ناخالصی سلولی، خطری خاموش وخفته در کشتهای سلولی

برگردان: دکتر منیژه احمدی بیدهندی و لیلا قاضی زاده

خلاصه:

پدیده ناخالصی در کشت‌های سلولی یا به عبارت بهتر Cell Cross-Contamination، مشکلی شایع در کاربرد و استفاده از رده‌های سلولی است. این پدیده نتایج تحقیق را غیر قابل ارزیابی و مقایسه گزارشات حاصل از آزمایشگاه‌ها را دچار اشکال می‌کند؛ ناخالصی سلولی توانایی تکثیر و تولید صنعتی رده‌های سلولی مورد نیاز را کاهش داده و احتمال تولید محصولات درمانی غیر قابل استفاده را افزایش می‌دهد. با افزایش هشیاری عمومی نسبت به خطرات این مسئله و ترویج کنترل کیفی در هر آزمایشگاهی که کارکشت و تکثیر سلولی را انجام می‌دهد، می‌توان این مسئله و پی‌آمدهای مربوطه را برطرف نمود.

تعریف مسئله ناخالصی سلولی:

در گذشته، توجه محققان بیشتر به آلودگی کشت‌های سلولی با میکرو ارگانیسم‌ها معطوف بود. لذا، تشخیص و بررسی آلودگی‌های قارچی و باکتریایی درکشت‌های سلولی معمولاً آسان و قابل حذف و تشخیص آلودگی‌های مایکوپلاسمایی نیز، مشکل اما قابل کنترل است؛ همچنین تلاش‌های زیادی، (Fogh, 1973, MacGarrity 1982 Hay 1991, Grachev 1991, Petricciani 1991, Freshney 1994) در کشت‌های سلولی برای حذف آلودگی‌های ویروسی صورت می‌گیرد؛ اما، آنچه کمتر مورد توجه قرار گرفته، پدیده مخلوط شدن رده‌های سلولی با سلول‌های دیگر یوکاریوت وغیر خویشاوند یا پدیده ناخالصی سلولی (CCC) است. بنابراین امروزه، یکی از مشکلات رایج در کشت‌های سلولی، بروز پدیده ناخالصی سلولی (CCC) در کشت‌های سلولی است، که هنوز منشاء علمی آن بدرستی شناخته نشده است. این پدیده در سال ۱۹۸۱ در اکثر آزمایشگاه‌های جهان درمورد رده سلولی‌ها اتفاق افتاد. متاسفانه علیرغم نیاز مبرم آزمایشگاه‌ها و محققان کشت سلولی به کنترل کیفی منظم رده‌های سلولی و بررسی وجود ناخالصی سلولی CCC، هنوز این امر در آزمایشگاه‌ها مرسوم نگشته است. کشت‌های سلولی برای سال‌های متمادی، بدون آنکه از نظر CCC مورد بررسی قرار گرفته باشند، توسط محققان مختلف تولید، رشد و تکثیر یافته و مورد استفاده قرار گرفته‌اند و مقالات مرتبط با آنها نیز، منتشر شده است! لذا چنین به نظر می‌رسد که با وجود این خطر بالقوه در کشت‌های سلولی و تاثیر آن در کیفیت تحقیقات علمی، کنترل مداوم کشت‌ها از لحاظ خلوص، نه تنها ضرورتی مهم برای بانک‌های سلولی است، بلکه بخشی از وظایف روزمره محققانی است که در آزمایشگاه‌ها از رده‌های سلولی استفاده کرده و آنها را تکثیر می‌کنند.

ناخالصی سلولی بدنامی آزمایشگاهی نیست، بلکه پدیده‌ای است که برای رفع آن کنترل‌های ویژه‌ای لازم است (مک کابک ۱۹۹۶)

ناخالصی سلولی CCC نتایج حاصله از بررسی

انوار دانش
کارشناسی - کارشناسی ارشد - دکترای تخصصی
AA 5151 AZ

کشت‌های سلولی را بی‌اعتبار نموده وامکان انتشارنتایج تحقیقاتی آن آزمایشگاه را کاهش می‌دهد. این پدیده در مقایسه نتایج حاصله از دو آزمایشگاه که از یک رده سلولی استفاده می‌کنند مشکل ایجاد کرده و در نتیجه قدرت تولید محصولات کشت‌های سلولی در مقیاس وسیع را کاهش می‌دهد، حتی ممکن است سبب تولید محصولات ناسالم برای استفاده انسانی شده و خطر پیوند عضو با سلول‌هایی از منشاء دیگر را افزایش دهد. همچنین مراحل مختلف ثبت و اعطای مجوز برای عرضه محصولات کشت رده‌های سلولی را نیز دچار مشکل می‌سازد.

