستان انسان است که به طور گسترده‌ای در کاربردهای پژوهشی برای مطالعات زیست‌شناسی سرطان پستان ومکانیزم های هورمونی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

این دودمان سلولی در اصل از افیوژن بدخیم پلور موجود در یک زن یائسه مبتلا به سرطان پستان در بنیاد سرطان میشیگان بدست آمد. سلول‌ها گیرنده‌هایی برای پاسخ‌های بیولوژیکی به انواعی از هورمون‌ها شامل:

استروژن، آندروژن، پروستروژن، کورتیکوستروئیدها، انسولین، فاکتور رشد اپیدرمی، فاکتور رشد شبه انسولین، پرولاکتین، هورمون تیروئید با پایه Her2 غیرتقویت کننده بروز می‌دهد.(اسبورن و همکاران،۱۹۸۷)

رده سلولی Skbr3 با باز آرایی زیاد در رده سلولی نزدیک تریپلوییید است که توسط فوگ و تریمپ از یک افیوژن پلور و بیان بالای محصول ژن Her2tc-erb-2 بدست آمد. این رده سلولی فقط بیان Esr2 ضعیف بدون ESR1 (عدم وجود عملکرد ERα) و بیان PGR را نشان می‌دهد که بیان‌کننده نمونه‌های سرطانی استروژن و پروژسترون مستقل، با قابلیت برای شکل‌گیری جایگاه E2 و امکان عمل از طریق مسیرهای واسطه‌ی غیر ER است. سطح بیان Erβ در رده‌های سلولی سرطان توصیف کننده کاهش قابل توجه تکثیر آن است.(Hevir et al., 2011)

Erβ می‌تواند با تنظیم تکثیر سلولی، شروع آپوپتوز را منفی کند و در نتیجه نه تنها نقش یک محافظ در بافت‌های وابسته به هورمون مانند پستان و پروستات دارد بلکه به عنوان یک سرکوبگر تومور در بافت‌های وابسته به هورمون عمل می‌کند.(Lattrich et al., 2008)

رده سلولی Bt474 کارسینومای مجرایی پستان انسان توسط Lasfargues و همکاران جدا شد. این سلول از کارسینومای مجرایی مهاجم پستان یک زن۶۰ ساله بدست آمد (البته این سلول‌ها در موش‌های بدون تیموس و موش‌های حساس به ویروس تومور پستان پیدا شده بودند) برای انسان با Ief از Ast، Gpdh، Ldh و Np تایید شده است.(Lasfargues et al., 1979)

T47dرده سلولی است که از تومور اپتیلیالی مجرای پستانی انسان بدست آمده است، این سلول از یک افیوژن پیلور یک زن بیمار ۵۴ ساله با کارسینومای مجرای ترشحی پستان جدا شد.(Keydar et al., 1979)

این سلول‌ها حاوی گیرنده‌هایی برای انواع استروئیدها و کلسی تونین است. آن‌ها تومورهای جهش یافته سرکوبگر پروتئین p53 را بیان می‌کنند. تحت شرایط نرمال کشت، این سلول‌ها

ترکیبات گیرنده‌های پروژسترون را بیان می‌کنند و به استروژن پاسخگو هستند. آن‌ها در فقدان طولانی از استروژن در شرایط آزمایشگاهی گیرنده‌ی استروژن (ER) را از دست می‌دهند. شرایط محیط کشت، موقعیت گیرنده، سن بیمار و منشا بیماری، و نوع تومور برای هر رده سلولی در جدول ۱ و شکل ا نشان داده شده است.

