



Cell Culture III

Pharmaceutical Biotechnology -Spring 2018-2019

Lecture # 4

of Students Slides:44

Lina Albitar, *R.Ph., M.D., Ph.D.*

Faculty of Pharmacy
Aljazeera Private University

تنبيه هام

- سقطت سهواً كلمة "مشعر" قبل كلمة حموضة في
سلايدات رقم 37 و 39 في المحاضرة الماضية (رقم
3) فيرجى اضافتها لتصبح مشعر حموضة (أو pH)
وعلى هذا التصحيح سيتم التقييم في الامتحانات

Lecture 4-Outline

- Cell Culture Basics

- أساسيات زرع الخلايا

- Cell Culture Methods

- طرق الزرع العامة

Major Advantages of Cell Culture

المميزات الرئيسية لزراع الخلايا

(1) إمكانية التحكم في البيئة الفيزيائية الكيميائية من:

(1) درجة الحرارة

(2) pH

(3) الضغط الأزمولي Osmotic pressure

(4) ضغط ال O₂ و CO₂

• (2) إمكانية مناورة (معالجة) في البيئة الفيزيولوجية:

1. تراكيز الهرمونات والمغذيات التي فيها تتكاثر الخلايا

2. مع أن البيئة الفيزيولوجية ليست محددة جيدا كما هي

البيئة الفيزيائية الكيميائية

- أصبح من الممكن الآن زرع بعض الخطوط الخلوية في وسط زرع خالي من المصل وذلك بسبب:

1. فهم أفضل لمكونات المصل
2. التعرف على عوامل النمو الضرورية لتكاثر الخلايا
3. ادراك أفضل للبيئة الصغيرة **micro-environment** للخلايا في الزرع من:

1. تداخلات خلوية خلوية
2. انتشار الغازات
3. تداخلات مع المصفوفة **matrix**

Culture Environment

بيئة الزرع

- Adherent versus Suspension Culture
 - Media
 - pH
 - CO₂
 - Temperature
- الخلايا الملتصقة مقابل المعلقة
 - وسط الزرع
 - pH
 - CO₂
 - درجة الحرارة

Adherent versus Suspension Culture

الخلايا الملتصقة مقابل المعلقة

• كما ورد بمحاضرات سابقة
هناك نظامان أساسيان لنمو
الخلايا في الزرع:

1. الملتصقة: تنمو في

طبقات وحيدة على

الركيزة الصناعية

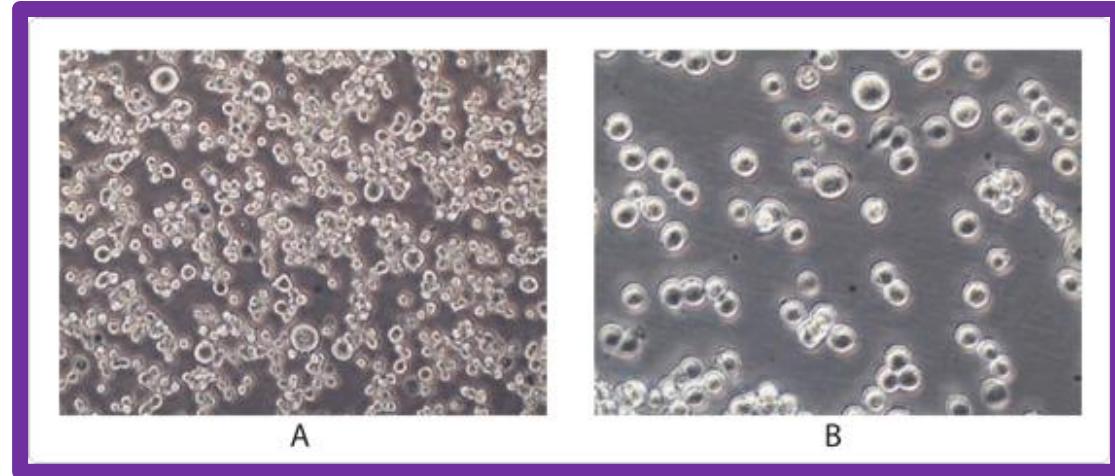
(وتشكل النسبة

الكبرى من خلايا

الحيوانات الفقرية)

