مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
سال : ۱۳۹۹ - شماره : ۱
مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
Medical Genetic Research
www.mgr.ir

# مروری بر تکنیک های شمارش سلولی

امیر شمس[۱،۲]، حامد قمی[۱]، *الهه مسائلی[۲]

۱. گروه مهندسی بافت، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

۲. گروه سلول های بنیادی، واحد بیوتکنولوژی سلولی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی رویان، اصفهان، ایران

*پست الکترونیک مسئول مکاتبات: elahe_mas@yahoo.com

## چکیده

شمارش سلولها برای مصارف گوناگونی استفاده می شود که مهمترین آنها شمارش سلول های زنده و محاسبه درصد بقای سلولی است. شمارش سلولی در آزمایشگاه های تشخیصی- مراکز تحقیقات و شرکت های داروسازی دارای اهمیت فوق العاده ای است. امروزه روش های مختلفی برای شمارش سلولی توسعه داده شده است که دارای دقت و صحت مختلفی می باشد. از دیرباز شمارش سلول های خونی در بدن برای تشخیص بیماری های مختلفی استفاده می شد. روش های شمارش سلولی در داروسازی جهت پایش داروها و نحوه اثر داروها بر روی حیات سلولی نیز استفاده شده است. روش های شمارش سلولی در عرصه مهندسی بافت نیز برای سنجش حیات سلولی در تماس با بیومتریال ها مثل اسکافولدها یا ایمپلنت ها استفاده می شود. امروزه با پیشرفت فناوری در توسعه دستگاه ها و کیت های شمارش سلولی بیش از ده روش مختلف شمارش سلولی و محاسبه درصد بقای سلولی وجود دارد که به اجمال در این مقاله مورد بررسی قرار گرفته است.

## کلمات کلیدی

شمارش سلولی - درصد بقای سلولی - سنجش حیات سلولی – زنده مانی سلولی

مجله تحقیقات
ژنتیک پزشکی
سال : ۱۳۹۹ - شماره : ۱

مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
Medical Genetic Research

www.mgr.ir

# An overview of cell counting techniques

Amir Shams [2,1], Hamed Qomi [1], * Elahe Masaeli [2]

1. Department of Tissue Engineering, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran
2. Department of Cellular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

* Email correspondence: elahe_mas@yahoo.com

## Abstract

Cell counting is used for a variety of purposes, the most important of which is to count living cells and calculate the percentage of cell survival. Cell counting is extremely important in diagnostic laboratories, research centers, and pharmaceutical companies. Today, different methods for cell counting have been developed that have different accuracy. Blood cell counts have long been used to diagnose various diseases. Cell counting methods have been used in pharmacy to monitor drugs and how drugs affect cell life. Cell counting techniques in tissue engineering are also used to measure cell life in contact with biomaterials such as scaffolds or implants. Today, with the advancement of technology in the development of cell counting devices and kits, there are more than ten different methods of cell counting and calculating cell survival percentage, which have been briefly reviewed in this article.

## Keywords

Cell count - Cell survival percentage - Measurement of cell life - Cell survival

## مقدمه

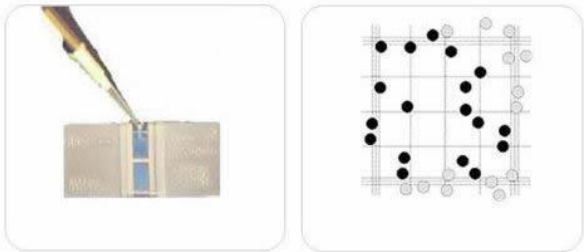
شمارش سلولی شامل هر روشی برای شمردن یا کمی سازی سلول‌ها در علوم زیستی، شامل تشخیص پزشکی و درمان می‌باشد. شمارش سلول یکی از زیرمجموعه‌های مهم سیتومتری (سلول سنجی) است که دارای کاربردهای تحقیقاتی و درمانی می‌باشد. امروزه روش های مختلفی برای شمارش سلول وجود دارد که برخی از این روش ها دیگر کاربرد عمومی نداشته و برخی روش ها توسعه یافته و به مرجع اصلی شمارش سلولی تبدیل شده است. در ادامه ۱۰ روش برای شمارش سلول شرح داده می شود[۱].

## ۱- شمارش سلولی بر اساس رنگ آمیزی سلول ها

در این روش سلول ها توسط یک ماده رنگ‌آمیزی می شوند که این ماده معمولاً تری‌پان بولو می باشد این رنگ از غشاء سلول های مرده نفوذ کرده و به درون سیتوپلاسم آنها وارد می شود و باعث رنگ شدن سلولهای مرده می شود اما در سلول های زنده غشا سلول مانع ورود رنگ شده و سلول بصورت شفاف دیده می شوند این تکنیک به دو صورت دستی و اتوماتیک انجام می شود[۲].

