

المزارع الخلوية 2

أ.د فوزة منعم

تقانة حيوية |  نظري

9/10/2018

بالدابة بنحب نذكر بأهمية المصطلحات الانكليزية لأن الدكتوراة مانها من محبين
مصطلحات العربي بالمرّة...
أصدقائي اليوم محاضرتنا صغيرة ومللمة...على أمل تكمل الدكتوراة معنا
هيك ^_^ دراسة ممتعة

فهرس المحاضرة :

3

- Transfection and Transduction

10

- Applications

5

- Hybridoma

12

- Culture of non-mammalian cells

8

- Cell strains

13

- Common cell lines

في بداية المحاضرة، عرضت الدكتورة فيديو يبيّن آلية العمل على المزارع
الخلوية (عملية تجديد الوسط وتحرير الخلايا) بعقامة تامة، مع أخذ كافة
الاحتياطات اللازمة.... مع العلم أنه يوضح التفاصيل المملة، وترافقه موسيقا
تصويرية جميلة

رابط الفيديو:

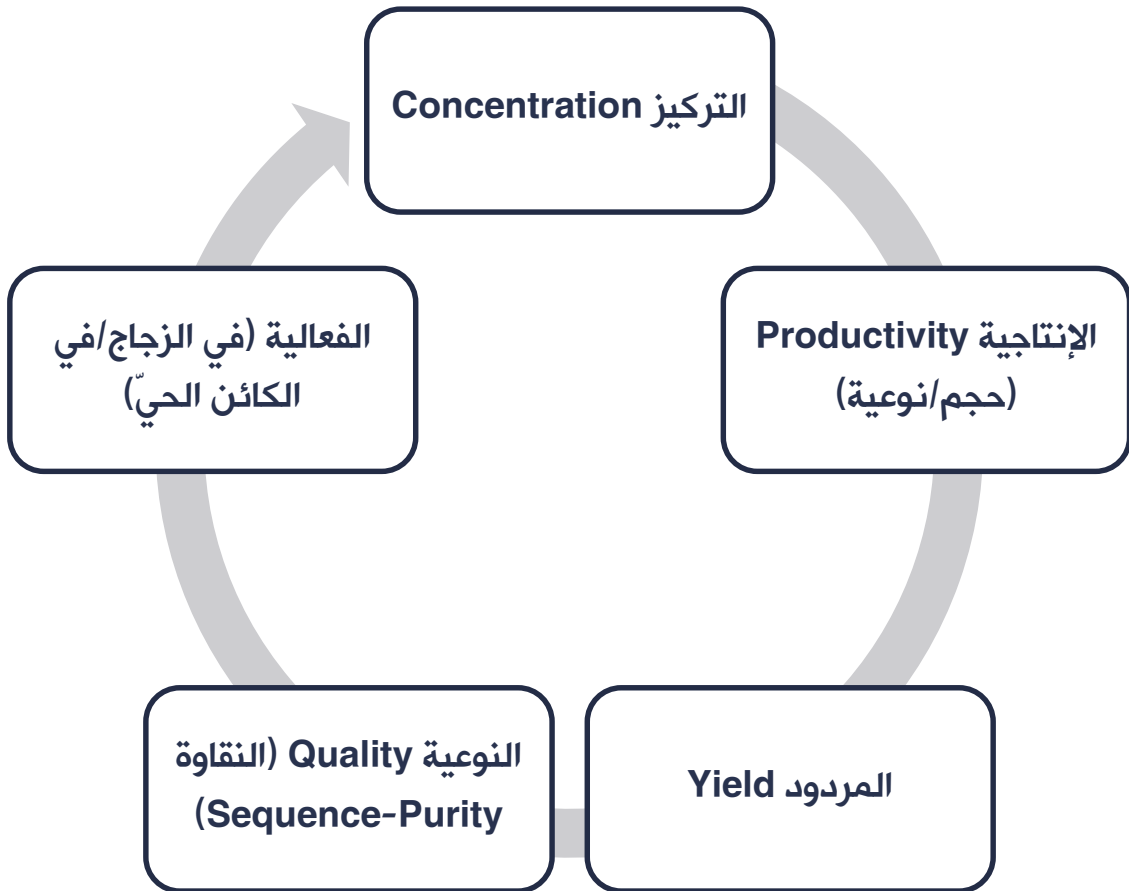
<https://www.youtube.com/watch?v=7ipEtL55htM&feature=youtu.be>

وبالعودة قليلاً إلى عملية التخمير Bioprocess/Fermentation:

😊 تصميم عملية التخمير يختلف حسب نوعية المنتج المطلوب.