2. المعلقة: تطفو بحرية

في وسط الزرع



الوسط المعلق

1. مناسب للخلايا غير الملتصقة (خلايا الدم) والخلايا التي تكيفت أن تنمو طافية بالوسط (بعض خلايا الحشرات)
2. اعادة الزرع passage فيه أسهل
3. يتطلب تعداد خلايا يومي وتحديد قابليتها للحياة والنمو viability لمتابعة نمط التكاثر
4. يمكن تمديد الوسط لتحريض النمو
5. لا تتطلب عادة أدوات فصل ميكانيكية ولا أنزيمية
6. التكاثر محكوم بتركيز الخلايا ولذا من الممكن زيادته
7. يستخدم له أوعية زرع خلايا غير معالجة بركيزة لكن الاوعية تحتاج تحريك دوري لتسهيل التبادل الغازي
8. يستخدم للعديد من التطبيقات مثل انتاج كميات كبيرة من البروتين

الوسط الملتصق

1. مناسب لمعظم أنماط الخلايا بما فيها الزروع الأولية primary cultures
2. يتطلب إعادة الزرع passage بشكل دوري لكن يسمح بسهولة فحص الخلايا تحت المجهر المقلوب
3. تتطلب أدوات فصل ميكانيكية أو أنزيمية (مثل تريسين)
4. التكاثر محكوم بمساحة سطح الزرع ولذا من غير الممكن زيادته
5. يحتاج أوعية زرع خلايا معالجة بركيزة
6. يستخدم للعديد من التطبيقات مثل دراسة علم الخلية وحصد منتجات الخلايا بشكل مستمر (من الوسط الطافي)

اوساط الزرع

- أهم مكون في عملية الزرع هو وسط الزرع لانه الذي يتحكم ببيئة الزرع بصورة رئيسية (في ما عدا الحرارة)

1. المغذيات الضرورية

2. عوامل النمو

3. الهرمونات للنمو الخلوي

4. تنظيم the pH

5. تنظيم الضغط الأوزمولي osmotic

- تجارب الزرع البدئية (القديمة) استخدمت أوساط طبيعية مستخلصة من خلاصات الأنسجة وسوائل الجسم

- حديثاً تم تطوير أوساط زرع محددة بسبب :

1. الحاجة لمعيارية الوسط

2. نوعية عالية للوسط

3. ازدياد الطلب

الفئات الأساسية لوسط الزرع

- الفئات الأساسية لوسط الزرع والتي تختلف في متطلباتها من المصل:

1. الأوساط القاعدية **Basal media** (يضاف لها مصل)

2. الأوساط مخففة المصل **Reduced-serum media**

3. الأوساط الخالية من المصل **Serum-free media**

مميزات المصل

1. للمصل أهمية حيوية لزرع الخلايا في الوسط القاعدي (basal media) كمصدر لل:

1. عوامل النمو والالتصاق

2. الهرمونات

3. الليبيدات

4. المعادن

2. تنظيم نفوذية الغشاء الخلوي (بواسطة بروتيناته)

3. يعمل (بواسطة بروتيناته) كحامل لليبيدات والأنزيمات والمغذيات الصغيرة والعناصر الزهيدة الى داخل الخلية

مساوى المصل

1. كلفته المرتفعة

2. صعوبة جعله عياري standardization

3. النوعية Specificity

4. متغير Variability (عدم ثباتية)

5. التلوث: والتي تشكل تهديد خطير لنجاح تجارب زرع الخلايا

6. التأثيرات الغير مرغوبة:

1. تحريض أو كبح النمو و/ أو

2. تحريض أو كبح الوظائف الخلوية

الأوساط القاعدية Basal media

- هي تحوي:
 1. حموض أمينية
 2. فيتامينات
 3. أملاح لاعضوية
 4. مصدر للكربون كالغلوكوز
- معظم الخطوط الخلوية cell lines تنمو بشكل جيد في الأوساط القاعدية basal media بشرط أن يضاف لها المصل

Reduced-serum media

الأوساط مخففة المصل

- هي تركيبات من الأوساط القاعدية basal media لكن مخصبة (غنية) بالمغذيات و العوامل المشتقة من الحيوانات والتي تخفض من:

1. الكمية المطلوبة من المصل

2. التأثيرات الغير مرغوبة للمصل في تجارب زرع الخلايا

Serum-Free Media

الأوساط الخالية من المصل

- يستبدل المصل بتركيبات مغذية وهرمونية مناسبة
- يوجد تركيبات أوساط خالية من المصل مناسبة للعديد من الأوساط الأولية primary والخطوط الخلوية cell lines

