سرم حیوانی مخلوط بسیار پیچیده ای از تعداد زیادی از اجزاء تشکیل دهنده، مولکول های زیستی با وزن مولکولی کم و بالا، با فعالیت های مختلف و متعادل کننده فیزیولوژیکی تقویت کننده و بازدارنده رشد است. زیست شناسی سلولی و بیوشیمی مدرن امکان شناسایی فاکتور‌های سرم دخیل در فرآیندهای in vivo مانند تکثیر سلولی و ترمیم بافت و بلوغ و تمایز سلولی (به عنوان مثال بلوغ جنینی، سلول های بنیادی) را فراهم می کند. اجزای معمولی (مواد تشکیل دهنده) سرم در جدول 1 آورده شده است(7).

استفاده از FBS اولین بار در سال 1950 توسط تئودور پاک انجام گرفت. FBS حاوی اجزا ضروری برای تکثیر و نگهداری سلولی مانند هورمون ها، ویتامین‌ها، پروتئین‌های حمل و نقل و عناصر کمیاب و عوامل انتشار و رشد است. اگرچه امروزه سرم‌های گاوی با منشاء جایگزین (سرم گوساله تازه متولد شده، سرم گوساله و سرم اهدایی گاو) در دسترس هستند، اما FBS و FCS به دلیل محتوای کم ایمونوگلوبین و عوامل مکمل بیشترین استفاده را دارند. FBS از خون گوساله های متولد نشده (جنین) در هر مرحله رشدی در دو سوم آخر بارداری جمع آوری می شود که عمدتاً به طور تصادفی هنگام ذبح گاوهای باردار کشف می شود. تخمین زده شده است که تقریباً 8 درصد از گاوهای خط کشتار در مراحل مختلف بارداری باردار هستند. ارقام اخیر تخمین می زند که حدود 800000 لیتر FBS سالانه در سراسر جهان تولید می شود که مربوط به 2000000 جنین گاو است و تعداد آنها همچنان در حال افزایش است. استفاده از FBS با مشکلاتی نظیر ترکیب ناشناخته، تغییرات کمی و کیفی بین دسته های سرم، تغییرپذیری فصلی و جغرافیایی و واکنش ناخواسته با مواد آزمایشی همراه است که منجر به پیامدهای غیرمنتظره یا نامطلوب، نگرانی های ایمنی جدی برای پرسنل آزمایشگاه از نظر اندوتوکسین ها، مایکوپلاسما، هموگلوبین، آلاینده های ویروسی، باکتری ها، قارچ ها، مایکوپلاسم ها یا پروتئین های پریون و همچنین نگرانی های اخلاقی در رابطه با آزار جنین می شود(1).

از جمله مشکلات ناشی از استفاده از FBS ، سرکوب غضروف سازی القا شده توسط TGF-β1 درسلول‌های فیبروبلاست نوعB و مهار تولید گلوکزآمینوگلایکان و کلاژن نوع 2 است(2). همچنین این فرضیه وجود دارد که جنین‌های گوساله در حین جمع آوری FBS دچار رنج و آزار آگاهانه خواهند شد(3).

استفاده از محیط‌های بدون FBS منجر به کاهش رنج حیوانات و تکرار آزمایش‌های حیوانی میشود(4). به طور کلی با توجه به چالش‌های علمی و اخلاقی، جستجو برای جایگزین‌هایی برای FBS و سرم مشتق‌شده از حیوانات به یک هدف اصلی در زمینه تحقیقات کشت سلولی و بافتی تبدیل شده است. چندین رویکرد، مانند محیط‌های بدون سرم، محیط‌های بدون پروتئین، محیط‌های بدون اجزای مشتق شده از حیوانات (محیط‌های بدون xeno) و محیط‌های شیمیایی تعریف‌شده در حال توسعه و بکارگیری هستند.(5).