Cell line	Source code	Passage no	Receptor status	HER-2 status	Tissue source	Tumor type	Patient age	Culture conditions
T47D	ATCC: HTB-133	P20	ER+ PR+	Negative	PE	IDC	54	RPMI 1640 + 10% FBS + 2 mM L -glutamine +antibiotic-antimycotic solution (1x)
MCF-7	ATCC: HTB-22	P16	ER+ PR+	Negative	PE	AC	69	
SKBR3	ATTC: HTB-30	P15	ER– PR–	Positive	PE	AC	43	
BT474	ATTC: HTB-20	P12	ER+ PR+	Positive	IDC	IDC	60	DMEM + 10% FBS + 2 mM glutamine + antibiotic-antimycotic solution (1X)

جدول۱. ویژگی‌های رده‌ی سلولی سرطان پستانAC ، آدنوکارسینوما، ICD، کارسینومای مجرایی مهاجم؛

PE، افیوژن پلور: P، تعداد عبور. شرایط محیط کشت: FBS، سرم جنین گاوی، DMEM محیط کشت عقاب اصلاح شده Dulbecco. دودمان های سلولی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد کربن دی اکسید در محیط کشت انکوبه شده نگهداری شدند.

۲. ۲. ۲ اختلالات سیتوژنتیکی در رده‌های سلول‌های سرطانی انسانی :

رده سلولی MCF-7 دارای یک تعداد معینی از ۸۲ تا ۸۶ با ۵۶ نوع از ناهنجاری‌ها که ۲۸مورد ناهنجاری عددی و ۲۸ مورد دیگر ناهنجاری ساختاری است. شایع‌ترین ناهنجاری‌ها در سلول‌های MCF-7 عبارتند از: der(19) ، t(12;19)(q13;q13.3) و add(19)(p13) (شکل 2A).

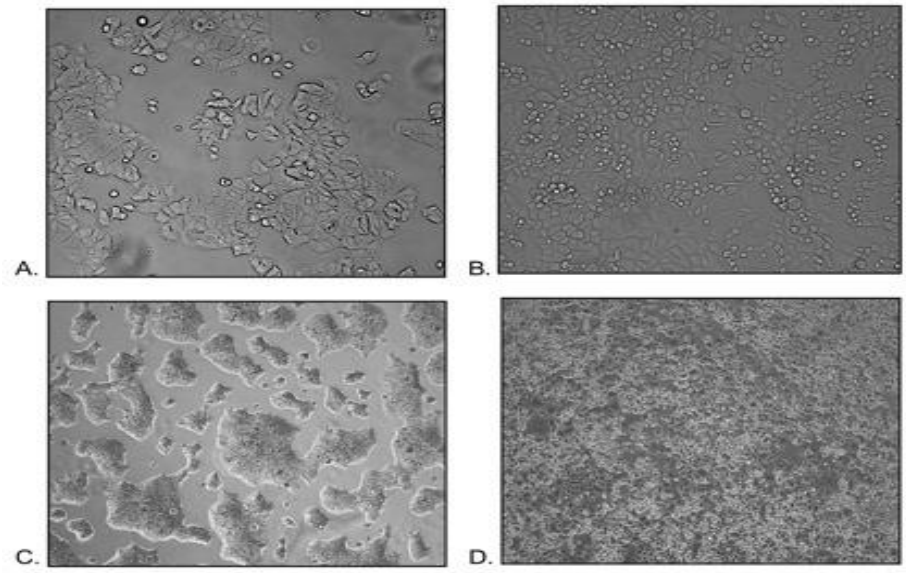
رده سلولی SKBR3 دارای تعداد معینی از ۷۱ تا ۸۳ ، با ۴۸ نوع باز آرایی است که شامل: ۲۷ مورد بازآرایی عددی و ۲۱ مورد بازآرایی ساختاری است. شایع‌ترین ناهنجاری‌ها در این رده سلولی عبارتند از: Del(1)(1p13) و add(17)(17q25) (شکل 2B).

رده سلولی BT474 تعداد معینی از ۶۵ تا ۱۰۶، با ۶۷ باز آرایی متفاوت شامل: ۳۵ ناهنجاری عددی و ۳۲ ناهنجاری ساختاری را نشان می‌دهد. شایع‌ترین ناهنجاری‌ها در این رده سلولی عبارتند از: مواد اضافی از منشا ناشناخته بر روی کروموزوم ۱۴: add(14)(q31) مشتقاتی از کروموزوم ۶ der(6)t(6;7)(q25;q31) و ۱۱: der(11)t(8;11;?)(q21.1;p15;?)، فقدان کروموزوم های ۱۵ و ۱۲ و کروموزوم X و یک افزایش در کروموزوم ۷ (شکل 2C).