عوامل موثر در ایجاد وضعیت کنونی CCC به طور خلاصه عبارتند از:

۱- بروزCCC در کشت‌های سلولی بلافاصله قابل تشخیص نیست، یعنی برخلاف بسیاری از آلودگی‌های قارچی یا باکتریایی که به سرعت ظاهر ماکروسکپی و میکروسکپی کشت را تغییر می‌دهند، ممکن است ظاهر ماکروسکپی سلول هیچگونه تغییری نشان نداده و حتی مشاهده تغییرات مرفولوژیک در زیر میکروسکپ معکوس نیز، میسرنباشد. این ناخالصی‌ها احتمالاً سال‌ها در اثر بی‌توجهی به طور متناوب تکرار شده، اما گاهی بصورتی غیر منتظره پس از تکمیل آزمایشات در نتایج تجربی آزمایشگاهی، خود را نشان داده و مشکل به وجود آورده‌اند (Benedetti et al,.1981). بررسی آسیب‌های مالی و اعتباری ناشی از این گونه ناخالصی‌ها غیر قابل محاسبه است. تخمین زده‌اند که آسیب مالی ناشی از تولید تنها یه رده سلولی آلوده‌ها حدود ۱۰ میلیون دلار بوده است. (Gold, 1986)

۲- چنین به نظر می‌رسد که گستره اطلاع رسانی عمومی و علمی در این مورد محدود بوده است! و فقط ژورنال‌هایی کاملاً تخصصی بروز CCC در کشت‌های سلولی را مورد توجه قرار داده‌اند. همچنین بیشتر محققان توجه خود را بر روی جلوگیری از آلودگی‌های میکروبی و قارچی معطوف نموده و برای کنترل منظم کشت‌های سلولی از نظر CCC آموزش‌های لازم را نداشته ویا آزمون‌های ضروری راانجام نداده‌اند.

۳- سومین دلیل برای وضعیت کنونی CCC احتمالاً مربوط به عدم تناسب بین روش‌های استاندارد و حساسیت ناکافی آزمایشات درتشخیص ناخالصی سلولی جهت کاربرد وسیع غربالی است. مثلاً حساسیت تکنیک انگشت نگاری DNA در این مورد حدود ۵ تا ۱۰ درصد است یعنی وقتی حدود ۵-۱۰ درصد ازسلول‌های یک کشت سلولی با سلول‌هایی ازمنشاء دیگرناخالصی پیدا کرده باشند، می‌توان بروز CCC درکشت را تأیید نمود. کاریو تایپینگ که هنوز کاربرد وسیعی پیدا نکرده، حساسترین روش رایج و استانداردی است که بروزناخالصی سلولی را در حدود ۵-۱در صد نشان می‌دهد.

در این بازنگری مسائل متعددی مورد توجه قرارگرفته و برایجاد کنترل کیفی درکشت‌های سلولی و افزایش آگاهی و اطلاع‌رسانی در این باره بسیارتأکید شده؛ لذا در این مقاله تجربیات کسب شده در دهه‌های اخیررا به طورمشروح بازبینی و روش‌های کنترل ناخالصی سلولی را مورد بررسی قرار می‌دهیم.

تجربیات مقدماتی در بررسی ناخالصی سلولی

بیش از سه دهه است که خطر ناخالصی سلولی CCC و رشد سلول‌های غیر خویشاوند در کشت‌های سلولی تشخیص داده شده است. قدیمی‌ترین گزارشات در مورد این پدیده مربوط به دو رده سلولی MCN (McCulloch et al, 1957) و ERK-1 (Westwood et al, 1957) درسال ۱۹۵۷ بوده است.

در دهه‌های ۱۹۵۰ و۱۹۶۰، گزارشات متنوعی حاکی از بروز ناخالصی در کشت رده‌های سلولی در مقالات مختلف منتشر شد. در این گزارشات ازتکنیک‌های متفاوتی مانند: کاریولوژی، آنتی‌بادی فلورسانس، هماگلوتیناسیون مستقیم و بررسی پلی مورفیسم ایزوآنزیم‌ها از طریق الکترفورز آنزیمی برای تشخیص و بررسی پدیده ناخالصی سلولی استفاده شده بود. در اواخر دهه ۱۹۶۰ کاربرد آنالیز سیتوژنتیکی جهت جستجوی ناخالصی‌های درون گونه‌ای intraspecies آغاز شد. در طی سال‌های ۱۹۷۵-۱۹۶۷ دو محقق بنام‌های Hsu,1967 و Benirshke (1975-1967) اولین اطلس‌های کاریوتایپی سلول‌های اپی تلیوئید جانوران متفاوت را تهیه کردند.