جدول 1. مواد تشکیل دهنده ی سرم

|  |  |
| --- | --- |
| Albumin  Globulins (e.g. Immunglobulins, IgG)  α1-Antitrypsin (Protease Inhibitor)  α2-Macroglobulin (Protease Inhibitor)  Transferrin  Transcortin  α1-Lipoprotein  β1-Lipoprotein  Fibronectin  Laminin  Serum Spreading Factor  Lactate Dehydrogenase  Alkaline Phosphatase  γ-Glutamyl Transferase  Alanine Aminotransferase (ALT/GPT)  Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) | **Protein Components**  Serum proteins:  Transport proteins:  Attachment and Spreading Factors:  Enzymes: |
| Insulin  Glucagon  Corticosteroids  Vasopressin  Thyroid Hormones  Parathyroid Hormone  Growth Hormone  Pituitary Glandotropic Factors  Prostaglandins | **Hormones** |
| Epidermal Growth Factor (EGF)  Fibroblast Growth Factor (FGF)  Nerve Growth Factor (NGF)  Endothelial Cell Growth Factor (ECGF)  Platelet-derived Growth Factor (PDGF)  Insulin-like Growth Factors (IGFs)  Interleukins  Interferons  Transforming Growth Factors (TGFs) | **Growth Factors** and Cytokines |
| Free and Protein-bound Fatty Acids  Triglycerides  Phospholipids  Cholesterol  Ethanolamine  Phosphatidylethanolamine | **Fatty Acids and Lipids** |
| Retinol/Retinoic Acid (Vitamin A)  Vitamin B-Group:  Thiamine  Riboflavin  Pyridoxine/Pyridoxalphosphate  Cobalamin  Folic Acid  Niacinamide/Nicotinic Acid  Panthotenic Acid  Biotin  Ascorbic Acid (Vitamin C)  α-Tocopherol (Vitamin E)  Selenium, Iron, Zinc, and  Cu, Co, Cr, I, F, Mn, Mo, V, Ni, Sn | **Vitamins and Trace Elements** |
| Glucose  Galactose  Fructose  Mannose  Ribose  Glycolytic Metabolites | **Carbohydrates** |
| Urea  Purines/Pyrimidines  Polyamines  Creatinine  Amino Acids | **Nonprotein Nitrogens** |

با توجه به وجود اجزای نامشخص یا ناشناخته در FBS، سیستم‌های کشت بدون سرم اکنون بهینه شده‌اند تا از اثرات احتمالی ناشی از فاکتورهای رشد متمایزکننده نامشخص و خطر آلودگی از عوامل بیماری‌زای بالقوه موجود در سرم حیوانات (مانند مایکوپلاسما، ویروس ها و پریون ها) جلوگیری شود(5). اولین استفاده گسترده از محیط بدون سرم برای کشت های عصبی اولیه و برای بیشتر مایع مغزی- نخاعی (CSF) ایجاد شد که معمولاً حاوی کمتر از 0.001٪ پروتئین در مقایسه با تقریباً 8٪ پروتئین در سرم است. این راهکار اکنون برای کاردیومیوسیت ها (داس و همکاران، 2004؛ ناتاراجان و همکاران، 2006، 2011)، نورون های هیپوکامپ (Varghese و همکاران، 2009)، نورون های حرکتی (MNs) (Das et al., 2003) نورون های حسی (گوو و همکاران، 2013؛ رامسی و همکاران، 2010) و عضله (داس و همکاران، 2006، 2007b، 2009؛ Varghese و همکاران، 2009) کاربرد دارد(6).

هنگام در نظر گرفتن مکمل محیط کشت سلول و بافت با سرم حیوانی، اصل "نه، مگر اینکه..." باید اعمال شود. ترجیحاً، محیط نباید حاوی هیچ جزء مشتق شده از حیوان باشد، مگر اینکه ثابت شود که یک نیاز مطلق است. افزودنی‌های محیط کشت که با سرم جنین گاوی مقایسه شده اند عبارت اند از: زرده تخم مرغ، عصاره جنین مرغ، عصاره پلاکتی انسان، سرم انسان، پلاسمای انسان، مایع داخل چشم گاو، آغوز گاو، عصاره هیپوفیز، سرم موش، سرم گوسفند، سرم رت و سرم اسب، بخش‌های پروتئینی از عصاره‌های گیاهی به نام سرم گیاهی (7).(7) یکی از جایگزین های معرفی شده برای FBS لیزات پلاکت های خون انسان (Human platelet lysates (hPL)) یا ترومبوسیت‌ها هستند. . پاسخ های اولیه در دهه 1980 به این سوال که چرا پلاسما و سرم توانایی های متفاوتی برای توسعه رشد سلول های کشت شده در شرایط آزمایشگاهی دارند داده شد و دریافتند که سرم، نه پلاسما، حاوی عوامل میتوژنیک است(8). بهینه‌سازی محیط‌های کشت موجود، استفاده از محیط‌های سرمی کاهش‌یافته وطراحی محیط‌های بدون سرم بر پایه شیمیایی می‌توانند نیاز به FBS را کاهش دهند(7).