الأوساط الخالية من المصل

المحاسن

المساوئ

1. انتقائي لأنماط معينة من الخلايا عن طريق اختيار المجموعة المناسبة من عوامل النمو
 2. أداء أكثر ثباتية
 3. سهولة التنقية و المعالجة اللاحقة
 4. سيطرة أفضل على الوظائف الفيزيولوجية
1. تقييم محدد للوظائف الخلوية
 2. الكشف عن الوسائط mediators الخلوية أفضل
1. ضرورة تحقيق نقاوة عالية من الكواشف
 2. تتطلب صيغة محددة لكل نمط من أنماط الخلايا
 3. نمو أبطأ

pH

- تنمو معظم الخطوط الخلوية الثديية السوية بشكل جيد في
pH 7.4

- وجد أن بعض الخطوط الخلوية المتحورة تنمو بشكل أفضل في بيئات أكثر حامضية قليلاً (pH 7.0–7.4)

- بعض الخطوط الخلوية الحشرية (Sf9 and Sf21) تنمو بشكل مثالي في **pH 6.2**

CO2

- وسط النمو يضبط pH الزرع:

– يعتمد pH الوسط على التوازن الدقيق بين CO2 المنحل و البيكربونات HCO3

– عادة يتم تحقيق الوقاء للخلايا في وسط الزرع ضد تغيرات الـ pH عن طريق اضافة وقاء عضوي مثل **HEPES** أو وقاء **CO2-bicarbonate**

- في كل وسط زرع لا بد من تحقيق تركيز بيكربونات وضغط CO_2 محددان للوصول للـ pH والضغط الأزمولي الصحيح (تركيز المحلول محسوباً بالعدد الكلي من الجزيئات المنحلة بكل كغ من المحلول)
- التغيرات في CO_2 الجوي يمكنها أن تغير pH وسط الزرع
- CO_2 4-10% مناسب لمعظم تجارب زرع الخلايا والاكتر استخداماً هو 5-7%

درجة الحرارة

• تعتمد درجة الحرارة المثالية لزرع الخلايا على:

1. بشكل كبير على درجة حرارة جسم المضيف الذي عزلت منه الخلايا

2. لدرجة أقل على التغيرات التشريحية في الحرارة (حرارة الجلد ربما تكون أقل من درجة حرارة العضلة الهيكلية)

3. ارتفاع درجة الحرارة هي مشكلة أكبر من انخفاضها لذا

توضع درجة الحرارة أخفض بقليل من درجة الحرارة

المثالية

• للنمو المثالي:

– خلايا حيوانات الدم البارد (كالبرمائيات وسمك الماء البارد)

بين 15°C و 26°C

– تزرع خلايا الحشرات بدرجة 27°C

– تزرع معظم الخطوط الخلوية البشرية و بالتدييات بدرجة

حرارة 36°C - 37°C

– و تتطلب خطوط الخلايا للطيور 38.5°C

قاعدة



• تختلف شروط زرع الخلايا حسب نمط الخلية
cell type

• من الموصى به أن يعتاد المرء على الخط
الخلوي للبحث وأن يتبع التعليمات المصاحبة
لكل منتج يستخدم في التجربة

• نتائج الابتعاد عن شروط الزرع تتراوح بين
ظهور صفات شاذة الى انهيار كامل بعملية
زرع الخلايا

مورفولوجية الخلية

- الفحص الدوري لمورفولوجية الخلايا المزروعة (شكل ومظهر) هو عنصر أساسي لتجارب الزرع الناجحة
- التأكد بأن الخلايا بصحة جيدة بكل مرة يتم التعامل معها (تغيير الوسط، اعادة الزرع، ..) بفحصها بالعين المجردة وتحت المجهر يسمح بالكشف عن أية علامات للتلوث بشكل مبكر واحتوائها قبل انتشارها للزروع الأخرى في المخبر

Causes of Cells Deterioration

أسباب تدهور (تلف) الخلايا

1. تلوث وسط الزرع

2. شيخوخة الخط الخلوي

3. وجود مواد سامة في الوسط

4. أو يوحى ببساطة الحاجة لتغيير وسط الزرع **medium**

Signs of Cells Deterioration

علامات تلف الخلايا

1. تحبب حول النواة

2. انفصال الخلايا (عن قاع وعاء الزرع)

3. ظهور فجوات هيولية

– السماح باستمرار تلف الخلايا سيجعلها غير قابلة للتراجع

Culture Cell Methods

طرق الزرع العامة

- Guidelines for Maintaining Cultured Cells
- Subculturing Adherent Cells
- Subculturing Suspension Cells
- Freezing Cells
- Thawing Frozen Cells
- ارشادات للمحافظة على الخلايا المزروعة
- اعادة زرع الخلايا الملتصقة
- اعادة زرع الخلايا المعلقة
- تجميد الخلايا
- تذويب الخلايا المجمدة