اولین یافته‌ها در مورد ناخالصی راجعه با رده سلولی HeLa، توسط گارتلر و پیترسون گزارش شده است. این محققان با بررسی ایزو آنزیمی G6PD برای ۱۸ رده سلولی، همان فنوتیپ سلولهای توموری تهاجمی Hela یعنی فنوتیپ G6PD, A را برای همه سلول‌های مورد مطالعه بدست آوردند. یافته‌های آنها توسط آنالیز کروموزومی تأیید شده و ۱۸ رده سلولی مورد مطالعه همان ترانس لوکیشن رده سلولی‌ها را نشان دادند. (Gartler, 1967; Peterson et al., 1968) سپس نلسون ریز و همکارانش در بررسی‌های مشترک با استفاده از آنالیز کروموزومی و تکنیک ایزوآنزیمولوژی لیستی از رده‌های سلولی را گردآوری کردند که به طور اولیه با رده سلولی‌ها ناخالصی پیدا کرده بودند (Nelson _Rees 1974, 1980.Flandermeyer 1976,1977). در این بررسی، از ۴۵ آزمایشگاه مختلف، در طی ۱۸ ماه، تعداد ۲۷۹ رده سلولی، جهت بررسی ناخالصی CCC مورد مطالعه قرار گرفت ومشخص شد که ۴۱ رده سلولی از رده‌های مذکورهویت مورد انتظار را نداشتند. پس از آن نلسون ریز و همکاران نتایج بررسی‌های خود را از ۴۶۶ آزمایشگاه مختلف خلاصه نموده وهویت شانزده درصد (۱۶٪) ازرده‌های سلولی مذکور را نادرست قلمداد نمودند.(Nelson _Rees 1978,. Hay1992) استالبرگ و همکارانش تعداد ۲۴۶ رده سلولی را از نظر وجود CCC و یا برچسب اشتباه با استفاده از روش‌های مختلف استفاده ازآنتی‌ژن‌های اختصاصی گونه، الکتروفورز ایزوآنزیمی و آنالیز کروموزو می‌مورد بررسی قرار داده وشیوع ناخالصی‌های بین گونه‌ای و درون گونه‌ای را به ترتیب ۱۴٪ و ۲۵٪ گزارش نمودند. آنها با این مطالعه نتیجه گرفتند که در مجموع ۳۰٪ از رده‌های سلولی آزمایش شده، به طور نادرست تعیین هویت شده‌اند(Stulberg et al,.1976). درهمان زمان O'Brien اصطلاح شاخص‌های ژنتیکی آلوزایمی Allozyme genetic signatures را تعریف کرد(O'Brien et al,. 1977). او برای تعیین هویت رده‌های سلولی، از سیستم‌های پلی مورفیک شش آنزیم مختلف استفاده نمود. Lavappa با استفاده از آنالیز کروموزمی، لیستی شامل پنج رده سلولی را که قبلاً نیز گزارش شده بود به همراه ۱۶ رده سلولی دیگر ارائه کرد که همه آنها در حقیقت شاخص ویژه سلول‌ها را نشان می‌دادند و از سلول‌ها بدست آمده بودند. این مطالعه بر روی ذخیره‌های رده‌های سلولی انسانی ATCC و جهت بررسی وجود ناخالصی مربوط به سلول‌ها انجام شده بود (Lavappa,1978).