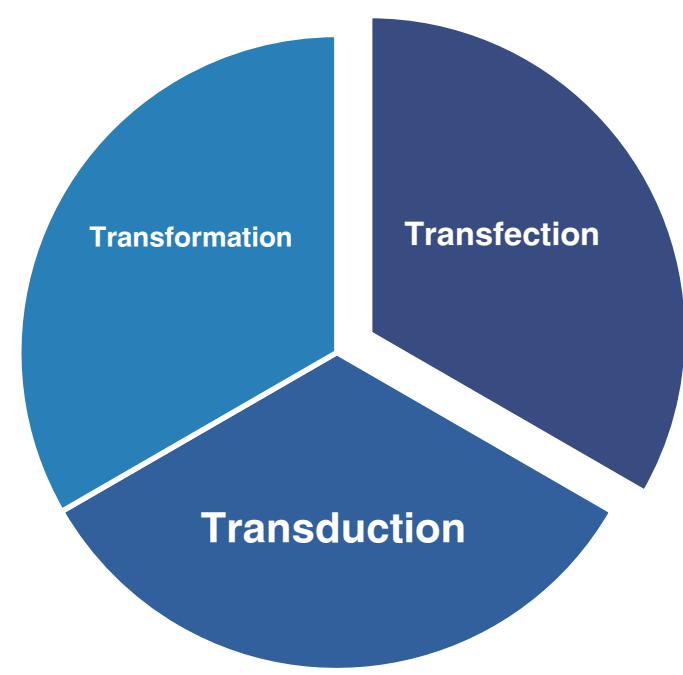
😊 معايير التصميم التي تؤخذ بعين الاعتبار مهما كان نوع المنتج

:Design Criteria



Bulk Industrial Product (صناعي)		Bio Pharmaceutical Product	
يكون الترتيب كالتالي:		يكون الترتيب كالتالي:	
التركيز	<input type="checkbox"/>	النوعية	<input type="checkbox"/>
الإنتاجية	<input type="checkbox"/>	التركيز	<input type="checkbox"/>
المردود	<input type="checkbox"/>	الإنتاجية	<input type="checkbox"/>
النوعية: لا يهم نوعية المنتج الصناعي بقدر أهمية المردود.	<input type="checkbox"/>	المردود: لا يهم المردود بقدر أهمية النوعية	<input type="checkbox"/>
مثل: (مساحيق الغسيل - ملونات - ...)	<input type="checkbox"/>	مثل: منتج حيوي صيدلاني	<input type="checkbox"/>

التعداء Transfection والتنبیغ Transduction



تتضمن الطرق الشائعة للتلاعب بالخلايا إدخال DNA غريب Foreign DNA باستخدام وسائل عديدة منها:

التعداء Transfection

😊 هو إدخال DNA غريب Foreign DNA باستخدام آليات غير فيروسية.
مثل Gene gun: يستخدم قوة فيزيائية لتثقيب الخلايا وإدخال الجينة أو التثقيب الكهربائي Elctro poreses، غالباً ما تجرى هذه العملية لجعل الخلية تعبر عن الجين المرغوب، كما يتضمن تغيير التعبير الجيني لجينة ما إما بتثبيطها أو تنشيطها.

😊 مؤخراً تم إدراك فائدة إجراء التعداء باستخدام بُنى شبيهة بال-RNA¹ Interference (RNAi) كآلية مناسبة لتثبيط التعبير عن جينة/بروتين محدد.