ارشادات للمحافظة على الخلايا المزروعة

- Subculture
 - When to Subculture?
 - Media Recommendations
 - Dissociating Adherent Cells
- اعادة الزرع
 - متى نعيد زرع الخلايا
 - وسط الزرع
 - فصل الخلايا الملتصقة

Subculture

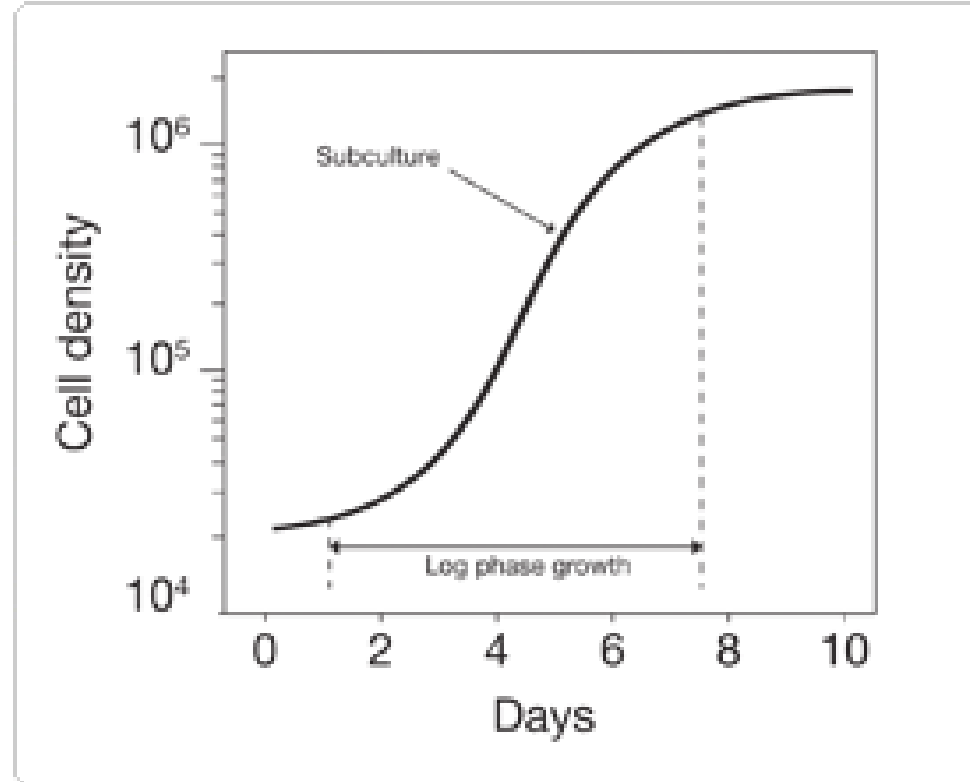
اعادة الزرع

- اعادة الزرع (passaging): هو ازالة سائل الزرع ونقل الخلايا من وعاء الزرع الحالي الى وعاء نظيف جديد (غير مستخدم سابقا) وبوجود وسط زرعى طازج مما يسمح بتكاثر اكبر للخط الخلوي أو للسلالة الخلوية

Cell Growth in Culture

نمو الخلية بالوسط

- يتقدم نمو الخلايا من طور التلكؤ أو التباطؤ **the lag phase** والذي يلي إعادة الزرع الى طور تكاثر **log phase** حيث تتكاثر الخلايا بشكل أضعاف مضاعفة (أسي)



When to Subculture?

متى نعيد زرع الخلايا

- المعايير التي تحدد الحاجة لإعادة زرع الخلايا متشابهة في الخلايا المعلقة والملتصقة إلا أن هناك اختلافات بين خطوط خلوية ثديية وخطوط خلايا الحشرات (لن تناقش هنا)

1) Cell Density كثافة الخلايا

2) Exhaustion of Medium استنزاف الوسط السائل

3) Subculture Schedule جدول إعادة الزرع

4) Dissociating Adherent Cells

فصل الخلايا الملتصقة

الخلايا الثديية – Mammalian cells

1) Cell Density كثافة الخلايا

- يجب اعادة زرع الخلايا الملتصقة عندما تكون بطور التكاثر **log** وقبل أن تملأ الطبق وتصل للاحتشاد **confluence**