### ۱-۱- روش دستی

در این روش ابتدا سلول ها در معرف رنگ تری پان بلو قرار می گیرند. سپس رنگ اضافه شستشو داده می شود و سپس مقدار ۲۰ ماکرولیتر از سلول ها بر روی لام مخصوص به نام نئوبار قرار می گیرد- لام نئوبار دارای مربعاتی بر روی خود می باشد که این مربع ها دارای مقیاس های مختلفی هستند در مرحله بعد لام بر روی میکروسکوپ نوری قرار می گیرد و محقق بسته به نوع و اندازه سلول، مقیاس و تعداد خانه ها را انتخاب کرده و بصورت قراردادی به صورت ساعتگرد شروع به شمارش سلول های زنده و مرده می کند. همچنین بصورت قراردادی سلولهایی که در حاشیه بالا و چپ هستند در همان خانه شمارش شده- اما سلول هایی که در حاشیه پائین و راست هستند شمارش نمی شوند تا در خانه مجاور مورد شمارش قرار گیرند سپس بسته به نوع لام نئوبار مورد استفاده حجم مشخص می شود و در نهایت می توان غلظت سلول های مرده و غلظت سلول های زنده را تعیین کرد. این روش دقت متوسطی داشته و به خطای کاربر بسیار حساس است و معمولاً فرایندی وقت‌گیر است. اما هزینه آن کم و در دسترس می باشد[۳].



**شکل ۱: لام نئوبار**

### ۱-۲- روش اتوماتیک

این روش توسط دستگاهی به نام سل کانتر رنگ‌آمیزی صورت می گیرد که در این روش مانند روش دستی سلول ها رنگ آمیزی می شوند اما شمارش سلول های زنده و مرده توسط

عکس برداری کامپیوتری از لام صورت می گیرد و کامپیوتر با پردازش تصاویر لام غلظت سلول های مرده و زنده و پراکندگی سلول ها و میزان تمایل کلونی در سلول ها و میانگین پراکندگی سلولی و میانگین چسبندگی سلولی و ده ها اطلاعات آماری دیگر را نشان می دهد. این روش بسیار دقیق و سریع و اطلاعات بسیار زیادی در اختیار می گذارد. اما این روش نسبتاً گران قیمت می باشد[۴].

**شکل ۲: سل کانتر رنگ آمیزی**

## ۲- شمارش سلولی بر اساس جداسازی با الکتروفورز

الکتروفورز از روشهای آزمایشگاهی است که به طور گسترده در زمینه تحقیق و تشخیص بکار می رود. این روش معمولا برا ی جداکردن مولکولهای باردار در یک میدان الکتریکی به منظور تجزیه و تحلیل آنها بکار می رود. از این روش می توان برای شمارش سلول های کوچک پروکاریوت یا ماکرو مولکول ها استفاده کرد. در این روش می‌توان با قرار دادن سلول یا مولکول ها در یک میدان الکتریکی، آنها را بر اساس خواص فیزیکی مانند شکل فضایی، وزن مولکولی و بار الکتریکی، تفکیک کرد[۵].

## ۳- شمارش سلولی بر اساس پتانسیل الکتریکی

در این روش شمارش سلولی بر اساس پتانسیل الکتریکی غشاء سلول ها به صورت اتوماتیک توسط سل کانتر های الکتریکی صورت می گیرد. در مرحله اول سلول ها به یک لوله موئینه که دارای دو الکترود است وارد می شود. میان این دو الکترود یک جریان الکتریکی ضعیف برقرار است که عبور سلول از میان دو الکترود موجب افت پتانسیل می شود که این افت پتانسیل متناسب با نوع سلول است. سپس کامپیوتر با آنالیز افت پتانسیل نوع و تعداد سلول ها را تعیین می کند. این روش دقت کمتری نسبت به سل کانترهای رنگ‌آمیزی دارد و بیشتر برای افتراق سلول های خونی از یکدیگر استفاده می شود[۶].

**شکل ۳: سل کانتر الکتریکی**

## ۴- شمارش سلولی بر اساس سنجش فعالیت آنزیمی

در این روش سلول های زنده از مرده توسط فعالیت های آنزیم های آنها تشخیص داده می شود. بطور معمول از آنزیم های میتوکندریای در این روش استفاده می شود. سه کیت اصلی برای این روش تولیدشده که شامل کیت های MTS - MTT XTT- WST می باشد.

### ۴-۱-آنزیم های میتوکندری

میتوکندری، در یاخته (سلول)، اندامکی است که وظیفه آن تنفس سلولی و نوعی دستگاه انتقال انرژی است که موجب می‌شوند انرژی شیمیایی موجود در مواد غذایی با عمل فسفوریلاسیون اکسیداتیو، به صورت پیوندهای پرانرژی آدنوزین تری‌فسفات (ATP) ذخیره شود. این اندامک در تمام یاخته‌های دارای تنفس هوازی به جز در باکتری‌ها که آنزیم‌های تنفسی آنها در غشای سیتوپلاسمی جایگزین شده‌اند وجود دارد. درون میتوکندری مایعی سیّال به نام ماتریکس وجود دارد که واکنش‌های مربوط به فرایند تنفس سلولی در ان انجام می‌شود. تنفس سلولی فرایندی است که طی ان انرژی ذخیره شده در قندها به مولکول سوختی سلولی تبدیل می‌شود.

