Nejadmoghaddam

Mohammad-Reza

Contact

Address
#Avicenna Research Institute

Contact
+98 021 2243 2020

Email:
moghaddam@avicenna.ac.ir
mrnejadmoghaddam@gmail.com

This is a sample text. Insert your desired text here.

Education

2018 Tehran university of Medical Sciences (TUMS).

2006 Azad University, Jahrom Branch

1999 Azad University, Tonekabon Branch

1994 Kosar High school in Tonekabon City, Mazandaran Province

Experience

2020

Manager of Nanotechnology Research Group of Avicenna Research Institute

2020- Continue

2015

Avicenna Research Institute Core Facility Management

2015-2019

2008

Avicenna Faculty Member

2008-continue, During this, I have been a member of the steering committee of the ISO quality management system at the ARI

Skills

60%

Inter Laboratory Study (ILS)

80%

Nanomedicine, e.g.., Antibody–drug conjugates (ADCs)

70%

Project management and organization research

مروری بر تئوری روش‌های بررسی سمیت سلولی

و آموزش گام به گام آنالیز IC_{50} با نرم‌افزار پریزم

فهرست مطالب

بخش ۱ – مقدمه و تعاریف:

بخش ۲ – کاربردهای تکنیک ارزیابی سمیت مواد چگونه است؟:

بخش ۳ – روش‌های ارزیابی سمیت سلولی:

۳-۱- روش تشکیل کلنی(Clonogenic method)

۳-۲- روش غیر تشکیل کلنی(Non-Clonogenic method)

- بررسی تغییرات مورفولوژی
- تفاوت غشای سلول زنده و مرده در نفوذپذیری به یک رنگ
- Neutral red assay
- Alamar Blue (resazurin) assay
- LDH assay
- Annexin V/PI staining
- Calcein assay
- Tetrazolium reduction assays

فهرست مطالب

بخش ۴ – مکانیسم‌های سمیت سلولی:

۴-۱- آپوپتوز (apoptosis) یا نکروز (necrosis)

بخش ۵ – ارزیابی IC50 با نرم‌افزار پریزم:

بخش ۶ – جمع‌بندی و بدیهیات آزمون‌های بررسی سمیت سلولی :

منابع مورد استفاده:

- Patil, Aakanksha Arvind. "***Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities.***" Journal of Innovative Science, Engineering & Technology (2021).
- León-Mejía, Grethel, et al. "***Cytotoxicity as a Fundamental Response to Xenobiotics.***" Cytotoxicity (2021).
- Riss, Terry, et al. "***Cytotoxicity assays: in vitro methods to measure dead cells.***" Assay Guidance Manual [Internet] (2019).
- Orellana, Esteban A., and Andrea L. Kasinski. "***Sulforhodamine B (SRB) assay in cell culture to investigate cell proliferation.***" Bio-protocol 6.21 (2016).
- Gump, Jacob M., and Andrew Thorburn. "***Autophagy and apoptosis: what is the connection?.***" Trends in cell biology 21.7 (2011): 387-392.

مقدمه

- سمیت به توانایی یک مولکول یا ترکیب در ایجاد برخی انواع آسیب‌های سلولی است.
- آسیب‌هایی که می‌تواند بر سلول ایجاد شود یا آسیب بر ساختار است یا فرآیندهای حیاتی ماندگاری سلول شامل:
  - بقاء (survival)
  - تقسیم سلولی (cell division)
  - بیوشیمی سلول (cell biochemistry)
  - فیزیولوژی نرمال سلول (normal cell physiology)
- ارزیابی خواص سم‌شناسی و سلول‌کشی مواد شیمیایی به روش in vitro از لحاظ ملاحظات اخلاقی، آزمون جایگزین و قابل رقابت نسبت به آزمون‌های in vivo است.

کاربردهای تکنیک ارزیابی سمیت مواد چگونه است؟

- کشف دارو (*Drug discovery*)
  - شناسایی ترکیب بالقوه فعال جدید (*Identification of potentially active compound*)
  - مطالعه مکانیسم فعالیت/اثر ماده مورد مطالعه (*Study mechanism of action*)
  - شناسایی دامنه فعالیت/محدوده غلظت فعالیت ماده مورد مطالعه (*Study drug resistance*)
  - مطالعه ترکیبات دارویی برای دستیابی به اثر درمانی موثر در بیماران سرطانی (*Study drug combinations*)
  - مطالعه عملکردهای متفاوت سلولی در ازای ترکیب مورد مطالعه (*Cellular pharmacology*)
- کشف آفت‌کش‌ها (*Pesticide discovery*)
- ارزیابی ریسک مواجهه محیط زیست با مواد جدید (*Environmental Health and Safety*)

روش‌های ارزیابی سمیت سلولی

- روش تشکیل کلنی (*Clonogenic method*)
  - کم هزینه و اجرای آن ساده‌تر است و تکرارپذیری دارند.
  - امکان اجرا در حجم بالا را ندارد (*Not readily amenable to high throughput*)

- روش غیر تشکیل کلنی (*Non-Clonogenic method*)
  - روش مستقیم (*Direct Measurements*)
  - روش غیرمستقیم (*Indirect measurement*)

مبنای سنجش سمیت سلولی در آزمایشگاه (*In vitro*)، ارزیابی توانایی سلول‌ها برای زنده ماندن در برابر حضور یک ترکیب است!