رده سلولی T47dیک تعداد معین از ۵۷ تا ۶۶ با ۵۲ نوع بازارآیی شامل: ۲۶عددی و ۲۶ساختاری دارد. شایع‌ترین ناهنجاری‌ها در این رده سلولی عبارتند از:

Der(x)t(6;X)(q12;p11);der(8;14)(q10;q10)del(10)(p11.2)der(16)t(1;16)(q12q12) dup(1)(q21q43), der(20)t(10;20)(q21.1,q13.3) (شکل 2D).

رده سلولی SKBR3 و BT47 با استفاده از FISH تکثیر ژن HER-2 را نشان داد و رده‌های سلولی T47D و MCF-7 برای این ژن تکثیر نشان نداند.



شکل۱. تصاویر میکروسکوپی معکوس نشان دهنده رده‌های سلولی سرطان پستان در کشت تک لایه‌ای A) MCF-7 ؛ B) SKBR3 ؛ C) BT474 ؛ D) T47D

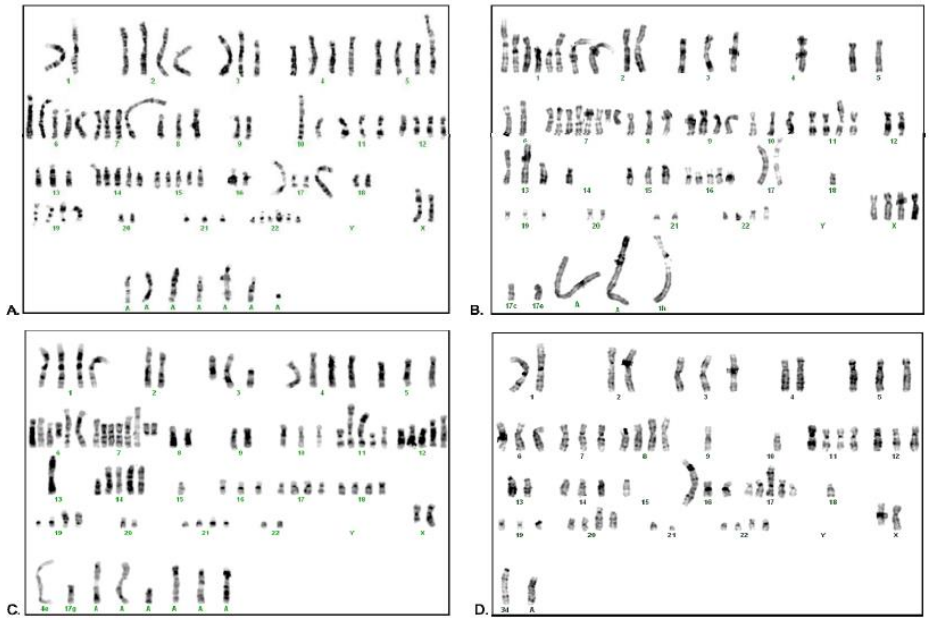
۳-تکنیک‌های سیتوژنتیک از نمونه‌های بافت توموری و رده‌های سلول سرطانی:

بدست آوردن سلول‌های متافاز برای تجزیه و تحلیل کروموزوم نیازمند استفاده از یک سری معرف‌هایی است که به ما امکان جمع‌آوری کروموزوم‌ها را می‌دهد. سلول‌های متافاز باید در آزمایشگاه تحت شرایط مشخصی به منظور بدست آوردن تعداد مناسبی از سلول‌های تقسیم کشت شوند. سلول‌های مورد استفاده برای جمع‌آوری کروموزوم باید قادر به رشد و تقسیم سریع در محیط کشت باشند. انواع مختلفی از سلول‌ها ممکن است نیازمند فاکتورهای رشد ویژه و مکمل‌های محیط کشت باشند. یکی از اساسی‌ترین نیازها برای هر نوع سلول انتخاب محیط کشت مناسب استریله شده می‌باشد. پس از این که محیط کشت به ۸۰٪ از تلاقی رسید، باید آن را برداشت و برای تهیه سوسپانسیون سیتوژنتیکی تثبیت کرد. کشت‌هایی که رشد داده شدند متوقف شده و در مرحله متافاز یا پرومتافاز توسط مهار کننده پلیمریزاسیون توبولین انباشته شده و در نتیجه از تشکیل دوک میتوزی جلوگیری می‌شود (به عنوان مثال با استفاده از کلسمید یا ولب). پس از قرار گرفتن در معرض کلسمید یا ولب، سلول‌ها به منظور افزایش پراکندگی کروموزوم در محلول هیپوتونیک قرار می‌گیرند و با ثابت کننده کارنوری