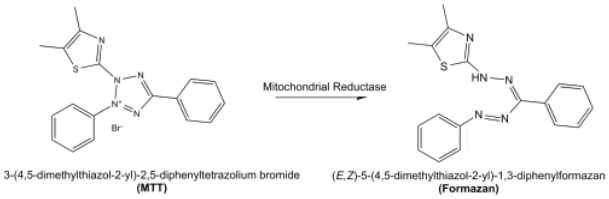
نام «میتوکُندری» ترکیبی است از دو واژه یونانی Mito به معنای رشته و Chondrion به معنی دانه. چون این اندامک اغلب رشته‌ای یا به صورت دانه‌های کوچک در سیتوپلاسم همه سلولهای یوکاریوتی وجود دارد. میتوکندری‌ها محل اکسیداسیون سلولی هستند. در طی این عمل، کربن دی اکسید تولید می‌گردد و این همان کربن دی اکسیدی است که از سلول دفع می‌شود. میتوکندری مانند کارخانه‌ای باعث تولید انرژی سلول می‌شود. اندازه میتوکندری‌ها بین ۰/۵ تا ۱/۰ میکرومتر می‌باشد. ساختارهای میتوکندری به عنوان نیروگاه‌های سلولی توصیف می‌شوند چرا که بیشتر انرژی شیمیایی سلول یا همان آدنوزین تری‌فسفات (ATP) از میتوکندری تولید می‌شود. علاوه بر تولید انرژی سلولی، میتوکندری وظایف دیگر درون سلولی نیز دارد که شامل سیگنال دهی، تمایز سلولی، مرگ سلولی و کنترل رشد و حفظ سلول می‌باشند.

در میتوکندری آنزیم هایی وجود دارد که واکنش‌های مربوط به فرایند تنفس سلولی را هدایت کرده و باعث انجام عملیات فسفوریلاسیون اکسیداتیو می شوند. از این آنزیم ها می توان به سوکسینات ردوکتاز و سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی اشاره کرد که با سنجش این آنزیم می توان تعداد سلول های زنده که فعالیت متابولیکی دارند را تخمین زد. براساس این روش کیت های مختلف شمارش سلولی ساخته شده است[۷].

### ۴-۲- کیت MTT

در این کیت یک نمک از خانواده تترازولیوم بنام MTT وجود دارد که می توان به عنوان سوبسترای آنزیم میتوکندریایی سوکسینات ردوکتاز قرار گیرد. در سلول های زنده فعالیت های میتوکندری بسیار بالاست از این رو آنزیم های میتوکندریایی مثل سوکسینات ردوکتاز فعال هستند. با ورود ملکول MTT به سلول آنزیم سوکسینات ردوکتاز آن را به فومارازان

غیرمحلول تبدیل می کند. سپس یک واسط حلال آلی مثل دی میتل سولفوکسید (DMSO) اضافه شده تا فومازان بصورت محلول و به رنگ بنفش درآید. هر چه تعداد سلول های زنده بیشتر باشد رنگ بنفش تولیدی نیز بیشتر است. رنگ تولید شده دارای جذب حداکثری در ۴۵۰ نانومتر است که برای سنجش رنگ تولیدی می توان از دو تکنیک اسپکتوروفوتومتری و الیزا استفاده کرد.



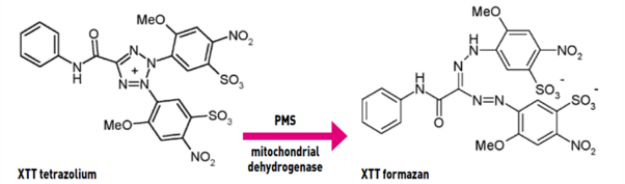

**شکل ۴: تبدیل MTT به فومازان**

بوسیله این آزمایش ساده و دقیق می توان پاسخ سلولهای مختلف را به فاکتورهای خارجی از جمله فاکتورهای رشد، داروهای سایتوتوکسیک و سایر عوامل شیمیائی ارزیابی کرد. بطوریکه میزان فعالیت و سرعت تکثیر سلولها ممکن است تحت تاثیر هورمونها، فاکتورهای رشد، سایتوکینها و میتوژنها افزایش یافته یا تغییری نکند. همچنین تحت تاثیر بعضی از داروها و عوامل سایتوتوکسیک نظیر داروهای ضد سرطان ممکن است سلولها دچار نکروز یا آپوپتوز شده و سرعت تکثیر یا رشدشان کاهش یابد. این روش نسبت به سایر روشهای بررسی میزان تکثیر سلولی ساده تر بوده و با امکانات موجود در اغلب آزمایشگاه ها قابل اجراست. بعلاوه کلیه مراحل آزمایش در پلیتهای ۹۶ خانه کشت سلولی انجام شده و نتایج با دستگاه الیزا ریدر قرائت می شود لذا تعداد زیادی نمونه را می توان همزمان آزمایش کرد[۸].