روش‌های ارزیابی سمیت سلولی

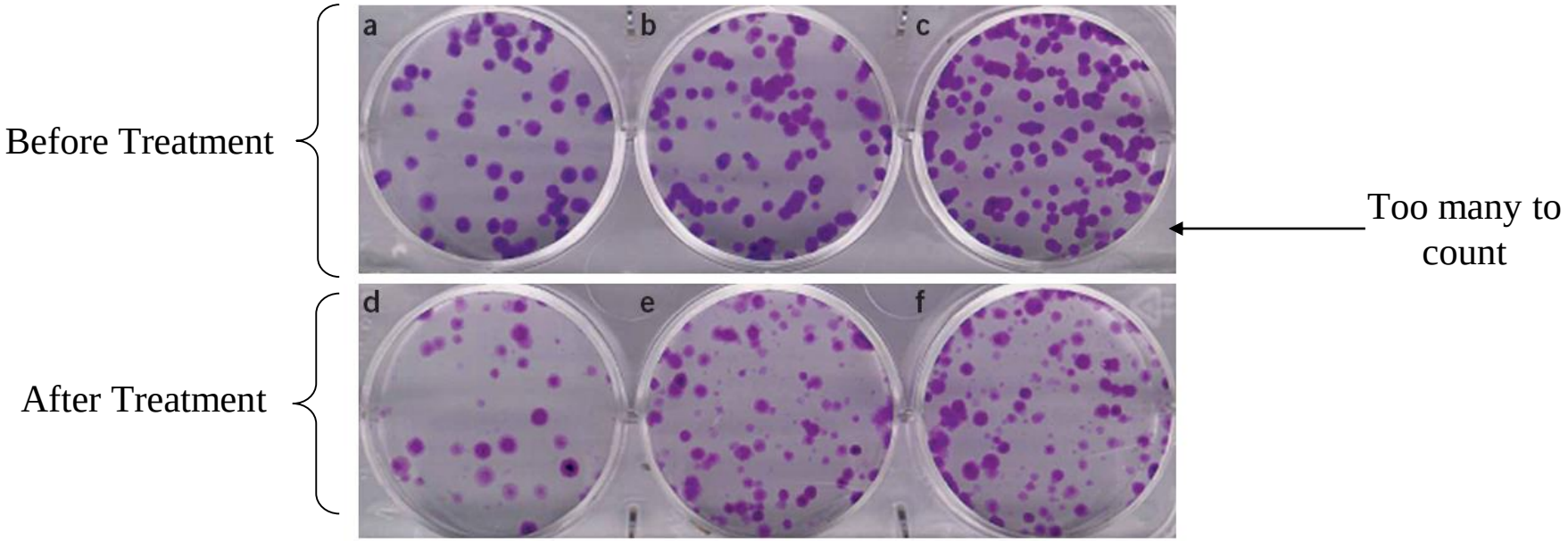
❑ روش تشکیل کلنی (*Clonogenic method*)

۱- سلول‌ها توسط ماده مورد آزمون تیمار می‌شوند.

۲- سلول‌ها تیمار شده و کنترل در محیط کشت سلول رشد داده می‌شوند

۳- قسمت مایع محیط کشت جدا شده و کلنی‌ها فیکس و با رنگ‌های چون کریستال ویوله رنگ‌آمیزی شده و شمارش می‌شوند.

۴- نسبت سلولهای زنده مانده در حالت تیمار شده و تیمار نشده، میزان سمیت ماده مورو مطالعه راست.



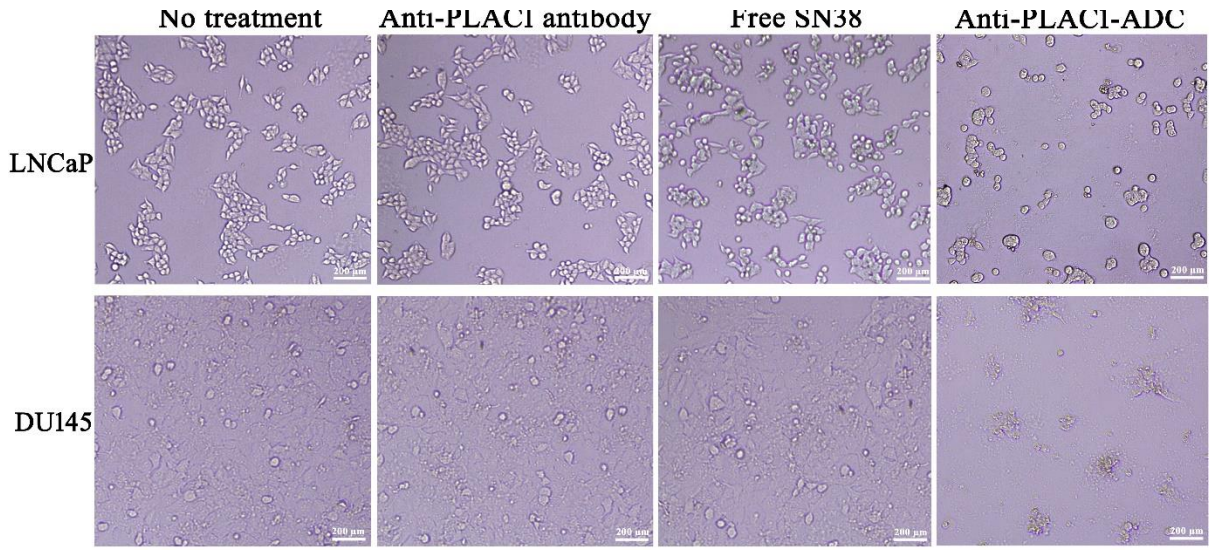
*Franken N., Rodermond H., Stap J, Haveman J, van Bree C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. Nature Protocols **1**: 2315-2319.*

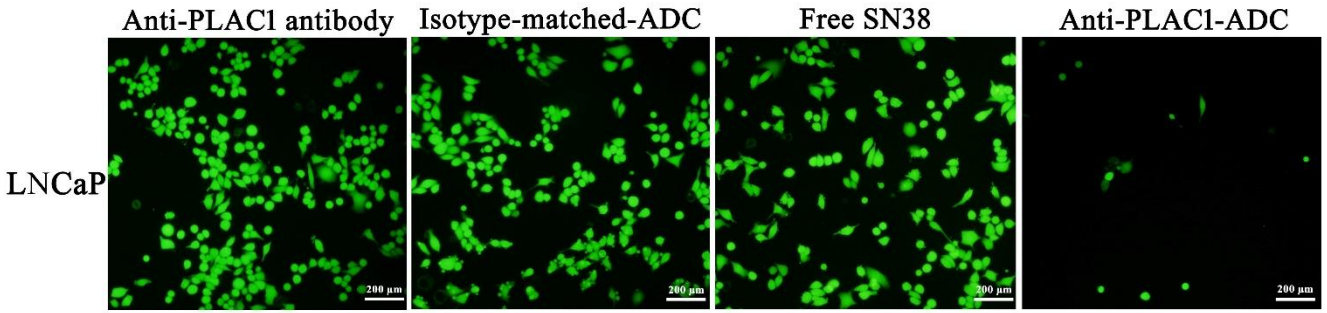
روش‌های ارزیابی سمیت سلولی

❑ روشهای *Non-Clonogenic* مستقیم

- بررسی تغییرات مورفولوژی
- تفاوت غشای سلول زنده و مرده در نفوذپـذیری به یک رنگ مثل:

Sulforhodamine B (SRB Assay) ،Trypan Blue





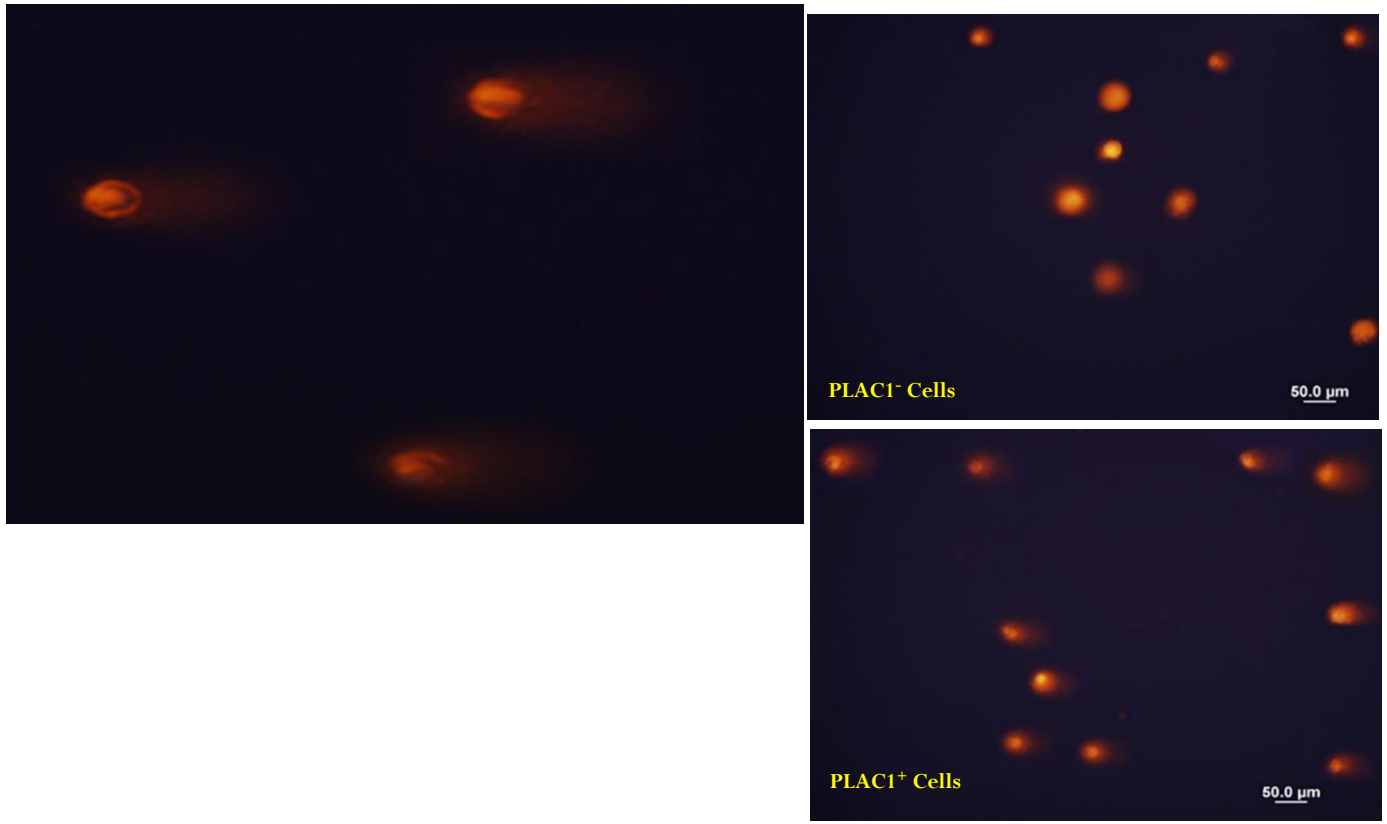
Nejadmoghaddams et al., Scientific Reports volume 7, Article number: 13373 (2017)

روش‌های ارزیابی سمیت سلولی

- روشـــــــــــهای *Non-Clonogenic* مستقیم

- نفوذپذیری رنگ به داخل هســته ســلول مرده نسبت به سلول زنده:

Propidium iodide یا ***ethidium bromide***



Nejadmoghaddams et al., Scientific Reports volume 7, Article number: 13373 (2017)

روش‌های ارزیابی سمیت سلولی

❑ روشهای *Non-Clonogenic* غیرمستقیم

- Neutral red assay= این رنگ لیزوم سلول‌های زنده را رنگ‌آمیزی می‌کند و برای ارزیابی فعالیت لیزوزوم و دستگاه گلژی سلول کاربرد دارد!

- Alamar Blue (resazurin) assay = یک اندیکیتور ردوکس (*Oxidation-reduction*) است. که در حضـور احیـاء کننده‌های *FMNH2, FADH2, NADH, NADPH* و سیتوکرومها (که نشان دهنده فعال بودن فرآیند متابولیکی سلول اسـت) از آبی به رنگ فلورسنت صورتی تغییر می‌یابد!

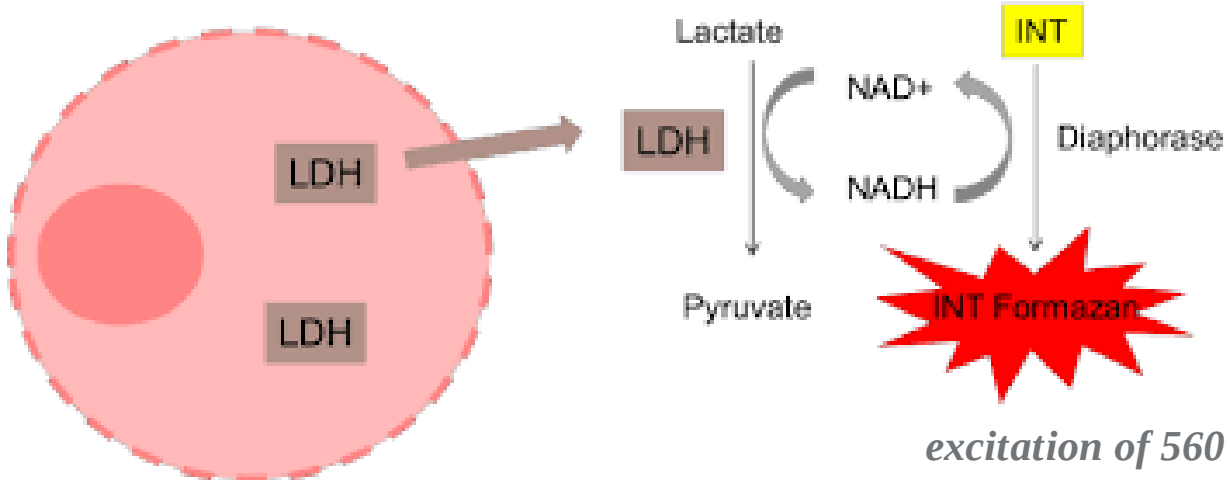
7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide

530–580 nm as excitation wavelengths and 570–620 nm as emission wavelengths, since this dye has both chromophoric and fluorophore properties

روش‌های ارزیابی سمیت سلولی

❑ روشهای *Non-Clonogenic* غیرمستقیم

- LDH assay = یک روش ساده برای اندازه‌گیری کمی سمیت مواد بواسطه آسیب غشای سلولی است. به این ترتیب که آنزیم لاکتات دی‌هیدروژناز (*LDH*) که یک آنزیم تقریباً پایدار سیتوپلاسمی است فقط در سطح سلول‌های مرده ظاهر می‌شوند و می توانند نمک تترازولیوم را به یودونیتروتترازولیوم (*iodonitrotetrazolium*) احیا کند که فلورسانس قرمز ایجاد می‌کند.