التنبيع Transduction

😊 يمكن إدخال الـDNA أيضاً إلى الخلية باستخدام فيروس (ناقل) في عملية يطلق عليها التنبيع Transduction حيث أن الفيروسات لها صفة طفيلية Parasitic وبالتالي فهي ملائمة جداً لإدخال الـDNA إلى الخلايا إذ يشكل ذلك أصلاً جزءاً من دورة تضاعفها الطبيعية.

✕ لم تفصل الدكتورة في الاستحالة Transformation وهي تتضمن قبط المادة الوراثية من قبل الخلية بشكل تلقائي فكما درسنا في مقرر الجراثيم أن الخلية الجرثومية مثلاً يمكنها إذا صادفت مادة وراثية متحررة من خلية ميتة أن تدخلها إليها وتعتبر عما فيها من جينات دون الحاجة لأي ناقل لإدخال هذه المادة الوراثية.

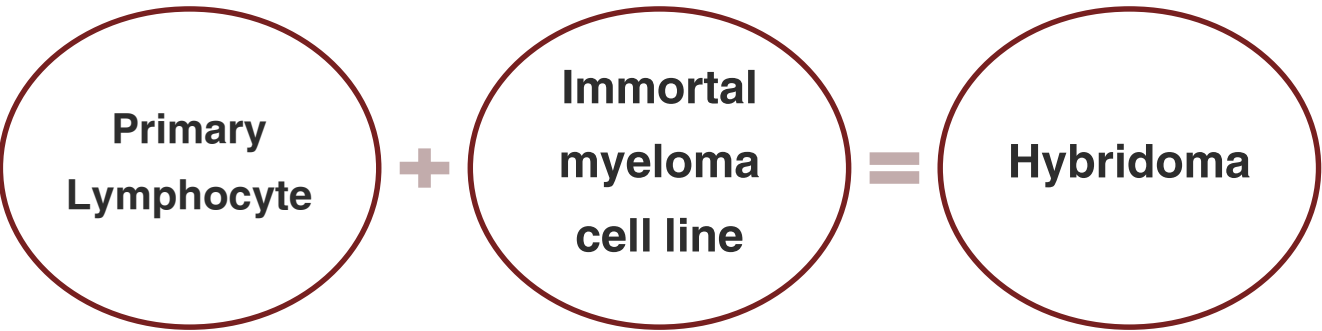
1 RNAi هو عبارة عن تتالي قصير جداً من الـRNA ، مضاعف الطاق أُكتشف له أدوار مهمة في عمليات الإسكات الجيني لجينات معينة، يتم تصميمه بشكل متمم لجينة نريد تثبيط التعبير عنها (الجينات المعيبة...).

الورم الهجين Hybridoma

أصبح حالياً بمقدورنا دمج خلايا طبيعية مع خط خلوي خالد
 Immortalized cell line واستخدام هذه الطريقة في إنتاج الأضداد وحيدة
 النسيلة Monoclonal antibodies.

تستخدم هذه الأضداد في مجالات عديدة: للكشف مثل تفاعلات الـ Ellisa أو
 المعالجة كعلاج السرطان وأمراض المناعة الذاتية.

تتضمن هذه العملية بشكل مجمل دمج اللمفاويات الأولية
 Primary Lymphocyte المعزولة من طحال (أو الدم في بعض الأحيان)
 لحيوان ممنع Immunized (تم تمنيعه لمستضد معين والمرغوب الحصول على
 الأضداد النوعية له، وبالتالي أصبحت خلاياه اللمفاوية قادرة على اعطاء الأضداد
 المرغوبة) مع خط خلوي خالد لخلايا الورم النقوي
 Immortal myeloma cell line فنحصل على الورم الهجين Hybridoma.



الورم الهجين Hybridoma

هو خط خلوي تتمتع خلاياه بصفتي الخلايا المشتق منها: وهي إنتاج الأضداد
 النوعية وهي الصفة التي حصل عليها من الخلايا الأولية، وصفة الخلود من
 الخلايا الورمية.

بعد ذلك يتم زرع الخلايا في وسط انتقائي Selective medium لاستبعاد الخلايا الورمية غير المندمجة Unfused myeloma cells ومن هذه الأوساط HA أو HAT، في حين تموت الخلايا الأولية غير المندمجة لوحدها في المزرعة (لأن عمرها محدود) دون الحاجة لاستبعادها.