## ۴-۳- کیت XTT

در این کیت یک نمک از خانواده تترازولیوم بنام XTT وجود دارد که می توان به عنوان سوبسترای آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز قرار گیرد. با ورود ملکول XTT به سلول آنزیم سوکسینات دهیدروژناز آن را به فومازان محلول تبدیل می کند و رنگ محیط بنفش خواهد شد. هر چه تعداد سلول های زنده بیشتر باشد رنگ تولیدی نیز بیشتر است. رنگ تولید شده دارای جذب حداکثری در ۴۵۰ نانومتر است که در این روش نیز می توان برای سنجش رنگ تولیدی می توان از دو تکنیک اسپکتوروفوتومتری و الیزا استفاده کرد.

مهترین برتری این روش نسبت به روش MTT عدم نیاز به استفاده از واسط حلال آلی مثل دی میتل سولفوکسید (DMSO) است که ترکیبی سمی برای سلول است. از اینرو پس اتمام شمارش سلولی با روش XTT سلول ها زنده مانده و برای ذخیره و یا انجام آزمایشات بیشتر قابل استفاده خواهند بود[۹].




**شکل ۵: تبدیل XTT به فومازان**

## ۴-۴- کیت MTS

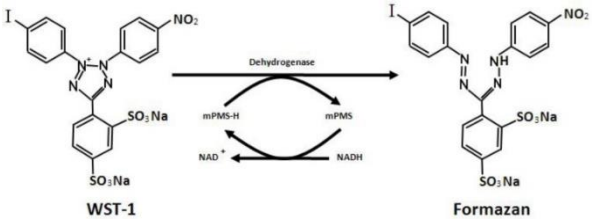
در این کیت یک نمک از خانواده تترازولیوم بنام XTT وجود دارد که در حضور فنازین متوسولفات (PMS)، به عنوان سوبسترای آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز قرار گیرد. با ورود ملکول XTT به سلول، آنزیم سوکسینات دهیدروژناز آن را به فومارازان محلول تبدیل می کند و رنگ محیط بنفش خواهد شد. هر چه تعداد سلول های زنده بیشتر باشد رنگ تولیدی نیز بیشتر است. رنگ تولید شده دارای جذب حداکثری در ۴۹۰ نانومتر است که در این روش نیز می توان برای سنجش رنگ تولیدی می توان از دو تکنیک اسپکتوروفوتومتری و الیزا استفاده کرد.

تست MTS اغلب به عنوان یک تست MTT یک مرحله ای توصیف می شود که به راحتی واکنشگر به سلول اضافه شده و بدون نیاز به مراحل متناوب مورد نیاز در MTT عمل می کند. ولی تک مرحله بودن تست MTS باعث می شود حساسیت به تداخل رنگی در این روش وجود داشته باشد. برای اطمینان از صحت در هنگام استفاده از این تست حذف جذب رنگ زمینه مورد نیاز لازم است. استفاده از مشاهدات کیفی تحت میکروسکوپ برای تایید نتایج MTS پیشنهاد می گردد.

مزیت مهم این روش پایدار بودن رنگ تولید شده و نیاز به زمان کمتر آنکوباسیون برای تولید رنگ نسبت به کیت XTT و غیر سمی بودن واکنشگرها برای سلول است که این امر استفاده مجدد از سلول ها را پس از انجام این تست آسان می سازد[۱۰].

## ۴-۵- کیت WST

در این کیت ها از یک حد وسط انتقال الکترونی استفاده می شود. اساس کار در این کیت احیای ملکول حد واسط توسط NADH تولید شده در میتوکندری است. بطوریکه پس از احیا شدن ملکول حد واسط و اتصال آن به ملکول WST رنگ محیط به زرد تغییر پیدا می کند. هر چه فعالیت آنزیم میتوکندریایی بیشتر باشد NADH بیشتر تولید شده از این رو ملکول حد واسط بیشتری احیا شده و رنگ زرد بیشتری تولید می شود. مشابه با روشهای بالا میزان غلظت رنگ تولیدی را می توان با روش اسپکتوفوتومتری یا الیزا اندازه گیری نمود. این روش نسبت به روش XTT و MTT سرعت و دقت بیشتری دارد.