تثبیت می‌شوند (متانول، اسیداستیک). پس از تثبیت کردن، آماده‌سازی سیتوژنتیکی تحت شرایط ثابت و ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای چند ماه می‌توان آن را در پلیت‌های سلولی ذخیره کرد. سلول‌های ثابت شده روی اسلایدها و هوای خشک پخش شده‌اند. در نهایت برای شناسایی صحیح، کروموزوم‌ها با هم باند می‌شوند.

به دست آوردن یک کیفیت مناسب در گسترش‌های کروموزومی به فاکتورهای مختلف وابسته است که با جزئیات بیشتری در ادامه بحث خواهد شد.

گاهی اوقات مقدار متافاز به دست آمده برای تجزیه و تحلیل کروموزوم کافی نیست، بنابراین لازم است همیشه رده‌ی سلولی در حال رشد نگه داشته شود.



شکل۲) کاریوتایپ از رده سلولی سرطان سینه A) MCF-7؛ B) SKBR3؛ C) BT474؛ D)-T47D15

۳. ۱ مواد ، معرف ها و تجهیزات

۳. ۱. ۱ تجهیزات

۱) اتاقک جریان لایه‌ای
۲)انکوباتور
۷)میکروسکوپ دوربین دار
۸)میکروسکوپ معکوس

۳)انکوباتور co2 ۹)همزن مغناطیسی
۴)حمام سرولوژی ۱۰)میکروپیت
۵)سانتریفیوژ ۱۱)ترازوی تجزیه
۶)یخچال ۱۲)پمپ خلا

۳. ۱. ۲ مواد

۱) فلاسک های کشت بافت $75cm^2$ ۲) فلاسک های کشت بافت$25cm^2$
۳) پیپت های انتقال دهنده پلاستیکی یک بار مصرف استریل
۴) اسلاید شیشه ای ۵) ورقه های لامل ۶) ظرف پتری

۳. ۱. ۳ معرف ها

محلول‌ها باید در تاریکی -20^0c یا 4^0c، با توجه به دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده‌ی آن نگه‌داری شوند. با توجه به میزان استفاده معرف باید تقسیم شده و فریز شود. معرف را باید قبل از استفاده ذوب کرده و در دمای 4^0c ذخیره کرد. انجماد و ذوب مکرر ممکن است باعث تغییر محیط کشت یا غیر فعال شدن ترکیبات آن و در نتیجه کاهش کارایی آن‌ها گردد.

محیط کشت: محیط‌های کشت سلولی که بیشتر از سایر کشت‌ها استفاده می‌شوند شامل DMEM، RPMI1640، DMEM-F12 می باشد. اگر محیط کشت حاوی گلوتامین نباشد، باید L-گلوتامین اضافه شود (غلظت نهایی 2mM) این اسید آمینه‌ی ضروری است که ناپایدار بوده و عمر کوتاهی در دمای اتاق دارد. به هر یک از 500ml بطری محیط کشت، باید 50mm سرم جنین گاوی، 5ml L-گلوتامین (200mM) و 5ml از محلول آنتی‌بیوتیک ضد قارچ (100 x) اضافه گردد. محیط کشت باید به مدت یک ماه در دمای 4^0c نگه‌داری شود. به منظور ایجاد کشت اولیه توصیه می‌شود که هیدروکورتیزون، استرادیول و انسولین به محیط کشت اضافه شود تا مواد مغذی به اندازه‌ی کافی برای رشد سلول فراهم باشد.