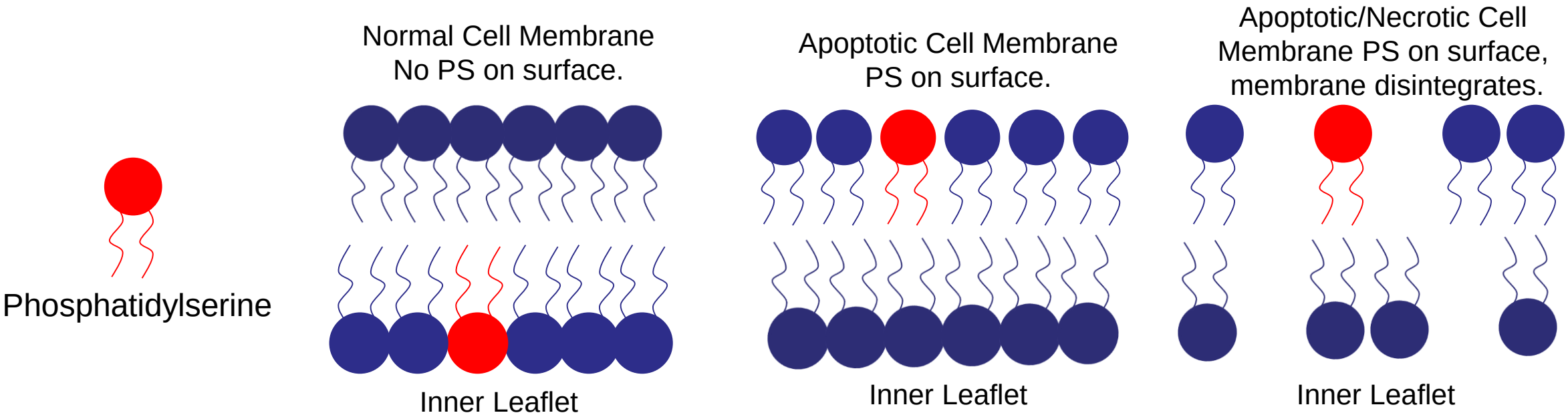


excitation of 560 nm and emission of 590 nm.

روش‌های ارزیابی سمیت سلولی

❑ روشهای *Non-Clonogenic* غیرمستقیم

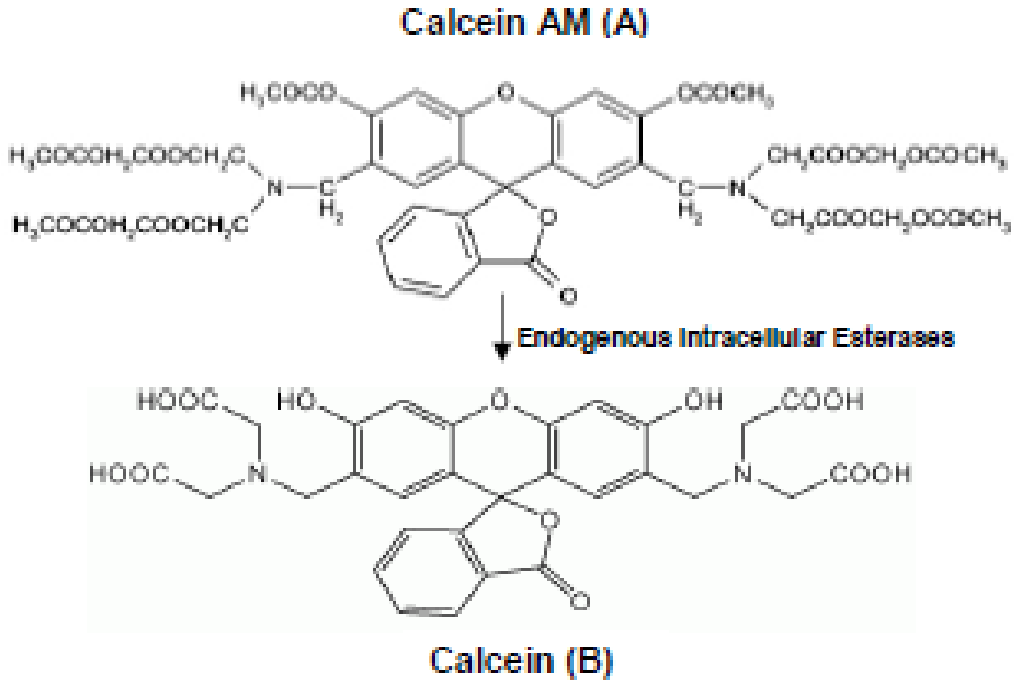
- Annexin V/PI staining= هم یک روش ساده برای اندازه‌گیری کمی سمیت مواد بواسطه آسیب غشای سلولی است. به این ترتیب که سلول‌هایی که دچار آسیب شده‌اند در سطح غشاء خارجی خود فسفاتیدیل‌سرین(PS) بالایی دارند. Annexin V یک پروتئین سلولی با قابلیت اتصال به فسفاتیدیل سرین است و آزمون آپپتوزیس به روش Annexin V-FITC and PI double staining، برپایه کونژوگه این پروتئین به رنگ FITC و بکارگیری آن در اندازه‌گیری میزان حضور فسفاتیدیل سرین غشاء خارجی سلول طراحی شده است



روش‌های ارزیابی سمیت سلولی

❑ روشهای *Non-Clonogenic* غیرمستقیم

- **Calcein assay**= سوبسترای Calcein AM که غیرفلورسانس است و به آسانی قابلیت نفوذ در سلول‌های زنده را دارد توسط آنزیم‌های استرئازهای داخل سلولی تبدیل به فرم فلورسانس سبز Calcein می‌شود که در داخل سیتوپلاسم باقی‌می‌ماند. درحالیکه سلول‌های مرده فاقد آنزیم‌های استرئازی هستند!