**شکل ۶: تبدیل WST به فومارازان**

## ۴-۶- روش های بررسی غلظت رنگ تولیدی

### ۴-۶-۱- طیف‌سنجی نوری

طیف‌سنجی نوری یا اسپکتروفتومتری در شیمی، روشی است برای سنجش و مطالعه طیف الکترومغناطیسی است. در این روش با استفاده از میزان اندازه جذب نور نمونه‌ها، غلظت آنها را تعیین می‌کند. همچنین از آن می‌توان برای تجزیه و تحلیل رنگ های تولید شده توسط آنزیم ها استفاده نمود. این شیوه

در دستگاه طیف‌سنج نوری با نام اسپکتروفوتومتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. در اسپکتوفتومتری مرئی، جذب یا انتقال ماده می تواند به وسیله رنگ مشاهده شده تعیین شود. برای نمونه محلولی که نور را در بالاتر از طیف مریی است و هیچ طول موج مریی را عبور نمی‌دهد به طور تئوری به رنگ سیاه است. از سویی دیگر اگر همه طول مرئی را عبور دهد و هیچ نوری را جذب نمی‌کند نمونه محلول به رنگ سفید است. اسپکتوفتومتر های مریی در عمل از منشوری برای خرد کردن طیف معینی از طول موج استفاده می کنند (فیلتر امواج نوری دیگر) به همین دلیل شعاع ویژه ای از نور از طریق نمونه محلول عبور می کند. رنگ موجود در هر محلول طیف خاصی از نورهای عبوری را جذب می کند که از میزان طیف جذب شده می توان میزان رنگ موجود در محلول را تعیین کرد[۱۱].

**شکل ۷: دستگاه اسپکتروفتومتر**

## ۴-۶-۲-روش الیزا (ELISA)

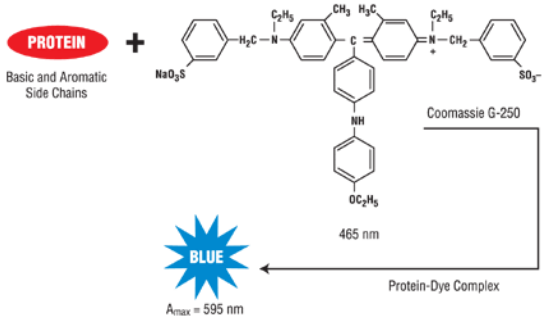
تست الیزا (Enzyme-linked immunosorbent assay) روشی عمومی در بیوشیمی غربالگری است. تست الیزا در اصل برای کنترل کیفیت در گیاه‌پزشکی بوجود آمد و سپس به عنوان روش تشخیص آزمایشگاهی در برخی بیماری‌های انسان بکار گرفته شد. تست الیزا یک آزمایش استاندارد برای تعیین هورمون ها و پروتئین ها است و استانداردی جهانی برای استفاده در بیمارستان‌ها، آزمایشگاه ها و بانک خون می‌باشد. تست الیزا یک آزمایش مقرون بصرفه و نسبتاً دقیق است و در اکثر آزمایشگاه های تشخیصی استفاده می شود.

در دستگاه الیزا ریدر یک پلت ۹۶ خانه قرار داده می شود. درون دستگاه یک اسپکتوفتومتر کوچک قرار گرفته که به صورت اتوماتیک میزان جذب چاهک های پلیت ۹۶ خانه را اندازه گیری می کند. ازاینرو در این روش تعداد زیادی نمونه را می توان همزمان آزمایش کرد[۱۲].

**شکل ۸: دستگاه الیزا ریدر**

## ۵- شمارش سلولی بر اساس تعیین پروتئین سلولی

در این روش میزان پروتئین های سلولی بررسی شده تا از روی آن تعداد سلول ها تعیین گردد. معروفترین روش سنجش پروتئین بر اساس روش لُری و بردفورد ساخته شده بطوریکه ابتدا غشاء سلول لیز می شود و در مرحله بعدی معرف رنگ بردفورد به محلول اضافه می گردد. در این مرحله پروتئین ها به رنگ بارفرد متصل شده و محلول رنگی (آبی) را ایجاد می کنند. در مرحله بعد میزان غلظت رنگ تولید شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده می شود. هر چند غلظت رنگ بیشتر باشد پروتئین های بیشتری موجود می باشد و به همین دلیل هر چه پروتئین بیشتری موجود باشد تعداد سلول بیشتری نیز موجود است. رنگ آبی تولید شده دارای جذب حداکثری در ۵۹۵ نانومتر است که در این روش نیز می توان برای سنجش رنگ تولیدی می توان از دو تکنیک اسپکتوروفوتومتری و الیزا استفاده کرد. این روش دارای دقت بسیار پائینی است و دیگر در شمارش سلول استفاده نمی شود[۱۳].




**شکل ۹: رنگ آمیزی پروتئین با محلول بردفورد**

## ۶- شمارش سلولی بر اساس تعیین DNA

در این روش میزان DNA سلولی بررسی می شود و از روی غلظت DNA تعداد سلول تخمین زده می شود. در این روش با رنگ‌آمیزی DNA می توان غلظت DNA را نشان داد و هرچه غظت DNA. بیشتر باشد تعداد سلول ها نیز بیشتر است. دو روش اصلی برای رنگ‌آمیزی DNA وجود دارد[۱۴].