أخيرا نجري عملية مسح Screening للسلالة التي أنتجت الضد المرغوب (لأن الطحال المعزول قد يكون حاو على عدة سلالات خلايا بائية منتجة للأضداد).



HAT = hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium

لنشرح باختصار كيف يقوم وسط ال HAT باستبعاد الخلايا الورمية غير المندمجة.

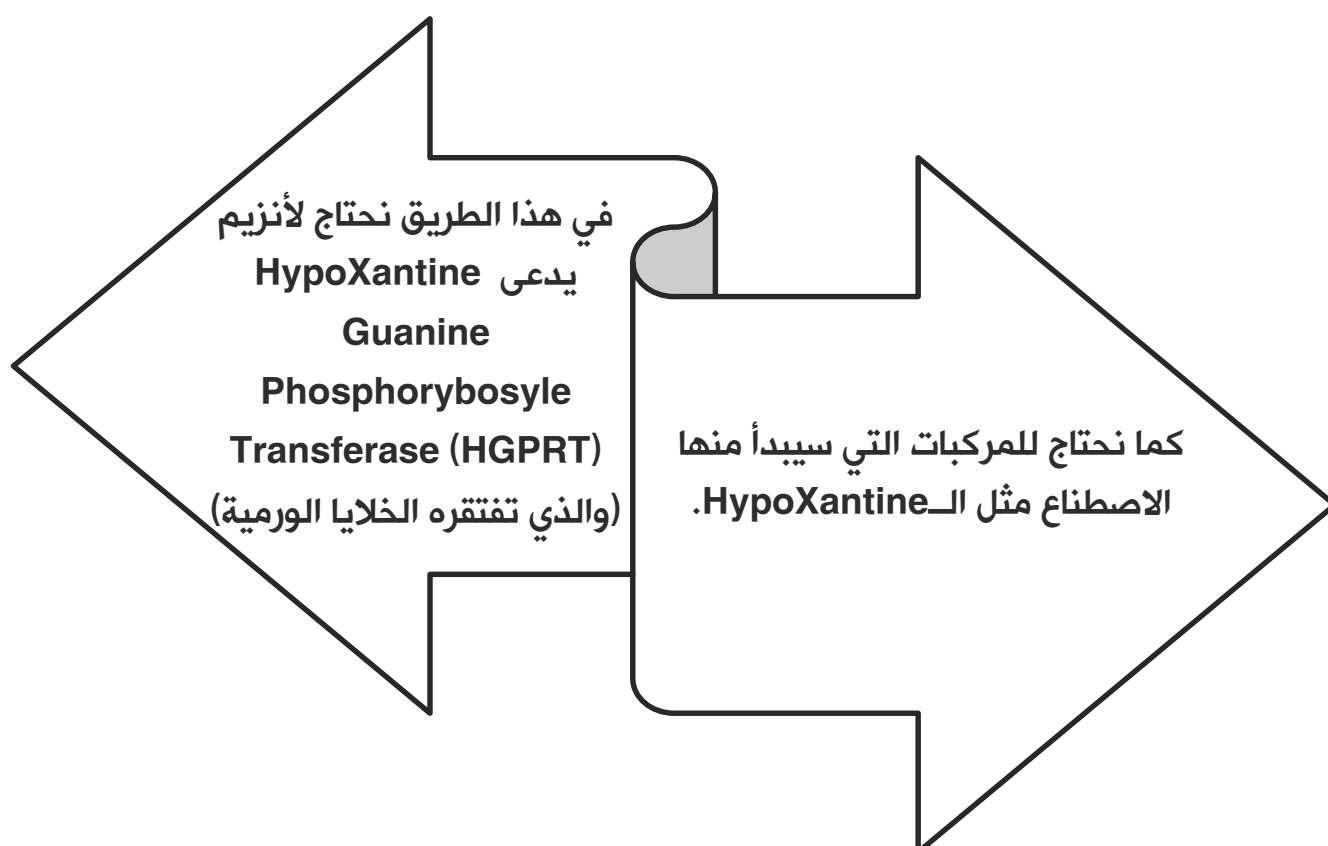
كما أخذنا في الكيمياء الحيوية 2 أن اصطناع النكليوتيدات البورينية (AMP, GMP) للحموض النووية ضمن الخلية ممكن أن يتم بطريقتين:

1. دي نوفو De Novo:

وفيه يبدأ الاصطناع من الصفر حيث يبدأ بالريبوز ويضاف إليه ذرات الكربون ذرة فذرة للوصول في النهاية للنكليوتيد المطلوب.