Siciliano با استفاده از آنالیز ایزو آنزیمی، رده‌های سلولی تولید شده از منشاء متاستاتیک کارسینوم پستان انسانی را مورد آزمایش قرارداد (Siciliano et al., 1979) و مدارکی از بروز ناخالصی سلولی در ۲ رده از این سلول‌ها را گزارش نمود. O'Brien با استفاده از آنالیز ایزوزایمی ۴۷ رده سلولی رایج را در کنار ۷ رده سلولی که هر یک از آنها نشانگان ژنتیکی مخصوص سلول‌ها را نشان می‌دادند، مورد بررسی قرار داده و نشانگان ژنتیکی آنها را تهیه نمود. به این ترتیب اوکارایی آلوزایم‌ها را دربررسی ناخالصی درون گونه‌ای سلول‌ها نشان داد (O'Brien et al,. 1980). نلسون ریز و همکارانش (Nelson-Rees et al., 1981) درمقاله‌ای مروری، لیستی جامع از مدارک مربوط به وجود ناخالصی دررده‌های سلولی که اکثر آنها با رده سلولی‌ها ناخالص شده بودند را منتشر کردند. درهمه این مدارک از روش‌های سرولوژیک، ایمنولوژیک، انزآیمولوژیک و کروموزومی استفاده شده بود. آنها از ۱۰۳ منبع که بطور ویژه برای شاخص‌های هلا فرستاده شده بود، حدود ۱۰۰ رده سلولی را ناخالص گزارش کردند. در آن زمان کشت‌های سلولی ناخالص شده با سلول هلا، تقریباً شامل یک سوم از رده‌های سلولی انسانی بودند که جهت تحقیقات بیولوژیک و سرطان بکارمی‌رفت. بسیاری از این رده‌های سلولی بعدها نیزکشت شده و در مراکز مختلف توزیع شده بودند (Nelson-Rees et al.,1981). برای مثال در سال ۱۹۹۳ توسط محققان ATCC یک رده سلولی منوسیتیک انسانی که با نام J-111 طراحی و تولید شده بود با آزمایشات به عمل آمده مشخص شد که در واقع از سلول‌هلا بدست آمده‌اند (Drexel et al 1993) . محققان با فرض آنکه رده سلولی فوق الذکر، منشاء منوسیتی دارد از آن، جهت مطالعه تمایز سلول‌های میلوئیدی و تولید فاکتور نکروز دهندهٔ تومور و نیز تشخیص رسپتورهای استروژنی (Dickinson and Antalis, 1993; Drexel et al.,1993) استفاده کرده بودند.

پس از آن مقالات متفاوتی حاکی از بروز ناخالصی منتشر شدند؛ به عنوان مثال هوکو و همکاران، در یک ارزیابی جامع،

انوار دانش
کارشناسی - کارشناسی ارشد - دکترای تخصصی

در طی ۱۳ ماه، تعداد ۲۵۷ رده سلولی فرستاده شده را از نظر وجود ناخالصی درکشت‌های سلولی مورد آزمایش قرار داده و اطلاعات به دست آمده را خلاصه نمودند؛ در مجموع ۳۵٪ از رده‌های سلولی فوق الذکر، ناخالصی داشتند که حدود ۱۱٪ از آنها با رده سلول‌های انسانی ۲۵٪ از رده‌ها با سلول‌های دیگر گونه‌ها ناخالصی پیدا کرده بودند. اکثرکشت‌های ارائه شده منشاء انسانی داشتند. او برای این منظور از روش‌های مختلف: آنتی‌بادی فلورسانت، آنالیزایزوآنزیمی، سیتوژنتیک و HLA Typing استفاده کرد. از این مقاله دکترهوکو به عنوان مقاله مرجع جهت بررسی ناخالصی سلولی در کشور آمریکا استفاده شده است(Hukku et al., 1984).

در سال ۱۹۸۷، سازمان بهداشت جهانی، خط مشی کلی برای تعیین هویت رده‌های سلولی مورد استفاده در تولید واکسن‌ها و فرآورده‌های دیگردارویی را تعیین نمود (WHO SG, 1987). در همان سال، اداره تحقیقات مواد بیولوژیک وزارت غذا و داروی آمریکا(FDA)، نکاتی را در مورد ویژگی‌های رده‌های سلولی مورد استفاده در تهیه محصولات بیولوژیک مطرح نمود (OBRR, 1987). یکسال بعد، در اروپا مستندات مشابهی در رابطه با کنترل کیفی محصولات پزشکی (CPMP, 1987,1988) و بخصوص آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، انتشار یافت. تقریباً درهمان سال‌ها، مقالاتی در مورد کاربرد قطعات DNA جهت ردیابی ناخالصی در رده‌های سلولی منتشر شد. سپس استیسی جزئیات مشروحی از انگشت نگاری ملکول DNA(DNA Fingerprinting) در کنترل کیفی رده‌های سلولی (Stacey et al., 1991,1992b) منتشر نمود.

در سال ۱۹۹۰، سازمان بهداشت جهانی، در لندن، سمپوزیومی درباره سلامت محصولات بیولوژیک و ناخالصی‌های مختلف کشت‌های سلولی برگزار نمود و در آن برآلودگی‌های ویروسی رده‌های سلولی بیشتر تأکید کرد(Brunko and Sauer., 1991; Grachev, 1991;Magrath, 1991).