### ۶-۱-رنگ‌آمیزی داپی

در این نوع رنگ آمیزی ابتدا سلول لیز می شود و غشاء آن از بین می رود سپس غشاء هسته سلول نیز لیز می شود تا محتوا DNA آزاد گردد. در مرحله بعد معرف رنگ داپی (DAPI) اضافه می شود که این رنگ بطور اختصاصی به DNA متصل می گردد. در نهایت غلظت نهایی رنگ توسط اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش (UV) در طول موج ۴۵۰ نانومتر سنجیده می شود.

### ۶-۲-رنگ آمیزی هوخست

این نوع رنگ آمیزی مانند مراحل بالا می باشد با این تفاوت که در این روش به جای رنگ داپی (DAPI) از رنگ هوخست (HOECHEST) استفاده می شود و سنجش غلظت رنگ نهائی با اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش (UV) در طول موج ۳۵۰ نانومتر انجام می شود. این روش ها نیز دارای حساسیت پائین و خطای بالا هستند و معمولاً دیگر برای شمارش سلول به کار نمی روند.

## ۷- شمارش سلولی بر اساس تعیین شارژ سلولی

در این روش میزان انرژی تولید شده در ملکولهای حامل انرژی سلول تعیین می شود. بطوریکه هر چه میزان این ملکول های حامل انرژی بیشتر باشد تعداد سلول ها نیز بیشتر است. بطور کلی سه ملکول حامل انرژی شامل آدنوزین تری فسفات (ATP)، آدنوزین دی فسفات (ADP) و آدنوزین منو فسفات (AMP) مورد سنجش قرار می گیرد. از دو روش اساسی کروماتوگرافی مایع بازده بالا (HPLC) و تابش الکتریکی-شیمیایی (ECL) می توان برای سنجش میزان ملکول های فوق استفاده کرد. بطوریکه برای هر ملکول یک معرف اختصاصی وجود داشته و اتصال معرف به ملکول هدف توسط تکنیک های HPLC و ECL اندازه گیری می شود.

معرف ملکول AMP ملکولی به نام MK-CTP و معرف ملکول ADP ملکولی به نام PK-PEP و ملکول معرف ATP ملکولی به نام ATP-MR می باشد که پس از اضافه شدن معرف های ذکر شده، ماده لوسی فرین و سپس آنزیم لوسی فراز اضافه می گردد و در نهایت ماده دی‌سدیم پیروفسفات اضافه می شود تا زنجیره واکنشهای شارژ ملکولی آغاز شده و قابل اندازه گیری شود این روش دقت بسیار خوبی دارد ولی کیتهایی گران قیمت و دستگاه های سنجش گران قیمتی مورد نیاز است که این امر موجب کاهش استفاده از این روش شده است[۱۵].

## ۸- شمارش سلولی بر اساس تعیین میزان گلوکز

در این روش بطور غیرمستقیم تعداد سلول ها بررسی می شود بطوریکه میزان گلوکز باقی مانده در محیط کشت مورد ارزیابی قرار می گیرد و هر چه میزان گلوکز باقی مانده کمتر باشد تقسیم سلولی بیشتر بوده و تعداد سلول ها به همین دلیل بیشتر است. در این روش از دو کیت استاندارد آنزیمی زیر استفاده می شود.

۱- کیت های آنزیمی گلوکز اکسیداز که در حضور گلوکز موجب تولید NADH شده که در نهایت رنگ تولید شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه گیری می شود.

۲- کیت های آنزیمی هیدروکینازها که در این کیت ها از معرف فنولی استفاده شده که در حضور گلوکز رنگ محیط به رنگ صورتی تغییر پیدا می کند و توسط اسپکتروفوتومتر در فرکانس ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری می شود.

این روش ها نیز دارای دقت کم و خطای بالاست و تنها در صورتی که نتوان بصورت مستقیم تعداد سلول ها را شمارش کرد از این روش استفاده می شود.

## ۹- شمارش سلولی بر اساس ورود ماده رادیواکتیو

در این روش با ورود آمینواسیدهای نشان دار شده با ماده رادیواکتیو به سلول می توان فعالیت سلول و تعداد سلول ها را محاسبه کرد. بطوریکه ابتدا آمینو اسید نشان دار شده با رادیواکتیو وارد سیتوپلاسم سلول می شود و به عنوان ماده پیش‌ساز پروتئین در جایگاه ریبوزوم قرار می گیرد و پروتئین های نشان دار شده حاصل می شود. در نهایت می توان توسط دستگاه گاماکانتر میزان پروتئن های رادیو اکتیو تولید شده توسط سلول را اندازه گیری کرد که هر چه این پروتئین ها بیشتر باشد سلولها نیز بیشتر است معمولاً از دو نوع آمینواسید نشان‌دار شده در این فرایند استفاده می شود الف)تیمیدن نشان‌دار شده با تتریوم ب) سیتئین نشان‌دار شده با سلفور ۵ .