- الخلايا السوية تتوقف عن النمو عندما تصل لمرحلة الاحتشاد **confluence** (التثبيط بالاتصال) وعند اعادة زرعها ستأخذ وقت أطول لتتعافى من التثبيط

- الخلايا المتحورة تستمر بالنمو حتى بعد أن تصل لمرحلة الاحتشاد **confluence** ولكنها تتدهور عادة بعد تضاعفها **حوالي مرتين**

- بشكل مشابه يجب اعادة زرع الخلايا المعلقة عندما تكون بطور التكاثر \log وقبل أن تملأ الطبق وتصل للاحتشاد
confluence

– عندما تصل الخلايا المعلقة لمرحلة الاحتشاد تتكتل مع بعضها و عندما يهز الدورق يبدو وسط الزرع عكراً

2) Exhaustion of Medium

استنزاف الوسط السائل

• انخفاض في قيمة pH وسط النمو يشير عادة الى تراكم

حمض اللبن (ناتج ثانوي في عملية الاستقلاب):

1. حمض اللبن يمكن أن يكون ساماً للخلايا

2. وانخفاض ال pH قد يكون غير مثالي لنمو الخلايا

- معدل سرعة تغير الـ pH يعتمد على كثافة الخلايا في ذلك الوسط اذ أن تركيز الخلايا المرتفع يستهلك الوسط بشكل أسرع من التركيز المنخفض

– يعاد زرع الخلايا عندما يلاحظ بدء انخفاض سريع في الـ pH بمقدار ($0.1-0.2$ pH units) > مع ازدياد كثافة الخلايا

3) Subculture Schedule

جدول إعادة الزرع

(1). الالتزام بجدول صارم لإعادة زرع الخلايا:

1. يضمن سلوك قابل للتكرار

2. يسمح بمراقبة حالة الخلايا الصحية

(2). ينصح بتغير كثافة زرع الخلايا الى أن تنجز سرعة نمو

وننتاج (yield) ثابتين ومناسبين لذلك النمط من الخلايا

- بالتالي فان الانحراف عن أنماط النمو التي تم تحديدها ومعرفتها لخط خلوي يشير إلى:

1. الوسط غير صحي unhealthy

1. تدهور

2. تلوث

2. أحد مكونات الزرع لا تعمل بشكل صحيح

1. الحرارة ليست مثالية

2. سائل الوسط قديم جداً

• (3) احتفظ بسجل زرع خلايا مفصل لتسجيل:

1. جدول اعادة زرع و تغذية الخلايا

2. نمط الوسط المغذي المستعمل

3. اجراء الفصل المستخدم (ميكانيكي أم أنزيمي)

4. نسب التقسيم المستخدم في اعادة الزرع

5. ملاحظات على شكل الخلايا

6. كثافات الزرع Seeding concentrations

7. المحصول (الانتاجية Yields)

8. اذا استخدمت صادرات حيوية

• (4) أنجز تجارب وأي اجراءات أخرى غير روتينية (تبديل

نوعية وسط الزرع) وفقاً لجدول اعادة الزرع

– اذا كان جدول التجارب لا يناسب جدول اعادة الزرع

الروتيني (أي لا يمكن انجازه في يوم المحدد لاعادة زرع

الخلايا)، تأكد أن لا تتم اعادة زرع الخلايا:

1. بينما الخلايا ما زالت في طور التباطؤ **the lag period**

2. عندما تصل الخلايا لمرحلة الاحتشاد **confluence** وتتوقف

عن النمو

4) Dissociating Adherent Cells

فصل الخلايا الملتصقة

- أول خطوة في إعادة زرع الخلايا هي فصلهم من سطح وعاء الزرع بواسطة ميكانيكية أو إنزيمية

التطبيقات	عامل الفصل المستخدم	الإجراء
الخلايا الملتصقة بحرية (بشكل خفيف) الخلايا بطور الانقسام Mitotic	يتم اما بهز أو رج وعاء الزرع أو بالسحب عبر المص القوي	الهز
الخلايا الحساسة للبروتياز؛ قد يدمر بعض الخلايا	كاشطة الخلايا	الكشط
الخلايا الملتصقة بشدة	التربسين	الفصل الانزيمي
الزرع ذات الكثافة المرتفعة والتي قد شكلت عدة طبقات خاصة Fibroblasts	التربسين + الكولاجيناز	
فصل خلايا بشروية عن أطباق الزرع كصفائح سليمة دون فصل الخلايا عن بعضها	Dispase ديسباز	