سرم: سرم جنین گاوی، معمولاً برای 450ml از محیط کشت، 50ml سرم اضافه می‌شود. معمولاً سرم جنین گاوی به صورت 500ml عرضه می‌شود بنابراین این مقدار باید به ظروف 50ml تقسیم و در دمای -20^0 نگه‌داری شود و قبل از استفاده در دمای 4^0c یا دمای اتاق ذوب شود. بهتر است محیط کشت در دماهای بالا (37^0c یا بیشتر) ذوب نشود چرا که باعث تغییر ترکیبات آن می‌شود.

محلول ذخیره‌ای کلاژناز: نوع دوم کلاژناز برای ساختن محلول ذخیره‌ای؛ $\frac{u}{mg}$ 215 کلاژناز را در آب مقطر حل می‌کنیم تا یک غلظت نهایی $\frac{u}{ml}$ 2000 بدست آید. سپس از طریق یک فیلتر ۰/۲ میکرون آن را فیلتر کرده و یک میلی‌لیتر تهیه می‌شود. محلول را در دمای -20^0c به مدت ۲-۳ ماه می‌توان ذخیره و نگه‌داری کرد. هنگام کار قبل از استفاده محلولی از $\frac{u}{mg}$ 200 بلافاصله تهیه می‌شود. سپس برای ۹ میلی‌لیتر از محیط کشت کامل ۱ میلی‌لیتر کلاژناز اضافه شود. این محلول در دمای 4^0c نگه‌داری می‌شود.

عوامل متوقف کننده:

Colcemid: کلشی سین (Colchicine) مجموعه‌ی میکروتوبول‌ها را با اتصال به یک محل با میل بالاتر در بتا توبولین مهار می‌کند. اتصال کلشی سین به شیوه‌ای تقریباً غیر قابل برگشت رخ می‌دهد و اعمال تغییرات ترکیبی در توبولین در خود کلشی سین هم ایجاد می‌شود. (دلی و همکاران ۲۰۰۹) کلسمید در رده‌های سلولی که دارای همانندسازی با سرعت بالایی هستند و در یک غلظت نهایی از $\frac{ug}{ml}$ 0/01 به مدت دو و نیم ساعت اعمال می‌شود.

velbe: به عنوان یک آلکالوئید وینکا و نیز وینبلاستین هم نامیده می‌شود، این عامل از گیاه گل تفلونی (پروانش) "rosus catharanth us" مشتق شده و به عنوان یک عامل بسیار موثر و موفق ضد سرطانی در چند سال گذشته معرفی شده است. اتصال الکالوئیدهای وینکا (پروانش)به β-توبولین در نقطه تماس بین مولکولی سریع و برگشت پذیر رخ می‌دهد (Daly.2009). توصیه می‌شود برای استفاده از velbe در صورتی که سرعت همانندسازی سلول پایین است در غلظت نهایی $\frac{u}{mg}$ ۰/۰۱ ظرف حداکثر ۱۶ ساعت باشد.

استفاده از این معرف‌ها می‌تواند سلول را در مرحله متافاز متوقف و در انقباض کروموزوم‌ها و شناسایی آسان این سلول‌ها در مرحله پیش متافاز یا متافاز کمک کند. استفاده، زمان تماس و غلظت velbe یا Colcemid متفاوت است و به چندین فاکتور از جمله نوع سلول و ویژگی‌های کلی رشد بستگی دارد.

محلول هیپوتونیک: محلول نمکی منجر به پراکندگی کروموزوم‌ها در داخل غشای سلولی شده و مشاهده و تشخیص آن را تسهیل می‌کند. به منظور به دست آوردن گسترش‌های کروموزومی از رده‌های سلولی، محلول‌های هیپوتونیک زیر می‌توانند استفاده شوند، انتخاب این محلول به درجه‌ی تراکم کروموزومی به دست آمده بستگی دارد:

کلرید پتاسیم ۰/۰۷۵M(kcl): استفاده از ۵/۵۹ گرم از kcl و تهیه یک لیتر از محلول آبی. محلول در دمای 37^0c استفاده شود.