در سال ۱۹۹۱، اولین کارگاه بین المللی درباره دیدگاه‌های رایج در استفاده از رده‌های سلولی در مریلند برگزار شد(IWCI,1991). مسائل اصلی و اساسی مطروحه در این کارگاه بر روی موضوع کلی اعتبار رده‌های سلولی در تولید مواد بیولوژیک برای مصارف انسانی و پیامدهای محتمل دراستفاده ازاین محصولات متمرکز بود(Horaud, 1992; Petriceiani, 1992; Quinnan, 1992). همچنین درتعیین هویت رده‌های سلولی، بررسی ناخالصی سلولی به عنوان یکی از موارد مهم در کشت سلول قرار داده شد. در این کارگاه به ویژه بر حساسیت روش‌های بررسی ناخالصی سلولی تاکید شد. این کارگاه در زمینه تفهیم و پیشبرد مسائل مربوط به کنترل کیفی کشت رده‌های سلولی تاثیر به سزایی داشت (Hay,1992;Pearson,1992;Petriciani, 1992; Webb and Debenham,1992).

در سال ۱۹۹۴، رایدReid و همکارانش نشان دادند که یک رده سلولی پر مصرف ماکروفاژ-منوسیتی (ATCC CRL-1593) U-937 با رده سلولی (ATCC CCL-243)K-562 ناخالصی پیدا کرده و به همین سبب ATCC این رده سلولی رااز بازارجمع‌آوری کردند و کلون سلولی 2. ATCC CRL-1593 رابرای توزیع ارائه نمودند (ATCC, 1994). رده سلولی جدید، به روش‌های متفاوت آنالیزایزوآنزیمی، سیتوژنتیک و انگشت‌نگاری DNA و روش جدید غربالگری سیتولوژیک سلولی (برای ناخالصی های جزیی) مورد آزمایش قرار گرفت وخلوص آن تأیید شده بود. (Markovic et al., 1996 c)

روش‌های کنترل ناخالصی سلولی:

روش‌های رایج واستاندارد بررسی CCC عبارتند از: ایزو آنزیمولوژی، رنگ آمیزی آنتی‌بادی فلورسانس آنالیز کروموزومی و انگشت‌نگاری DNA (IWCI, 1991).

ایزو آنزیمولوژی: در اواخر دهه ۸۰ نشان داده شد که برای تأیید هویت گونه سلولی می‌توان از نمایه‌های ایزوآنزیمی کشت‌های سلولی استفاده نمود (O'Brien et al., 1997, 1980; Macy, 1978; Freshney, 1994). لذا پیشنهاد شد که به جز دربرخی موارد استثنائی، می‌توان جهت بدست آوردن اطلاعات مربوط به منشاءگونه‌ای رده‌های سلولی ازحرکت الکتروفورتیک سه آنزیم: لاکتات دهیدروژناز LDH،گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز G6PD و پورین نوکلئوزید فسفریلاز PNP استفاده نمود. اگر چه در آغاز، این روش برای جستجوی ناخالصی سلولی بین گونه‌ای (Inerspecies) مورد استفاده قرار گرفت، اما بعدها درتعیین ناخالصی داخل گونه‌ای (Intraspecies) نیز

بکار گرفته شده است. برای بررسی (Intraspecies) یا داخل گونه‌ای CCC با استفاده از روش آنزیمولوژی انجام تست‌های مختلف بر روی آنزیم‌های مختلف و یا کاربرد تکنیک‌های دیگر به همراه آن ضروری است. با کاربرد سیستم‌های مختلف آنزیمی دیگر می‌توان بر ویژگی (specifity) این روش افزود. چنانکه برای جداسازی درون گونه‌ای رده‌های سلولی انسانی تهیه الگوی آلوزایمی ۷ آنزیم یا بیشتر پیشنهاد شده است این آنزیم‌ها عبارتند از: آدنوزین دآمیناز ADA، گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز G6PD، ۶ فسفو گلوکانات G6PD استرازدی ED، پپتیدازها PEP و فسفو گلوکو موتازها PGM (O'Brien et al., 1977). همچنین برای جدا سازی درون‌گونه‌ای رده‌های موشی و هیبریدی نیزمی‌توان از الگوی ایزوآنزیم‌های: مالات دهیدروژناز MDH، مانوز فسفات ایزومراز MPI، پپتیدازبی PEPB، اسپارتات آمینو ترانسفرازAST ، گلوکز فسفات ایزومر از GPI، فسفوگلوکوموتازها استفاده نمود.

استفاده از آنزیم‌های پلی‌مورفیک دیگری نظیر:اسید فسفاتاز ACP، گلی اکسالاز GO و آلفا فوکوزیداز Fucosidase نیز سودمند است(Nichols and Ruddle, 1979;Hay et al., 1992).