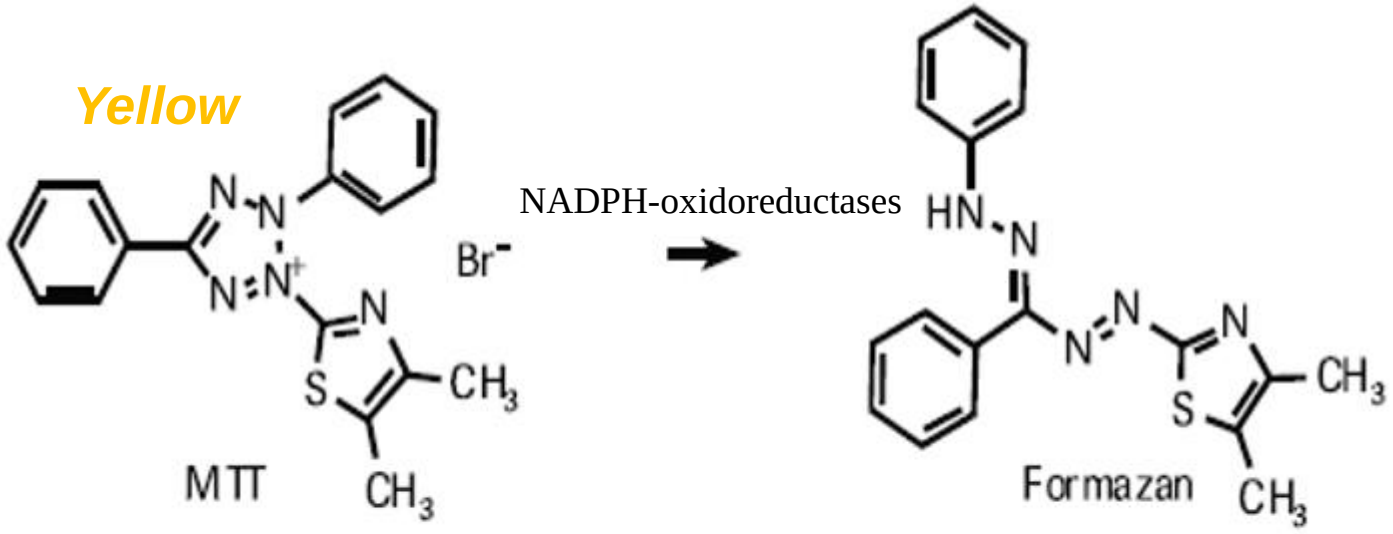


Calcein assay: A non-fluorescent, hydrophilic compound that easily permeates intact, live cells. The hydrolysis of Calcein AM by intracellular esterases produces calcein (structure B), a hydrophilic, strongly fluorescent compound that is well-retained in the cell cytoplasm. Cells grown in black-walled plates can be stained and quantified in less than two hours.

روش‌های ارزیابی سمیت سلولی

❑ روشهای *Non-Clonogenic* غیرمستقیم

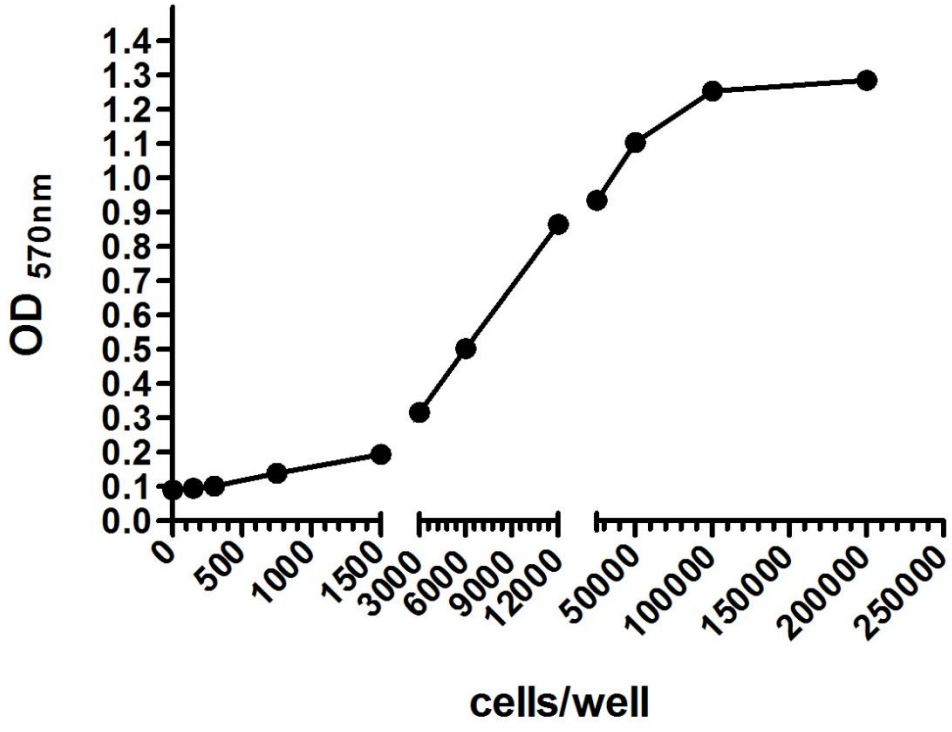
– **MTT assay**= سوبسترای زرد کم رنگ نمک تترازولیوم **MTT** در حضور فعالیت متابولیکی آنزیم سوکسـونیک دهیـدروژناز میتوکندری سلول‌های زنده تبدیل به کریستال‌های رنگی فورمازان (**formazan**)



Metabolization of MTT to a formazan salt by viable cells.

determined by optical density (OD) at 570 nm use the Spectrophotometer

Cells number titration to seed in cell culture plate



- Untreated cells need to be growing exponentially when you "stop" the assay by adding MTT.
- Treated cells which are going to be a much lower density can have a higher metabolic activity (which MTT determines) and so appear to be less "inhibited" with respect to control cells.
- the upper limit of absorbance value for any reader >1.2 - should not be exceeded if you can avoid it,. Thus, high cell number can cause absorbance saturation and lower estimation of total cells.
- Thus, if you do an assay for 3 days, you should have a cell number that can double the MTT absorbance if they were incubated for another day.

روش‌های ارزیابی سمیت سلولی

❑ روش کار MTT:

1. Plate cells into 96-well tissue culture plates. In general, 5000 -10,000 cells per well according to the experimental factors tested.