این روش دارای دقت بسیار خوبی است ولی به دلیل نیمه عمر کم مواد رادیواکتیو و تاریخ انقضای مصرف کوتاه این کیت ها استفاده از این روش محدود است و همچنین به دلیل خطر کار با مواد رادیواکتیو برای محققین و پروتکلهای مشکل برای دفع پسماندهای رادیواکتیو مورد استقبال محققین قرار نگرفته است[۱۶].

**شکل ۱۰: دستگاه گاماکانتر**

## ۱۰- شمارش سلولی بر اساس سنجش فلوسایتومتری

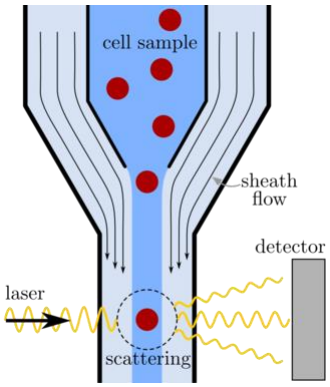
در تکنیک های فلوسایتومتری می توان انواع مختلف سلول ها را تشخیص داده و از یکدیگر جدا کرد. این تکنیک بر اساس برهمکنش اختصاصی آنتی‌ژن سطحی سلول و آنتی‌بادی نشان دار شده فلورسانتی انجام می شود. سلول دارای آنتی‌ژن های اختصاصی خود است که فقط در سطح غشاء همان نوع سلول یافت می شود[۱۷].

گروه خاصی از این آنتی‌ژن های سطحی CD یا خوشه افتراقی نام دارد که این آنتی‌ژنهای CD بطور کاملاً اختصاصی به آنتی‌بادی مکمل خود متصل می شوند و این آنتی‌بادی دارای نشانه مخصوص به خود هستند. دستگاه فلوسایتومتر با شناخت نشانه آنتی بادی می تواند نوع سلول و تعداد آن ها را تعیین کند[۱۸].

### ۱۰-۱- اساس کار فلوسایتومتری

در روش فلو سایتومتری سلولهای رنگ آمیزی شده چه به وسیله آنتی بادی های مونوکلو نال متصل به فلورسنت و چه فلوروکرومهای متصل شونده به اجزای سلولی دریک جریان سیال قرار گرفته و به صورت تک تک از مقابل پرتو نور لیزرعبور می کنند و متعاقب آن نور پراکنده شده و نور فلورسنس جانبی توشط آشکار سازها جمع آوری میشوند. این اشکار سازها سیگنالهای نوری را به سیگنالهای الکتریکی متناسب با نور جمع اوری شده تبدیل میکند . پراکنش نور در زاویه های

مختلف میتواند سلولها را بر اساس تفاوت در اندازه و پیچیدگی درونی از هم متمایز میکند در حالی که ساطع شدن نور از آنتی بادی های نشان دار شده با فلورسنت میتواند سلولها را بر اساس تفاوت در آنتی ژن های سطحی و سیتو پلاسمی از هم تفکیک نماید .بدین ترتیب سلولها بر اساس خصوصیاتی نظیر حجم گرانولاسیون و میزان رنگ پذیری از هم قابل افتراق داده میشوند[۱۹].




**شکل ۱۱: اساس کار فلوسایتومتر**

## ۱۰-۲- مراحل کار فلوسایتومتری

ابتدا سلول های نمونه جداسازی می شود و تخلیص می گردد سپس به تعداد سلول هایی که نیازمند به آنالیز آنها هستیم، آنتی بادی اختصاصی نشان‌دار شده اضافه می شود. در این مرحله آنتی‌بادی به سلول هدف خود می چسبد و وارد لوله دستگاه فلوسایتومتر می شود. سپس سلول ها یک به یک از مجرای فلوسایتومتر عبور کرده و در معرض نور لیزر دستگاه قرار می گیرد. دستگاه با آنالیز نور ساطع شده از آنتی‌بادی های نشان‌دار شده سلول ها را یک به یک شمارش و جداسازی می کند[۲۰].

## ۱۰-۳- مزایای تکنیک فلوسایتومتری

۱-در این تکنیک قابلیت تشخیص چندین نوع سلول از یکدیگر وجود دارد.

۲-در این تکنیک امکان تمایز سلول های زنده از مرده و حتی سلول های آپوپتوز اولیه و آپوپتوز ثانویه و نکروتیک از هم وجود دارد.

۳-در این روش امکان جداسازی فیزیکی انواع سلول ها از همدیگر وجود دارد که می توان سلول ها را بعداً بطور جداگانه مورد آنالیز بیشتر قرار داد.

۴-دقت این روش به دلیل برهمکنش آنتی‌ژن آنتی‌بادی فوق العاده زیاد است و خطای بسیار پائینی نیز دارد.

۵-تمامی مراحل انجام این روش با دستگاه انجام شده و سرعت انجام این روش بسیار بالا است.