علیرغم معایب و جنبه‌های اخلاقی مهمی که برای استفاده از سرم جنین گاوی مورد بحث قرار گرفته است، تقاضای جهانی برای FBS به طور مداوم در دهه‌های گذشته افزایش یافته است. اگرچه یکی از مزایای محیط های بدون سرم، افزایش انتخاب برای انواع رده های سلولی است، اما باعث کاهش تکثیر(multiplicity) در استفاده از محیط های توسعه‌یافته نیز می شود. با افزایش تصاعدی شناسایی و تولید سالانه رده‌های سلولی ، نیازبه محیط‌های اختصاصی سلول نیز افزایش یافته است، چرا که محیط‌های غیر‌اختصاصی اغلب منجر به رشد کندتر در مقایسه با محیط‌های حاوی FBS می‌شوند. علاوه بر این، جایگزینی سرم با اجزای تعریف شده شیمیایی، نه تنها به دانش و تجربه گسترده، بلکه به طیف وسیعی از مواد بیوشیمیایی با درجه خلوص بالا نیاز دارد که دسترسی تجاری آنها همیشه تضمین شده یا بهینه نیست. همچنین یافتن یک جایگزین جدید و تطبیق آن با رده‌های سلولی مختلف فرآیندی زمان‌بر است. از طرفی تغییرمحیط کشت، براساس نیازهای سلولی یک سلول خاص می‌تواند پرهزینه باشد، زیرا گزینه های بدون FBS می توانند گران‌تر از محیط‌ حاوی FBS باشند(5).

محیط 199 و محیط Ham’s Nutrient Mixture F-10, F-12 اولین محیط‌کشت‌هایی بودند که به طور خاص بدون مکمل سرم برای استفاده طراحی شدند. محیط 199، علاوه بر اجزای پایه الکترولیت ها، آمینواسیدها و گلوکز، با ویتامین‌ها و عناصر کمیاب مناسب برای کشت بدون سرم فیبروبلاست های جنین مرغ غنی شده است. محیط F-12 Ham's علاوه بر این‌ها، حاوی سولفات‌روی، پوترسین و اسید لینولئیک است و سلول‌های CHO را می‌توان در این محیط بدون مکمل سرم رشد داد(9, 10).

محیط Ham’s F-12 در یک ترکیب 50-50 (v/v) با DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) به عنوان محیط پایه عاری از سرم مبنی بر مواد شیمیایی برای کشت سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این محیط پایه با افزودن هورمون‌های اختصاصی سلول، فاکتورهای رشد، انسولین، ترانسفرین، سلنیوم (ITS) و عناصر کمیاب کامل می‌شود (5). به عنوان مثال سلول‌های L929 (رده سلولی فیبروبلاست موش) درمحیط بدون سرم DMEM/F12+ITS کشت و سازگار شدند(11). در دهه های گذشته، تعداد بسیاری از محیط‌های کشت بدون سرم منتشر شده است، اما متاسفانه فرمول‌ ساخت این محیط‌ها محدود به انواع یا رده‌های سلولی خاص است و از طرفی جستجو برای محیط‌های بدون سرم زمان‌بر و خسته کننده است. از این رو، پایگاه‌های داده محیط‌های بدون سرم با قابلیت‌های جستجوی جامع توسعه یافتند. [Fetal Calf Serum free Database](https://fcs-free.org/) و [good cell culture](http://www.goodcellculture.com/) از جمله این پایگاه های داده هستند (5).

زرده تخم مرغ: تخم یک واحد کاملاً خودکفا است که دارای تمام مواد و عوامل لازم برای رشد یک حیوان جدید است. بنابراین، می توان فرض کرد که زرده تخم مرغ حاوی مواد مناسب برای تحریک رشد و تمایز سلول های حیوانی در کشت است. در تحقیقات اولیه، cholecystokinin -CCK / gastrin-like immunoreactivity (IR) در بخش خاصی از زرده تخم مرغ یافت شد. از آنجایی که سطوح CCK-like IR (pro-CCK) در مغز در حال رشد موش‌های جوان بسیار زیاد است، می‌توان حدس زد که عوامل شبه CCK/گاسترین ممکن است بر رشد سلولی تأثیر بگذارد. در مطالعه ای نشان داده شده است که باتوجه به شناسایی مولکول‌های شبه CCK/گاسترین در اسپرماتوزوما پستانداران، زرده تخم مرغ جایگزین مولکول درون‌زا شبه CCK/گاسترین تخریب شده در انجماد اسپرم می شود و بر لقاح آزمایشگاهی تأثیرگذار است (9). در مطالعه ای با به کار گیری سانتریفیوژ افتراقی زده تخم مرغ، نشان داده شد که لیپیدهای قطبی ذخیره شده در کیسه زرده یک جنین در حال رشد می توانند نقش عمده‌ای در رشد سلول های کشت شده و احتمالاً رشد جنین داشته باشند. برای تکثیر فعال سلول‌های اندوتلیال آئورت گاو بالغ (ABAE) و عضلات صاف عروق (VSM) و سلول‌های سلول‌های اندوتلیال قرنیه گاوی (BCE) که روی ظروف با بستر BL نگهداری می‌شوند و در معرض شرایط بدون سرم قرار دارند، لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا یا لیپوزوم‌های ساخته شده از فسفاتیدیل کولین زرده تخم مرغ مورد نیاز است.در مطالعه ای سلول‌های اندوتلیال قرنیه گاوی، اندوتلیال آئورت گاو بالغ و عضلات صاف عروق رشد یافته در محیط تکمیل شده توسط زرده تخم مرغ که روی ظروف پوشش داده شده توسط basement lamina بررسی شدند، و مطابق با نتایج این سلول ها را به صورت سریالی پاساژ داد اما طول عمر آنها کمتر(15نسل) از سلول‌های رشد یافته در محیط حاوی سرم است(8).