از آنجا که در الکترفورز آنزیمی از عصاره‌های سلولی استفاده می‌شود، تشخیص درصدهای پایین از ناخالصی سلولی در کشت‌ها بسیار مشکل است. لذا بنا بر نظریه هیHay و همکاران اگر میزان ناخالصی سلولی در کشت از حدود ۲۵٪ بیشتر باشد می‌توان از تکنیک الکتروفورز آنزیمی استفاده کرد (Hay et al.,1996)؛ به عبارت دیگر پایین‌ترین غلظت ناخالصی که می‌توان در یک تست از طریق این تکنیک تشخیص داد، درطیفی بین ۱:٤ تا ۱:۶۴ از رقت سلولی است.(Nichils and Ruddle, 1979)

رنگ آمیزی آنتی‌بادی‌های فلورسانس:

تکنیک رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی فلورسانت نیز جهت تایید منشاء گونه‌ای رده‌های سلولی بکار برده شده است. (Coons and Kaplan 1950; Kawamura,1969;Stulberg etal,1961a.,1961b; Stulberg,1973;Hey etal,1992)

البته رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی فلورسانت غیرمستقیم برای این منظور مناسب‌تر است. این رنگ‌آمیزی تکنولوژی بسیار حساسی است که می‌تواند حتی یک سلول مثبت را در میان هزاران سلول منفی تشخیص دهد. همچنین این روش بسیار سریع است و برای غربالگری وسیع از سایر روش‌های استاندارد مناسب‌تراست. البته اگر این روش به تنهایی جهت بررسی ناخالصی سلولی بکار رود احتمال ایجاد نتایج منفی کاذب زیاد است لذا این آزمایش کیفی است (Appelbaum,1 4992.,Freshney199).

انگشت‌نگاری:

DNA تکنیک الکتروفورزژل پلی‌آکریل‌آمید برای DNA هر نمونه سلولی، یک نمودار اختصاصی هیبرید را بدست می‌دهد. به این ترتیب می‌توان کشت‌های سلولی رده‌های مختلف را از یکدیگر جدا نمود. این روش اساس تشخیص CCC داخل گونه‌ای است. پروب‌ها (قطعات DNA) بیشتر حاوی جایگاه‌های مولتی لوکوس ۳۳/۶ و جایگاه‌های منفر ChdTC-15 ، ChdTC 114، Lambda TM -18 می‌باشند (Jeffrey et al.1998; Honma et al, 1992) به طور کلی قطعات جایگاه‌های کاکتیل و لوکوس‌های منفرد برای بررسی CCC ارجح ترند.

Gilbert و همکارانش (1990) با استفاده از قطعات ماهواره‌ای multisatellite در جایگاه‌های ژنتیکی بسیار متغیر (multi locus prob 33.6) برروی ۴۶ رده سلولی انسانی انگشت‌نگاری DNA انجام داده و ویژگی‌های فردی هر رده سلولی را تهیه کردند. به این ترتیب مشخص شد که استفاده از قطعات معینی از ماهواره برای جداسازی رده‌های سلولی افراد متفاوت و تشخیص هویت ژنتیکی هر یک از رده‌های سلولی بسیار مناسب است. آنالیز کروموزومی این مزیت را دارد که قادر است رده‌های سلولی مختلف را از یک نمونه منفرد جدا کند. حساسیت انگشت نگاری DNA کمتر از آنالیزکروموزمی است و قادر است وجود ناخالصی سلولی درحدودی بین ۵ تا ۱۰٪ را در کشت‌های سلولی تشخیص دهد (Reid et al, 1990; Hey,1992).

روش انگشت‌نگاری DNA از رایج‌ترین روش‌های تعیین ناخالصی‌های داخل گونه‌ای در حال و آینده است. (Van Helden et al.,1988;Mann et al.,1989;Gilbert et al.,1990;Stacay et al.,1991;1992a;1992b;Hay,1992;

انوار دانش
کارشناسی - کارشناسی ارشد - دکترای تخصصی

Webb et al.,1992;Hay et al.,1996) هرچندکه این روش درآزمایشگاه‌های تخصصی انجام می‌شود و نمی‌تواند جهت بررسی‌های غربالگری CCC در آزمایشگاه‌ها بکار برده شود.

آنالیز کروموزومی برای تعیین ناخالصی‌های داخل گونه‌ای به عنوان حساس‌ترین روش رایج مورد استفاده قرار گرفته است (Hsu and Benirschke, 1967-1975; Fogh,1973; Nelson-Rees et al,1981; Lishter et al,1990).