2. Carry out your experiment by adding chemicals or biological agents into appropriate well. Incubate for 6 to 24 hours.

3. Add 10 µl MTT Reagent.

4. Incubate for 2 to 4 hours until purple precipitate is visible.

5. Remove medium and add 100µL DMSO into each well to dissolve the formazan.

6. Leave at room temperature in the dark for 2 hours or Shaking 15min.

7. Record absorbance at 570 nm.

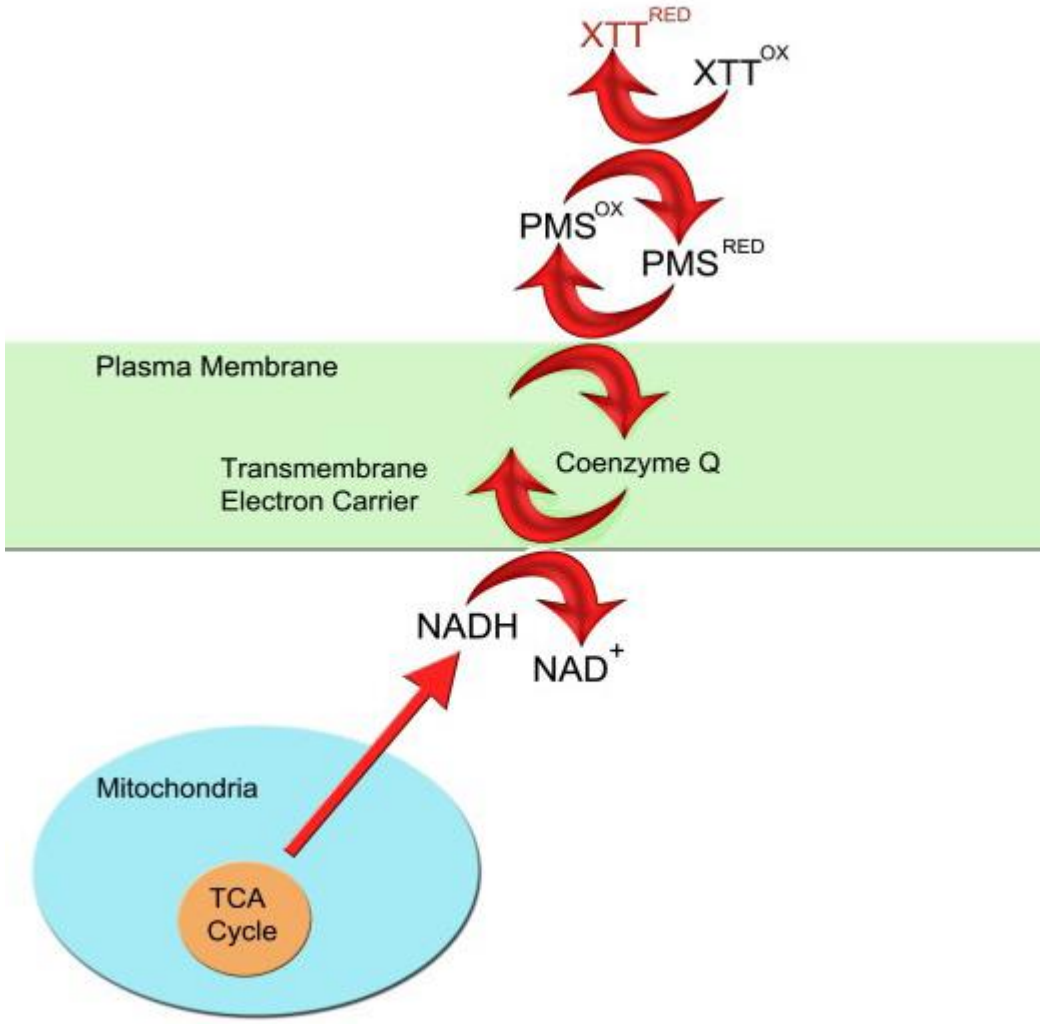
استراتژی انتخاب کنترل‌های صحیح در آزمون‌های بررسی سمیت!؟

$$\%\ \text{Cell Cytotoxicity} = \frac{(100\ \times (control - sample)}{control}$$

روش‌های ارزیابی سمیت سلولی

❑ سایر روشهای مشابه MTT:

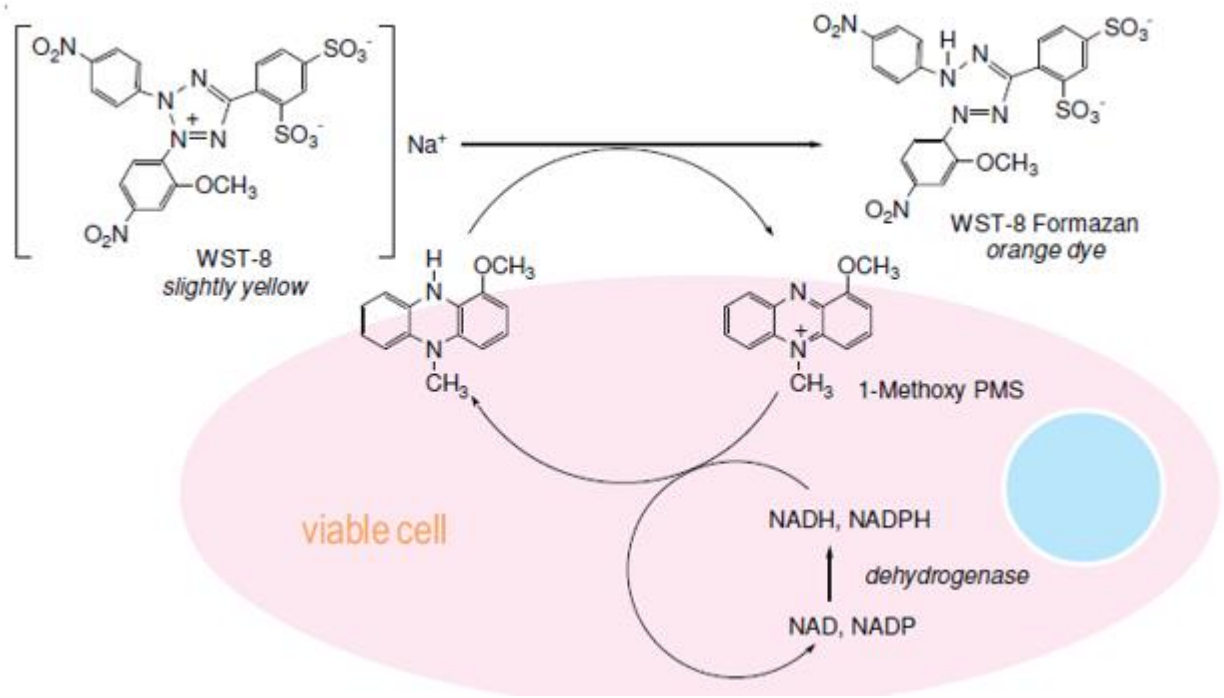
- XTT assay= روش بهبود یافته MTT است کــه در آن با استفاده از یک ناقل الکترون به نام *PMS* (*N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate*) باعــث محلــول شــدن فورمازان (*formazan*) می‌شود!