۲۰mM پتاسم کلراید(kcl) و ۱۰mM سدیم سیترات(Na3C6H5O7): یک گرم پتاسیم کلرید و یک گرم سدیم سیترات برای تهیه ۵۰۰ میلی‌لیتر از محلول آبی استفاده می‌شود. محلول را در دمای 37^0c استفاده کنید. استفاده از این روش زمانی که کروموزوم‌های بلند ممکن است با هم پیچش و یا تداخل داشته باشند توصیه می‌شود.

ثابت کننده (فیکساتیو): معرف مورد استفاده عمل محلول هیپوتونیک را متوقف کرده و همچنین به نوبه خود، در طول مراحل مربوط به همولیز، آبگیری، فیکس کردن کروموزوم و حذف غشای باقی مانده که ممکن است در گسترش کروموزومی دخالت کند، نقش ایفا می‌کند. این معرف از سه بخش از متانول خالص و یک بخش از اسید استیک سرد تهیه می‌شود. این معرف باید اندکی قبل از استفاده تهیه شده و همیشه در دمای سرد (منهای20^0c) نگهداری شود.

10x Trypsin-EDTA: به صورت تقسیم شده در یک میلی‌لیتر در فریزر نگهداری شود. نسبت ۱:۱۰ در PBS زمانی مورد نیاز است که محلول ×۱ بدست آوریم. در دمای ۴ درجه سیلیسیوس به مدت نامحدودی نگهداری می شود. قبل از استفاده باید در دمای اتاق یا دمای ۳۷^0c گذاشته شود.

بافر نمکی فسفات(PBS): pH آن ۷ می‌باشد. بافر نمکی برای رقیق کردن محلول است.

رنگ آمیزی ها:

رنگ آمیزی رایت: این رنگ که معمولاً به صورت پودر به دست می‌آید. فلاسک را با فویل آلومنیوم پوشیده و یک همزن مغناطیسی قرار می‌دهند. ۰/۵گرم از پودر و۲۰۰ میلی‌لیتر از متانول اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه به هم می‌زنند. در یک بطری پوشیده شده با فویل با استفاده از کاغذ صافی فیلتر کرده و درب آن را محکم می‌بندند و بطری را در یک مکان تاریک به مدت حداقل یک هفته قبل از استفاده نگهداری می‌کنند. رنگ باید قبل از استفاده به نسبت ۱:۴و ۶/۸PH رقیق گردد.

گیمسا: این رنگ که معمولاً به صورت مایع به دست می‌آید. قبل از استفاده، مخلوط‌های ذیل باید آماده شوند: ۰/۲میلی‌لیتر گیمسا، ۰/۲میلی‌لیتر بافر سورنسن و۴/۶ میلی‌لیتر آب (مقدار بستگی به رنگ‌آمیزی اسلاید دارد).

بافر نمک سدیم سیترات(SSC): بافر ضعیفی است که به صورت گسترده‌ای برای شستشوی مواد مختلف و کنترل شدت در طول هیبریداسیون استفاده می‌شود. استوک 20x شامل ترکیب ۳M سدیم کلرید، ۳۰۰mM تری سدیم سیترات است. برای تهیه استوک ۳۸/۸۲۵ گرم سدیم کلرید (NaCl) و ۲۲/۰۵ گرم سدیم سیترات (Na3C6H5O7-2H2O) در ۲۰۰ml آب حل شود. در صورت لزوم با HCl یا NaOH اسیدیته در ۷ تنظیم شود، ۲۵۰ml تهیه شده با روش اتوکلاو استریل شود.

بافر سورنسن: این بافر برای G-Banding استفاده می‌شود. فرم فعال محلول به دو شکل KH2PO4 و Na2HPO4 است که طرز تهیه آن به شرح زیر است:

Sln A: حل کردن ۴۵۵۹ grs KH2PO4 در ۵۰۰ml آب مقطر استریل.

Sln B: حل کردن ۴۷۵۵ grs Na2HPO4 در ۵۰۰ml آب مقطر استریل.