برای این تکنولوژی سال‌ها تجربه اندوزی شده. در این تکنیک برای جداسازی افراد یک گونه از یکدیگر نمونه‌های سلولی پس از واکنش با تریپسین و رنگ آمیزی گیمسا آنالیز کاریو تایپی می‌شوند. شکل باندهای حاصله در هریک از کروموزوم‌ها سبب می‌شود که هریک از رده‌های سلولی شکل نواری خاصی را نشان دهند. آنالیز کروموزومی قادر است رده‌های سلولی متفاوت از یک فرد را نیز از هم جدا و بر جسته کند. یک سایتوژنتیست با تجربه می‌تواند اگر شاخص قابل تشخیص وجود داشته باشد حتی تا ۱٪ ناخالصی را در کشت سلولی تشخیص دهد. به هر حال برای دستیابی به این منظور حداقل ۱۰۰ متافاز باید مورد مطالعه قرار گیرد. آنالیز کروموزومی روشی گرانقیمت و مراحل انجام آن نیازمند زمان زیادی است، همچنین اگر یک گونه دارای کروموزوم‌هایی باشد که از نظر ظاهری غیر قابل تفکیک باشند، تفسیر آن مهارت‌های زیادی لازم دارد. لذا این روش محدود به آزمایشگاه‌های اختصاصی و بانک‌های سلولی است و در آینده‌ای نزدیک نمی‌توان کاربرد وسیع آن را برای غربالگری انتظار داشت.

روش FISH در آنالیز ژن‌ها و کروموزوم‌ها دستاورد مهمی است (Freshney,1994). اختصاصی بودن روش FISH را می‌توان در حساسیت، ثبات، دقت و چندگانگی آن خلاصه کرد. ابداع تکنیک‌های Fiber FISH و Card FISH دقت و ثبات تکنیک FISH را بطور تئوریک به حدود یک کیلو باز 1Kb رسانده است (Raap,1996;Schmidt etal,1998). اخیراً اسپکترال کاریوتایپینگ ابداع شده است که بطور همزمان همه کروموزوم‌های انسانی را در رنگ‌های مختلف نشان می دهد (Macvilleet,1996). قطعات رنگ‌آمیزی شده اختصاصی برای هرکروموزوم نشانه‌های اختصاصی برای هر کروموزوم فراهم کرده و پیش‌بینی می‌شود که در آینده پیشرفت ماشینی دستگاه‌های مورد استفاده (ترکیب طیف نگاری و آنالیز تصویری) امکان بررسی سریع و وسیع با این تکنیک را فراهم سازد.

هر یک از روش‌های استاندارد درتشخیص CCC (ایزوآنزیمولوژی، تکنیک فلورسنت آنتی بادی، انگشت نگاری DNA و آنالیز کروموزومی) مزایا و معایبی خاص دارد و لذا در بیشتر موارد می‌توان از آنها به صورت آزمایشات مکمل در تأیید یا تعیین هویت رده‌های سلولی استفاده نمود. البته لازم است که حساسیت هر یک ازاین روش‌ها افزایش یابد. همچنین هیچیک از این روش‌ها برای کنترل و غربالگری وسیع و مستمر CCC در آزمایشگاه‌های محققان (مصرف کننده‌ها) کارایی لازم را نداشته‌اند.

کنترل کیفی ناخالصی‌های سلولی در آزمایشگاه‌های مصرف کننده:

در سال‌های اخیر نیاز به وجود متدولوژی‌هایی که بتواند بروز ناخالصی در کشت‌های سلولی و آزمایشگاه‌های محققان را کنترل کند بطور روز افزون افزایش می‌یابد. توسعه وبهبود روش‌ها در این زمینه اغاز شده است.

در سال ۱۹۹۲ Hamp الیگونوکلئوتیدهایی را(GTG5/CAC5) طراحی کرد که اکثر اطلاعات الگوی هیبریدی رادارا بود. الیگونوکلئوتیدهای سنتیک برای کنترل کیفی روتین CCC سلول‌های T و سلول‌های هیبریدومای B طراحی شدند. همچنین از روش مشابهی برای جدا سازی T سل‌ها از ناخالصی‌های معمول ناشی از رشد بیش از حد سلول‌های آلوژنیک فیدر استفاده شد. این محقق بر سهولت و قابلیت ستکردن سریع ژل هیبریداسیون در مقایسه با تکنیک‌های ساترن بلات تاکید دارد (petal.,1992 Ham).

(Steube et al1995) روش سریع ایزوالکتریک فوکوسینگ را برای تشخیص ناخالصی بین گونه‌ای در کشت سلولی و شناسایی رده‌های سلولی ناشناخته بکار برد. این متد بر پایه جداسازی ایزوالکتریک با آنزیم‌های اختصاصی سلولی برای تمایز رده‌های سلولی انسانی از موشی یا سایر پستانداران می‌باشد. این محقق بر کاربردی بودن این روش برای کارهای روتین و آنالیزبسیاری از رده‌های سلولی ناشناخته با قابلیت تکرار نتایج تأکید دارد. با استفاده از این روش آنها ۱۷۷ سل لاین را تست کردند که فقط ۳ مورد با مشخصات بیان شده از

جانب اهدا کننده‌ها مطابقت نداشت.