2. تفاعلات الإنقاذ Salvage Reaction:

وفيها يتم البدء من مركب محدد كحجر أساس يتم عليه تفاعلات بسيطة للوصول للنكليوتيد النهائي، فإما أن يتم البدء من البورين ويضاف له السكر المفسفر أو من نكليوزيد البورين ويضاف له الفوسفات.



😊 وسط ال-HAT يحتوي على ال-AminoPterin والذي يثبط طريق ال-De Novo لكل الخلايا لذلك تلجأ الخلايا المزروعة لطريق الإنقاذ وبما أن الخلايا الورمية لا تملك أنزيم ال-HGPRT فإنها غير قادرة على اصطناع الحموض النووية اللازمة لها بهذا الطريق مما يؤدي إلى توقف انقسامها وموتها.

😊 أما بالنسبة لخلايا الورم الهجين Hybridoma فإنها تملك هذا الأنزيم من الخلايا اللمفاوية، كما يتواجد في الوسط المركبات التي تحتاجها لطريق الإنقاذ

انتهى الأرشيف

(HypoXanthine, Thimidine).

السلالة الخلوية Cell strains

تشتق السلالة الخلوية إما مباشرة من الخلايا الأولية المزروعة أو من الخط الخلوي باصطفاء أو تنسيل الخلايا التي تتمتع بصفات مميزة والتي يجب التحري عنها فيما بعد.

تتميز السلالات الخلوية بأنها خلايا متكيفة مع الزرع لكنها بخلاف الخطوط الخلوية لها إمكانية انقسام محدودة، فجميع الخلايا غير الخالدة يتوقف انقسامها بعد 40-60 عملية تضاعف وبعد ذلك تفقد هذه الخلايا قدرتها التكاثرية.

يجب التمييز جيداً بين الأنواع التالية من الخلايا:

الخلايا الأولية Primary cells:

وهي الخلايا المعزولة مباشرة من النسيج البشري أو الحيواني وتتميز بعمرها المحدود

الخطوط الخلوية Cell lines:

وهي الخلايا التي تم تمريرها Passaging في الأوساط الزرعية على فترة طويلة فاكسبت أنماط جينية Genotypic وظاهرية Phenotypic متشابهة ويمكن أن يكون عمر الخط الخلوي محدوداً لكنه في الغالب أنه يمتلك صفة الخلود الناجمة عن إما طفرات تلقائية أو تعديل صناعي

السلالة الخلوية Cell strain:

ميزتها الأساسية أنها منتقاة إما من خلايا أولية أو من خطوط خلوية لوجود مواصفات معينة فيها، وغالباً ما يكون عمرها محدود أيضاً

أحد أشهر الأمثلة على الخطوط الخلوية البشرية هي HeLa:



☺ يعتبر خط HeLa واحد من أقدم وأشهر الخطوط البشرية المستخدمة، وهو خط ورمي مشتق من سرطان عنق الرحم تم عزله من السيدة Henrietta Lacks التي توفيت بهذا السرطان في 4 أكتوبر عام 1951.