۵۰۰ ml از محلول A را برداشته با ۴۹۶/۸ml از محلول B ترکیب کرده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.

HCl 0,2 N: در G-Banding کاربرد دارد. برای تهیه ۱۰۰۰ml از محلول؛ ۸,۲۵ ml 37% HCl و ۵۰۰ml H2O در ظرف شیشه ای قرار داده شود. در دمای اتاق نگهداری شود.

۳. ۲ روش‌های کشت سلول از بافت توموری

برای اطمینان از رشد سلول و به دست آوردن سلول در مرحله متافازی، تفسیر گزارشی از شرایط نمونه‌برداری اهمیت دارد. نمونه‌های توموری غیر نکروز باید در ظروف قابل حمل که استریله هستند، جمع‌آوری شوند به عنوان مثال یک لوله‌ی استریل محتوی محیط کشت استریل و ضد قارچ و دو برابر غلظت آنتی‌بیوتیک، که باید به آزمایشگاهی که دارای امکانات کنترل درجه حرارت است انتقال یابد.

نمونه بافتی باید نمونه‌ای مناسب، استریل و توانایی رشد داشته باشد. برای اطمینان از رشد سریع سلولی و جلوگیری از آلودگی به انواع سلول‌های دیگر، محیط کشت باید در فلاسک کشت کوچک (cm225) انکوبه گردد و یا به صورت مستقیم بر روی اسلایدهای میکروسکوپی نصب و ثابت گردد. چسبندگی، تکثیر، شدت تغییرات(میزان سرعت) میتوزی سلول باید روزانه از طریق یک میکروسکوپ معکوس نظارت و بررسی شود.

مراحل به دست آوردن متافازها شامل:

۳. ۲. ۱ تفکیک از نمونه جامد: روش های آنزیمی و مکانیکی

۳. ۲. ۲ شروع کشت

۳. ۲. ۳ برداشت کشت و متافازها

۳. ۲. ۴ تکنیک های نواربندی

۳. ۲. ۵ انجماد سلول های زنده

روش تعیین زمان برداشت، از طریق استفاده کلشی سین و قرار دادن در معرض محلول هیپوتونیک است که به نوع سلول و نرخ رشد آن بستگی دارد.

۳. ۲. ۱ تفکیک نمونه جامد

مواد

- کلاژناز(2000U/ml)
- محیط کشت مناسب (RPMI 1640, DMEM-F12) حاوی۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، محلول آنتی‌بیوتیک و ضد قارچ (1x)L,–گلوتامین (2mM)، هیدروکورتیزون، β۱۷- استرادیول و انسولین.
- (1X)PBS
- فلاسک های کشت بافت 25-cm2
- لوله سانتریفوژ مخروطی ۱۵ میلی لیتری
- پیپت های پلاستیکی ۵ و ۱۰ میلی لیتری
- ظروف پتری
- اسلاید های میکروسکوپی ثابت در اتاقک های ۶ چاهکی
- تجهیزات تشریح بافتی: انبرک، قیچی

روش

جداسازی مکانیکی (شکل ۳)

شکل ۳) تصاویرحاکی از کشت بافت ،که مراحل مکانیکی تفکیک بافت را نشان می دهد.

- ✓ بلافاصله نمونه را از ظروف انتقالی برداشته و در ظروف پتری قرار می‌دهیم به منظور شستشوی بافت‌ها ۵ میلی‌لیتر از PBS که حاوی عوامل آنتی‌بیوتیکی و ضد قارچی است را به کار می‌بریم.

- ✓ بافت‌ها را برداشته و به ظرف پتری دیگر که حاوی ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت است انتقال داده، سپس چربی، بافت نکروزی و یا خون که ممکن است با رشد سلول تداخل داشته باشند، راحذف می‌کنیم.
- ✓ با استفاده از قیچی و انبرک، بافت‌ها را به قطعات ۲-۱ میلی‌لیتری برش می‌دهیم.
- ✓ برخی از قطعات را به یک ظرف پتری برای هضم آنزیمی منتقل می‌کنیم.
- ✓ سایر قطعات را برداشته و در فلاسک‌های پلاستیکی 25 cm2 که حاوی ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت است توزیع کرده یا با استفاده از پیپت پاستور شیشه‌ای در لام‌های میکروسکوپی ثابت شده حاوی ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت توزیع می‌کنیم.
- ✓ فلاسک‌ها را به مدت ۳-۲ روز در دمای 37ºC در انکوباتور co2 دار 5% به پهلو قرار داده تا انکوبه شود.