## نتیجه گیری

اندازه گیری حیات، رشد و تکثیر سلولها کاربردهای مختلفی در تحقیقات دارد. یکی از قدیمی ترین روشها رنگ آمیزی سلولها با تریپان بلو است که حساسیت کافی نداشته و نیاز به بررسی میکروسکوپی دارد. روشهای دیگری نظیر اندازه گیری میزان کل اسیدهای هسته ای و میزان پروتئین در لیزات سلولی نیز از دقت کافی برخوردار نمی باشند. روش سل کانتر بسیار دقیق و سریع بوده و اطلاعات بسیار زیادی از سلول ها به ما می دهد.

اندازه گیری جذب مواد رادیواکتیو توسط سلولهای در حال رشد روش دقیقی است. ترکیباتی نظیر تیمیدین نشاندار شده با تریتیوم و ۵- بومودئواکسی اوریدین هنگام پرولیفراسیون سلول وارد ساختمان هسته سلول شده و باعث نشاندار شدن سلولها می شوند. اما این روش نیز وقت گیر بوده و بعلاوه نیازمند هاروست کردن سلولها پس از تحریک سلولی است. همچنین مشکلات مربوط به کار با مواد رادیواکتیو نظیر دفع مواد باقی مانده و حفاظت از اشعه را نیز به دنبال دارد.

روشهای دیگری نظیر اندازه گیری میزان کل اسیدهای هسته ای و میزان پروتئین در لیزات سلولی نیز از دقت کافی برخوردار نمی باشند.

در روش های سنجش آنزیم بهترین روش WST است و روش XTT نیز بهتر از روش MTT است از اینرو استفاده از کیت های WST توصیه می شود که سرعت و دقت بسیار خوبی دارند.

در سنجش میزان رنگ تولیدی در روش های آنزیمی از دستگاه الیزا ریدر استفاده می کنیم تا دقت کافی در اندازه گیری حاصل شود. بهترین و دقیق ترین روش استفاده از فلوساتومتر است که می توان انواع سلول ها و حتی نوع سلول های مرده را نیز مشخص کرد.

روش فلوسایتومتری دارای مزایای بسیاری است ولی به علت قیمت گران کیت های فلوسایتومتر فقط در موارد خاص به کار برده می شود.

## مراجع


۱. Briggs, C., *Quality counts: new parameters in blood cell counting.* International journal of laboratory hematology, 2009. **31**(3): p. 277-297.

۲. McCollum, T., et al., *Compact automated cell counter*. 2013, Google Patents.

۳. B. Leijnse, Lombarts, A., A. Koevoet, and *Basic principles and problems of haemocytometry.* Annals of clinical biochemistry, 1986. **23**(4): p. 390-404.

٤. Venkatalakshmi, B. and K. Thilagavathi. *Automatic red blood cell counting using hough transform*. in *2013 IEEE Conference on Information & Communication Technologies*. 2013. IEEE.

٥. Li, Z., et al., *Alignment and counting of mitochondria based on capillary electrophoresis.* Sensors and Actuators B: Chemical, 2018. **265**: p. 110-114.

٦. Selberg, S., et al., *Cell counter*. 2015, Google Patents.

٧. Lehninger, A.L., *The mitochondria.* Molecular Basis of Structure and Function. WH Benjamin, New York and Amsterdam, 1964.

٨. Van Meerloo, J., G.J. Kaspers, and J. Cloos, *Cell sensitivity assays: the MTT assay*, in *Cancer cell culture*. 2011, Springer. p. 237-245.

٩. Silva, W.J.d., et al., *Improvement of XTT assay performance for studies involving Candida albicans biofilms.* Brazilian dental journal, 2008. **19**(4): p. 364-369.

۱۰. Goodwin, C., et al., *Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS.* Journal of immunological methods, 1995. **179**(1): p. 95-103.

۱۱. Schultz, S.G., *Spectrophotometer*. 1987, Google Patents.

۱۲. Lequin, R.M., *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent*

*assay (ELISA).* Clinical chemistry, 2005. .**51**(12): p. 2415-2418

١٣. Jones, C.G., J.D. Hare, and S.J. Compton, *Measuring plant protein with the Bradford assay.* Journal of chemical .ecology, 1989. **15**(3): p. 979-992

١٤. Otto, W.R., *Fluorimetric DNA assay of cell number*, in *Epidermal Cells*. 2005, .Springer. p. 251-262

١٥. Butler, M. and M. Spearman, *Cell counting and viability measurements*, in *Animal Cell Biotechnology*. 2007, .Springer. p. 205-222

١٦. Reeve, D.R. and A. Crozier, *Radioactivity monitor for high-performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography A, 1977. **137**(2): p. 271-.282

١٧. Brown, M. and C. Wittwer, *Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology*. 2000, Oxford .University Press

١٨. Shapiro, H.M., *Practical flow cytometry*. .Sons & 2005: John Wiley

١٩. Givan, A.L., *Flow cytometry: first .principles*. 2013: John Wiley & Sons

٢٠. Melamed, M.R., et al., *Flow cytometry and sorting.* American Journal of Clinical .Oncology, 1991. **14**(1): p. 90