☺ ومازال حتى الآن مستخدماً ويحمل نفس التكوين الجيني حين عزله من المريضة ولكنه أثار مشكلة أخلاقية Ethical لأنه

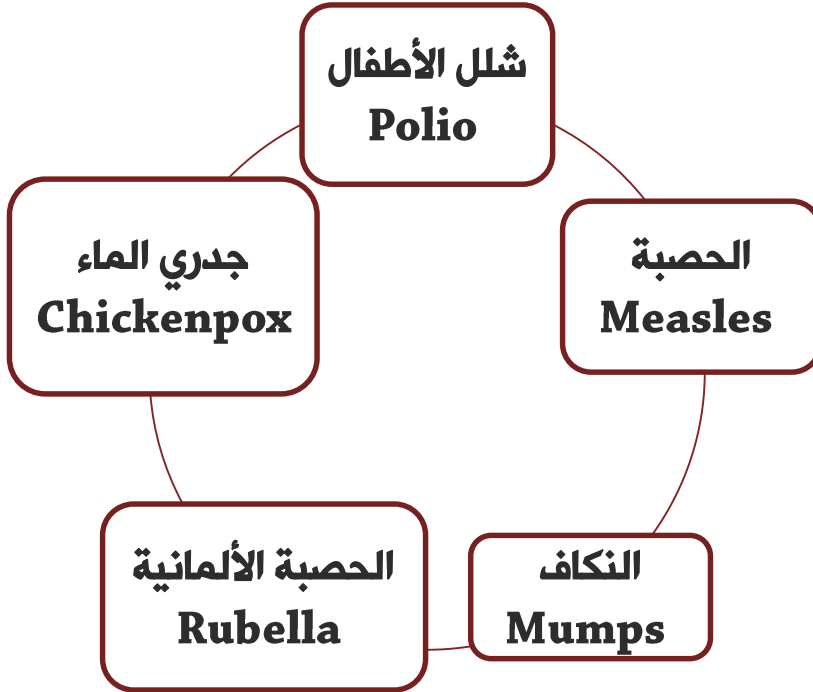
عندما تم عزل هذه الخلايا لم يتم استئذان المريضة أو أحد أقاربها.

☺ لذلك حالياً عند أخذ خلايا من شخص ما لاستخدامها كخط خلوي يتم استئذان المريض والحصول على ما يسمى الموافقة المستنيرة Informed Consent، أي أن المريض على دراية بكل تفاصيل العملية وموافق عليها.



تطبيقات المزرعة الخلوية Applications of cell culture

1. إن المزرعة الخلوية والخطوط المستخدمة فيها أساسية لإنتاج اللقاحات الفيروسية:



-فمثلاً من اللقاحات الفيروسية التي يتم اصطناعها حالياً في المزرعة الخلوية :

ورصدت الولايات

المتحدة حالياً العديد من الأبحاث لاستخدام المزرعة الخلوية لإنتاج لقاح الأنفلونزا بسبب الخطر الجائحي لفيروس H5N1.

ومن الأفكار الجديدة أيضاً في هذا المجال استخدام اللقاحات المعتمدة على DNA المأشوب Recombinant DNA based vaccines وطبقت هذه التقنية عملياً في اللقاحات التي تم صنعها اعتماداً على الفيروس الغدي Adenovirus (وهو فيروس مسبب للزكام) كناقل.

2. جميع منتجات التقانة الحيوية تعتمد على المزرعة الخلوية.

3. زراعة الخلايا الجذعية Stem cells.

والتي يمكن لها أن تتميز إلى أنماط عديدة من الخلايا الجسمية الأمر الذي يعطيها ميزة وأهمية لاستخدامها في عمليات الزرع Transplantation.

4. جميع المنتجات البيولوجية التي تعتمد على تقنية الـ DNA المأشوب تحتاج إلى مزارع خلوية:

بما فيها:

الأنزيمات Enzymes

الهرمونات الصناعية
Synthetic hormones

المنتجات البيولوجية المناعية Immunobiological (كالأضداد وحيدة النسيلة MCA، الإنترلوكينات Interleukins، اللمفوكينات Lymphokines)

الأدوية المضادة للسرطان
Anti-cancer agents

وبشكل عام ثمة العديد من البروتينات البسيطة نسبياً والتي يمكن إنتاجها بالاعتماد على الـ DNA الريبوزومي rDNA في المزارع الجرثومية، في حين أن البروتينات الأكثر تعقيداً كالحاوية مثلاً على مجموعات غليكوزيد Glycosylated يجب إنتاجها حالياً في خلايا حيوانية لأنها بحاجة إلى تعديلات بعد الترجمة Post-translational modification ولا تحدث إلا عند حقيقيات النوى Eukaryotes.