در سال ۱۹۹۶ تهیه کارت‌شناسایی برای هر رده سلولی cell line purity check panel (ID card) به عنوان بستری برای غربالگری پیشنهاد شد (Markovic,1996a). این کارت خلاصه‌ای توصیفی از (حضور یا غیاب) ویژگی‌های کمی و کیفی یک شاخص منحصر به فرد در بین شاخص‌های سلولی تعیین کننده هویت یک رده سلولی را نمایش می‌دهد. دراین کارت ۴ تا۶ شاخص مورفولوژی، سیتوشیمی، ایزوآنزیمولوژی، ایمونوسایتوشیمی و ایمونولوژی ارائه شده است. بنابراین تشخیص وجود ناخالصی سلولی CCC بر اساس بروز ویژگی‌های مثبت و منفی یک سلول ناخالص کننده درکشت رده سلولی مورد نظر صورت می‌گیرد. یعنی حضور سلول ناخالص که با سایرسلول‌ها متفاوت است به صورت علامتی بر روی کارت مشخص می‌شود. البته این روش نوع و منشاء ناخالصی در سلول‌ها را بدست نمی‌دهد. بنابراین امروزه در استفاده از کشت‌های سلولی در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی حذف و به دور ریختن رده سلولی مشکوک، آسانتر وعملی‌تر از تشخیص منشاء و نوع سلول ناخالص کننده در کشت است. می‌توان برای هر رده سلولی یک cell line purity check panel یا کارت شناسایی درست کرد. با این کارت می‌توان در مدت ۴ ساعت و با حساسیت کمتر از ۰/۱٪ با قیمت ارزان و دسترسی آسان برای کنترل کیفی روزانه رده‌های سلولی اقدام کرد. این تکنولوژی که برای آنالیز تصویری اتوماتیک نیز جوابگوست، فرصت مناسبی برای غربالگری وسیع ناخالصی سلولی CCC و تعیین آن در هر آزمایشگاه کشت سلولی فراهم می‌کند.

نتایج و پیشنهادات:

ناخالصی‌های کشت سلولی CCC در آینده جذابترین و مورد توجه‌ترین موضوع خواهد بود. متدهای رایج بهبود یافته و روش‌های جدیدی ابداع خواهد شد که حساسیت و کاربرد روش‌های غربالگری وسیع بررسی ناخالصی سلول‌ها CCC را در آزمایشگاه‌های سراسر جهان افزایش می‌دهند. به واقع انتظار می‌رود که تولید کننده‌های رده‌های سلولی در کارت شناسایی مربوط به هرده سلولی، یک برگه تائیدیه حاصل از بررسی CCC را ارائه دهند. همچنین انتظار می‌رود محققان هنگام انتشار نتایج مربوط به آزمایش‌های کشت سلول برگه مربوط به کنترل کیفی ناخالصی سلولی را CCC نیز ضمیمه کنند (Morita et al.,1995; Shimada et al.,1992).

استفاده از cell line purity check panel درتحقیقات آزمایشگاهی کشت سلولی ضریب اطمینان را افزایش داده و از مشکلات بعدی جلوگیری می‌کند. کارگاه‌های اختصاصی CCC و مسائل مربوط به آن احتمالا در طی میتینگ‌ها و کنگره‌های سالانه برگزار می‌شود. انتظار می‌رود کنفرانس‌های بیشتری مشابه یکی از آنها که در سال ۱۹۹۱ برگزار شد در آینده سازماندهی شود.

آگاهی از مسائل جدی CCC و قابلیت دسترسی به تکنیک‌های کنترل کیفی CCC در هر آزمایشگاهی در وحله اول به تلاش و همکاری پیوسته و منظم بین استفاده کننده‌ها و تولید کننده‌های رده های سلولی بستگی دارد که باعث بهبود شرایط مربوط می‌شود.

برگرفته از مقاله مروری:

Cell Cross-Contamination in Cell Cultures: The Silent and Neglected Danger, Olivera Markovic and Nendad Markovic,
BioSciCon, Inc, Rockville, Maryland (O. M.);
FDA, CDER, DGCDP, Rockville, Maryland (N. M.)

انوار دانش
کارشناسی – کارشناسی ارشد – دکترای تخصصی