روش‌های ارزیابی سمیت سلولی

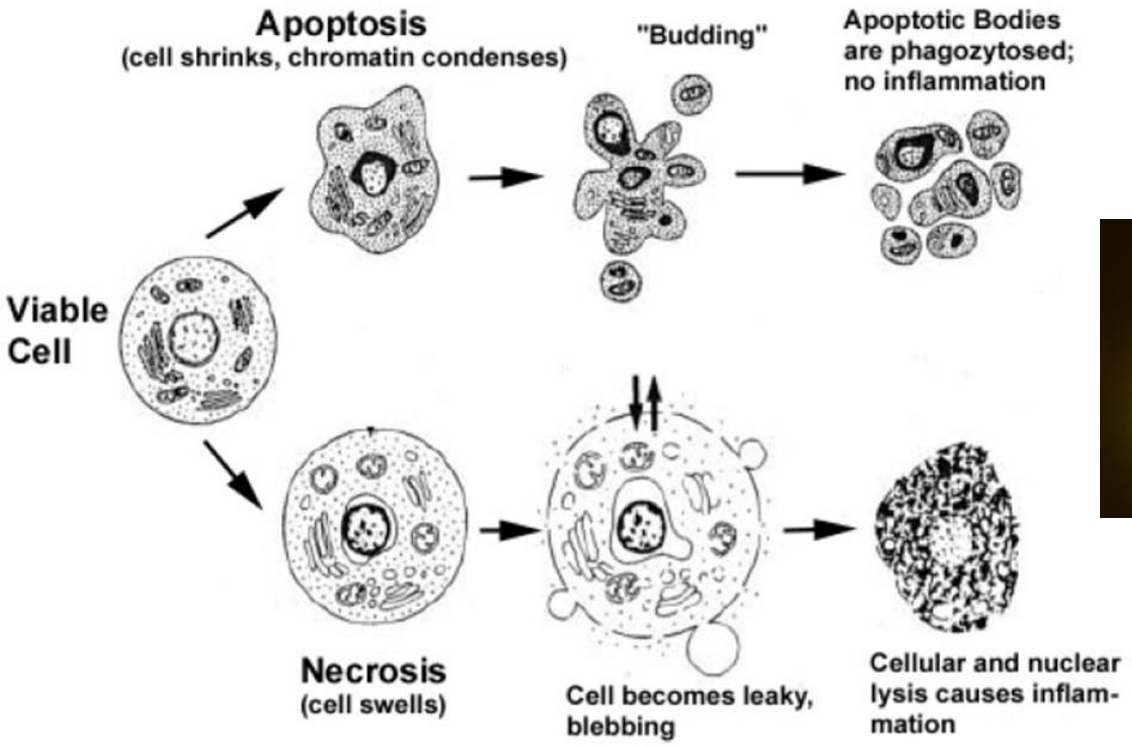
❑ سایر روشهای مشابه MTT:

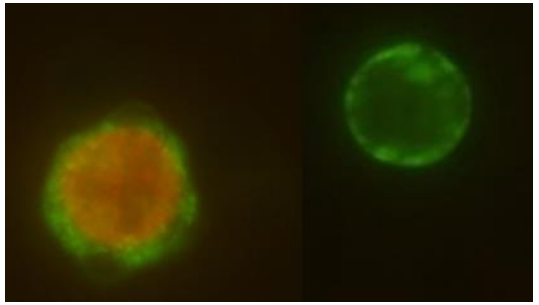
- WST assay= از یک نمک تترازولیوم کاملاً حلال در محیط آبی در اثر احیا توسط آنزیمهای سلولی ساخته شده است!

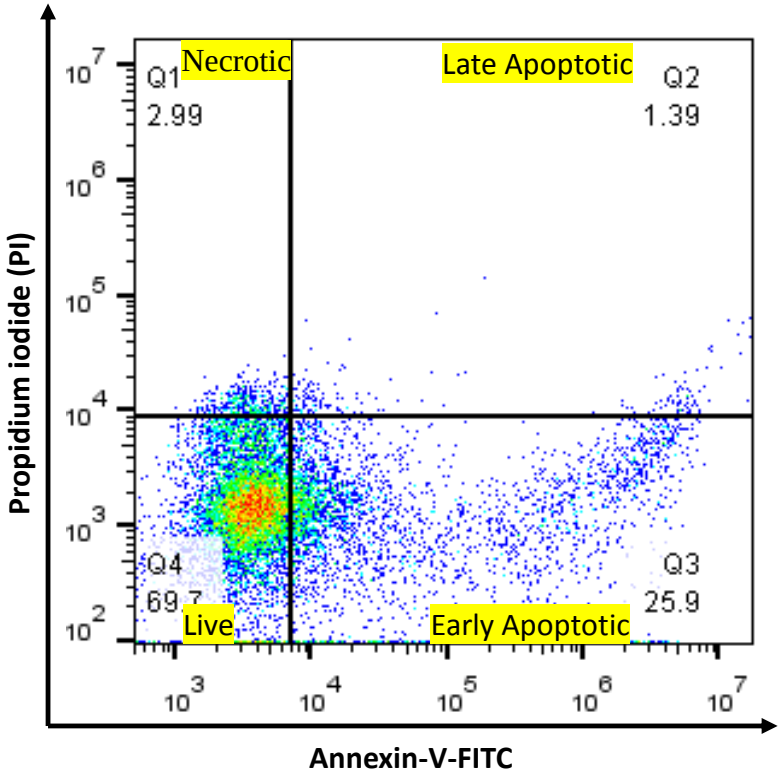


مکانیسم‌های سمیت سلولی

- آپوپتوز (apoptosis) یا نکروز (necrosis):