من الأمثلة على هذه البروتينات المعقدة هو هرمون الإريثروبويتين Erythropoietin:

يعطى للمرضى (المصابين بفاقة دم شديدة مثل مرضى غسيل الكلى) و الذي يحتاج إنتاجه في خلايا الثدييات إلى تقنيات مكلفة جداً لذلك تتجه جهود الأبحاث إلى إنتاج مثل هذه البروتينات المعقدة في خلايا الحشرات أو النباتات الراقية.

مزارع الخلايا غير الثديية Culture of non-mammalian cells

مزارع الخلايا النباتية

😊 تنمى الخلايا النباتية بشكل نموذجي إما بشكل خلايا معلقة في وسط سائل أو باستخدام مزارع الدشبذ² Callus cultures على وسط صلب.

😊 وإن زراعة الخلايا النباتية غير المتميزة والدشبذ Calli (جمعها: Callus) يتطلب توازناً معيناً بين هرمونات النمو النباتية: الأوكسينات Auxin والسيتوكينينات Cytokinins.

المزارع الفطرية والجرثومية Bacterial and yeast culture

😊 بالنسبة للخمائر والفطور تنمى كميات قليلة من الخلايا على داعم صلب حاو ضمنه على المغذيات وهو غالباً هلامية الأغار.

😊 أما بالنسبة للمزارع المستخدمة على نطاق صناعي فهي غالباً عبارة عن مزارع سائلة تحوي الخلايا الجرثومية ضمنها بشكل معلق.

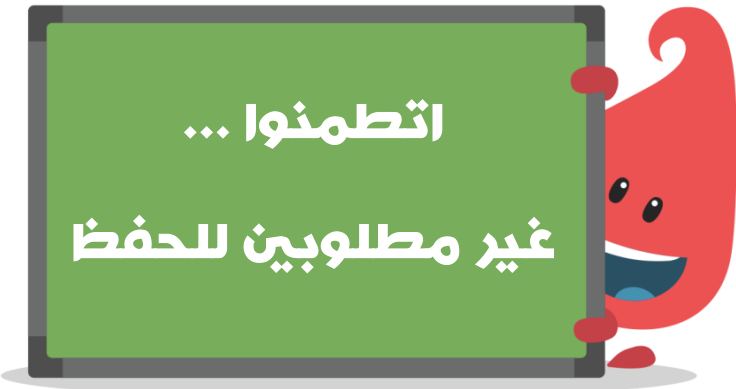
المزارع الخلوية الفيروسية Viral Culture



😊 زراعة الفيروسات والتي تتطلب زراعة إما خلايا ثديية أو نباتية (فيروسات متطفلة على النباتات) أو فطرية أو حتى جرثومية (Bacteriophage) كخلايا مضيفة Hast Cells لتنمية وتكاثر وتضاعف هذه الفيروسات.

² الدشبذ (المعجم الطبي الموحد): هو نسيج برانشيمي غير منتظم ينمو عند تعرض النبات لجروح، ونفس الاسم يطلق على النسيج العظمي الذي ينمو بعد الإصابة بكسور.

بعض الخطوط الخلوية الشائعة Common cell lines



فيما يلي أمثلة عن بعض الخطوط الخلوية التي تعرّف برموز خاصة لكل نوع منها بالإضافة إلى المصدر الذي اشتقت منه هذه الخطوط:

1. الخطوط الخلوية البشرية Human cell lines:

DU145 (prostate cancer)	مشتق من سرطان البروستات
H295R (adrenocortical cancer)	من سرطان الغدة الكظرية
Hela (cervical cancer)	من سرطان عنق الرحم
KBM-7 (chronic myelogenous leukemia)	من الالبيضاخ النقي المزمن
LNCaP (prostate cancer)	من سرطان البروستات
MCF-7 (breast cancer)	من سرطان الثدي
MDA-MB-468 (breast cancer)	من سرطان الثدي
PC3 (prostate cancer)	من سرطان البروستات
SaOS-2 (bone cancer)	من سرطان العظم
SHSY5Y (neuroblastoma, cloned from a myeloma)	من الورم الأرومي العصبي
T47D (breast cancer)	من سرطان الثدي
THP-1 (acute myeloid leukemia)	من الالبيضاخ النقي المزمن
U87 (glioblastoma)	من الورم الأرومي الدبقي