هضم آنزیمی

- با استفاده از قطعات بافتی که قبلاً در داخل ظروف پتری جهت هضم آنزیمی نگهداری شدند، ۳-۲میلی‌لیتر محیط کشت حاوی کلاژناز با غلظت نهایی $۲۰۰\frac{U}{ml}$ باید اضافه شود.
- در انکوباتور co2 دار 5% در دمای 37ºC به مدت ۱۶-۲۴ ساعت قرار می‌دهیم و در طول این مدت چندین بار تکان می‌دهیم.

مدت زمان لازم برای عملیات آنزیمی بستگی به نوع تومور دارد اما به طور کلی یک شب انکوباسیون کافی است. فرایند جداسازی را در زیر میکروسکوپ مخصوص بررسی می‌کنیم. تعداد زیادی از سلول های منفرد و خوشه‌های کوچک سلول ممکن است در پایان این دوره به صورت شناور مشاهده شوند.

- پس از این زمان، جهت غیر فعال کردن آنزیم ۲ میلی‌لیتر سرم جنین گاوی(FBS) به طور مستقیم به نمونه اعمال می‌شود و سوسپانسیون سلولی به لوله‌های سانتریفوژ مخروطی ۱۵ میلی‌لیتر انتقال می‌یابند.
- سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰به مدت ۱۰دقیقه انجام شده و مایع رویی بیرون ریخته می‌شود.

- محیط کشت تازه به لوله اضافه شده و با استفاده از پیپت سوسپانسیون مخلوط شده و به فلاسک‌های کشت بافت 25 cm2 یا اتاقک‌های ۶ چاهکی انتقال می‌یابند.
- انکوباتور co2دار ۵٪ دردمای 37ºC به سلول‌ها این امکان را می‌دهد که به پایه‌های پلاستیکی متصل شده و در طول عملیات کلاژناز رشد کنند.

۳. ۲. ۲ شروع کشت

مواد

- محیط کشت مناسب (RPMI 1640, DMEM-F12)که حاوی ۱۰٪سرم جنین گاوی(FBS)، محلول‌های آنتی‌بیوتیک و ضد قارچی (1X)، L-گلوتامین (۲mM)، هیدروکورتیزون، β۱۷-استرادیول و انسولین.
- (1X)PBS
- پیپت‌های پلاستیکی ۵ و ۱۰ میلی‌لیتری

روش:

- بعد از ۲۴ ساعت از انکوباتور، کشت سلولی را بررسی می‌کنیم (هم آن‌هایی که تفکیک آنزیمی شدند و هم آن‌هایی که تفکیک آنزیمی نشدند). برای بررسی محیط کشت جهت ارزیابی میزان چسبندگی بافت و رشد سلول از میکروسکوپ فاز کنتراست استفاده می‌کنیم.
- در زیر هود و در شرایط ضدعفونی شده و استریل، سلول‌های چسبیده نشده و بقایای سلولی با استفاده از پیپت پاستور شیشه‌ای از فلاسک حذف شوند.
- برای شستشو و حذف قطعات متصل شده به آرامی ۲ میلی‌لیتر PBS به فلاسک اضافه کرده و سپس PBS را از فلاسک حذف می‌کنیم.
- ۴ الی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت را اضافه کرده و دوباره انکوبه می‌کنیم.

فلاسک‌ها و اتاقک‌های چند خانه ای هرروز به منظور مشاهده رشد سلولی و فعالیت میتوزی از طریق میکروسکوپ معکوس بررسی می شود. پس از اینکه کشت سلولی به هشتاد درصد از تلاقی رسید جهت به دست آوردن مرحله متافاز مورد بررسی قرار می گیرد.(شکل ۴)