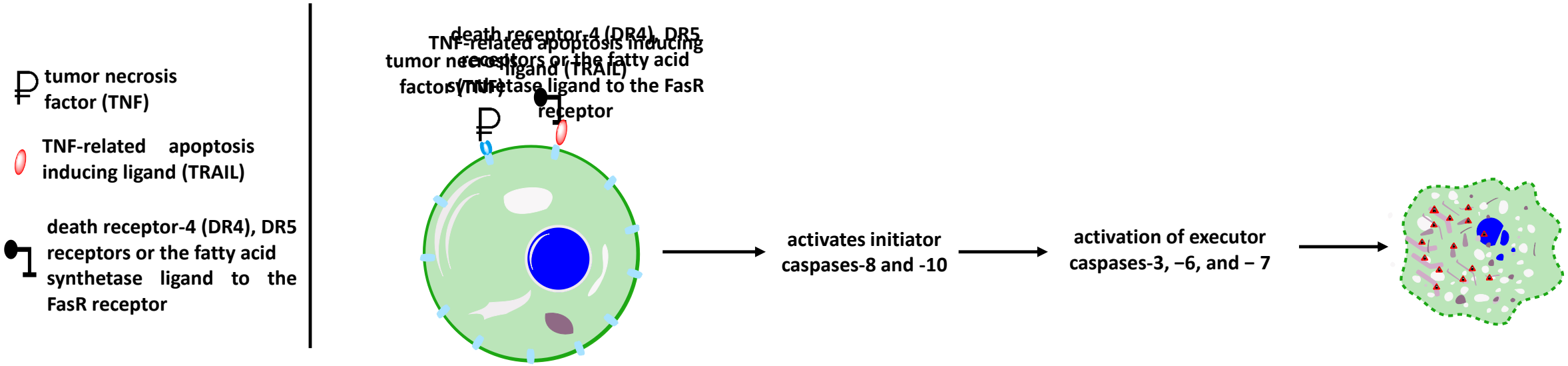




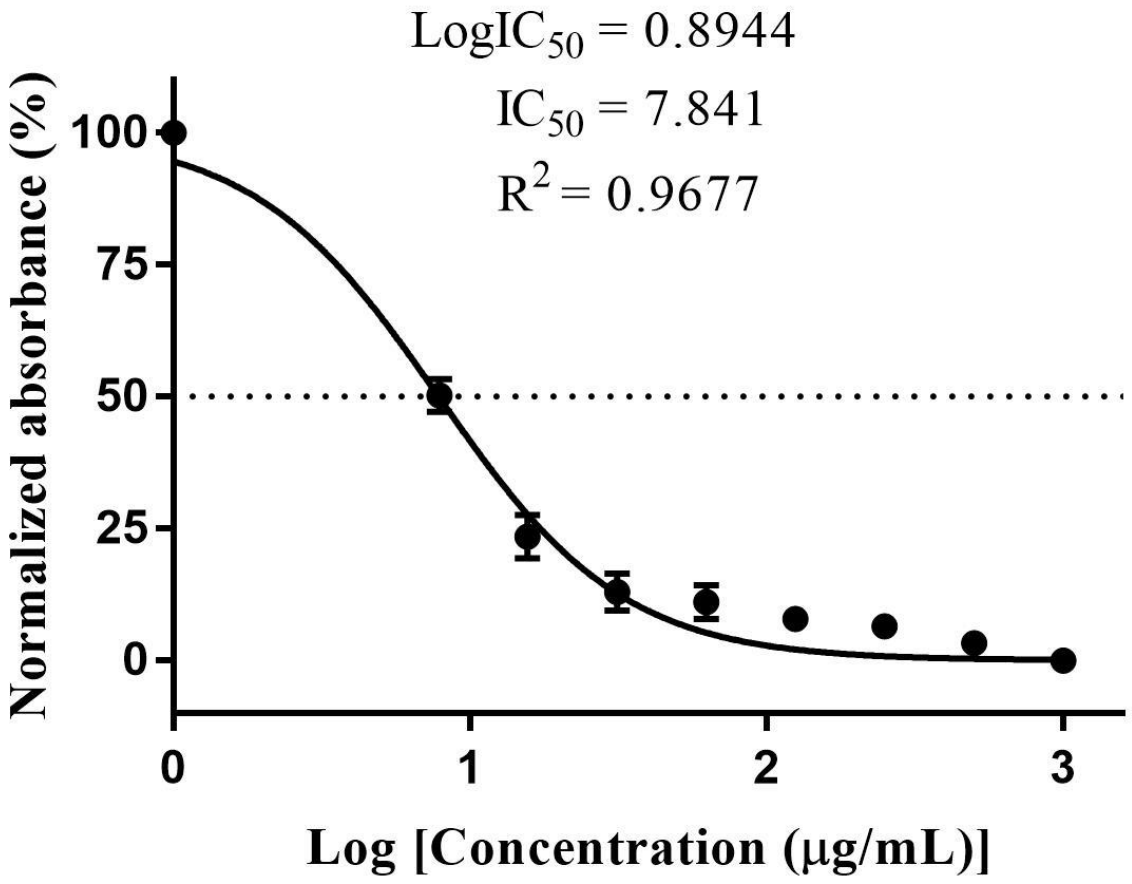


مکانیسم‌های سمیت سلولی

- **مکانیسم آپوپتوز:** سلول با به خدمت گرفتن مولکولهای آداپتوری مثـل (FADD) Fas-associated deth domain یا پذیرنده‌های مرتبط به بخش مرگ سلول (TRADD) که کاسپازها را فعال می‌کند شروع می‌شود



ارزیابی IC50 با نرم‌افزار پریزم



جمع‌بندی و بدیهیات آزمون‌های بررسی سمیت سلولی

- اغلب موادی که اثر سمیتی در *in vitro* ندارند در *in vivo* هم فعالیت سمی نخواهد داشت.
- بسیاری از مواد غیرسمی بخاطر متابولیسمشان در کبد ممکن است سمی شوند، مضاف اینکه بسیار از مواد که در *in vitro* اثر سمی از خود نشان داده‌اند ممکن است اثر سمی آنها توسط آنژیمهای کبدی خنثی شود!
- اگر در *in vitro* ماده‌ایی فعالیت سمی از خود نشان دهد حتماً در مطالعات *in vivo* هم اثر سمیت خواهد داشت ولی ممکن است این اثر سمیت با کاهش یا افزایش همراه باشد!
- پاسخ سمیت *in vitro* با تغییرات در بقاء یا متابولیسم سلول اندازه‌گیری می‌شود. درحالیکه مسئله اصلی در *in vivo* ممکن است پاسخ بافت، واکنش‌های التهابی یا فیبروزیز باشد. لذا طبیت پاسخ مورد بررسی می بایست به دقت مدنظر قرار گیرد.
- برای اینکه نتایج آزمون بررسی سمیت *in vitro* مجوزی برای آزمون‌های پریکلینیکال (*animal study*) باشد. نیاز به اثبات شباهت پتانسیل/مکانیسم سمیت ماده مورد آزمون *in vitro* و *in vivo* است!

اطلاعات تماس

تماس با ما

۰۲۱۲۴۳۲۰۲۰

۰۹۱۲۲۷۶۷۹۱۸

رایانامه

moghaddam@avicenna.ac.ir

mrnejadmoghaddam@gmail.com

وب‌سایت

.....

.....

واتس آپ

.....

اینستاگرام

.....

لینکدین

https://www.linkedin.com/in/mohammad-reza-nejadmoghaddam-23361a11/?originalSubdomain=ir

سپاس از حسن توجه شما