2. الخطوط الخلوية للثدييات العليا :Primate cell lines

Vero (African green monkey
Chlorocebus kidney epithelial
cell line)

خط خلوي مشتق من خلايا ظهارة الكلية
لنوع من السعادين الإفريقية الخضراء
المعروف بـ: "سعدان الفرقت".

3. الخطوط الخلوية الفأرية :Mouse cell lines

MC3T3 (embryonic calvarium)

خط خلوي مشتق من النسيج المولد
للجمجمة Calvarium عند جنين الفأر

4. الخطوط الخلوية المأخوذة من أورام الجرذان :Rat tumor cell lines

GH3 (pituitary tumor)

خط خلوي مشتق من ورم النخامى

PC12 (pheochromocytoma)

من ورم لب الكظر

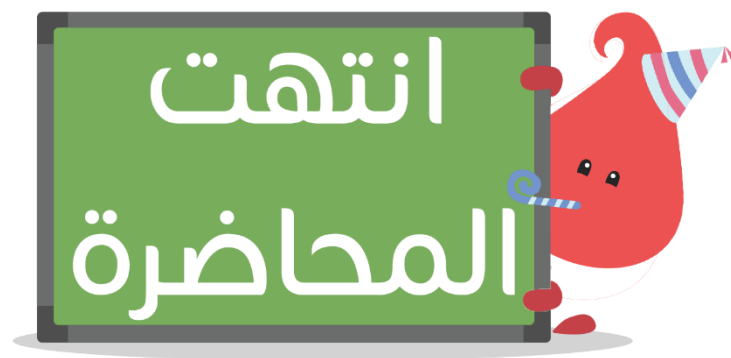
5. الخطوط الخلوية النباتية :Plant cell lines

Tobacco BY-2 cells (kept as cell
suspension culture, they are
model system of plant cell)

خط خلوي مشتق من نبات التبغ وهو
النموذج المدروس عن الخطوط الخلوية
النباتية

6. خطوط خلوية أخرى :Other species cell lines

Dog MDCK kidney epithelial	مشتق من ظهارة الكلية لأحد أنواع الكلاب
Xenopus A6 kidney epithelial	مشتق من ظهارة الكلية لأحد أنواع الضفادع
Zebrafish AB9	مشتق من أحد أنواع الأسماك
Asian Tiger Mosquito C6/36	خط خلوي مشتق من أحد أنواع البعوض
Chinese Hamster Ovary CH0	خط خلوي مشتق من مبيض الهامستر



فقرة الكريات البيضاء لبلعمة الأخطاء ❌ :

حذف آخر فقرة في المحاضرة الثالثة (فقرة تحليل العينة).

لتحميل محاضراتنا:
www.Rbcsteam.org/lectures



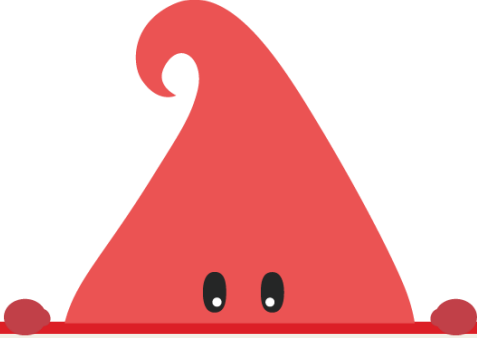
لإرسال ملاحظاتكم:
goo.gl/forms/HL8slZEmLSZvySq92



للاستفسار عن هذه المحاضرة على غروب الفريق على الفيس بوك:
RBCs Pharmacy 2019 www.facebook.com/groups/rbcs2019



RBCs' Quote



"Almost everybody is enthusiastic about the promise of biotechnology to cure disease and to relieve suffering." - Leon Kass