مایع داخل چشم گاو: در مطالعات قبلی نشان داده شده است که (BL-basement lamina) تولید شده توسط سلول‌های اندوتلیال قرنیه گاوی (BCE) کشت شده، امکان ایجاد شرایط محیطی عاری از سرم را برای چندین نوع سلول دیپلوئید طبیعی پستانداران فراهم می‌کند. ترکیب بیوشیمیایی BL یا ماتریکس خارج سلولی تولید شده توسط سلول‌های BCE مشابه غشای پایه in vivo است و حاوی کلاژن نوع I، III، IV و V ، فیبرونکتین ، لامینین، هپاران سولفات و پروتئوگلیکان های سولفات درماتان نتایج منتشر نشده و الاستین است. BL یک بر تکثیر سلولی در شرایط آزمایشگاهی موثر است. برای تکثیر فعال سلول‌های اندوتلیال آئورت گاو بالغ (ABAE) و عضلات صاف عروق (VSM) و همچنین برای سلول‌های BCE که روی ظروف پوشش‌دار BL نگهداری می‌شوند و در معرض شرایط بدون سرم قرار دارند، لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا یا لیپوزوم‌های ساخته شده از فسفاتیدیل کولین زرده تخم مرغ مورد نیاز است (8).

لیزات پلاکت انسانی(HPL): در برخی مطالعات برای کشت سلول های بنیادی مزانشیمی، از محیط های حاوی جایگزین های بدون سرم حیوانی با ترکیبی از فاکتورهای رشد استفاده کرده اند. یک جایگزین، مکمل کردن محیط‌ها با لیزات پلاکتی مشتق از خون انسان یا سرم‌های اهداکنندگان اتولوگ یا آلوژنیک است. در مطالعه ای گزارش شده است که محیط‌های حاوی HPL نه تنها فنوتیپ و همچنین ظرفیت تمایز خود را حفظ می کنند، بلکه با افزایش سرعت رشد، زمان کشت را نیز کوتاه می کنند. با این وجود، برخی تفاوت‌ها بین سیتوکین‌های تولید شده وجود دارد، که نشان‌دهنده تفاوت‌های عملکردی بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی گسترش‌یافته در محیط‌های حاوی HPL و FBS است. (11). در مطالعه ای گزارش شده است که جایگزینی FBS با HPL از آلودگی پریون گاوی، ویروسی و zoonose محصول سلول های بنیادی جلوگیری می شود(10).

محیط تعریف شده بر پایه شیمیایی: مزیت این محیط‌ها این است که از نظر شیمیایی تعریف و کنترل می شود، تنوع کمی و کیفی پایینی دارد، محصولات یا متابولیت ها (مصنوعی) ساده‌تر جداسازی‌ می‌شوند. استفاده از حیوانات کاهش می یابد. برای انواع سلول های خاص کاربرد دارند. حداقل 530 فرمولاسیون برای 260 نوع سلول موجود است. تجاری شده‌اند. فرمولاسیون آنها در مقالات موجود است.

سرم انسانی: درمطالعه ای گزارش شده است که سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی رشد یافته در هر دو محیط حاوی FBS و سرم انسانی فنوتیپ یکسانی دارند. همچنین سلول‌های استرومایی مشتق شده از مغز استخوان انسان در محیط حاوی سرم انسانی بهتر از محیط حاوی FBS تکثیر و تمایز می‌یابند و حتی پتانسیل تمایز خود را به سلول‌های غضروفی و استخوانی حفظ می‌کنند( 15و 14). در پژوهش دیگری نشان داده شده است که استفاده از مکمل سرم انسانی می‌تواند رشد، مورفولوژی و عملکرد سلول‌های اندوتلیال انسان، سلول‌های ماهیچه صاف و فیبروبلاست‌ها را به همان اندازه یا حتی بهتر از سرم جنین گاوی حفظ کند(16).

آغوز گاو: (17)

1. van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J, et al. Consensus Report Fetal Bovine Serum (FBS): Past–Present–Future1.

2. Bilgen B, Orsini E, Aaron RK, Ciombor DM. FBS suppresses TGF‐β1‐induced chondrogenesis in synoviocyte pellet cultures while dexamethasone and dynamic stimuli are beneficial. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 2007;1(6):436-42.

3. Van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G, et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. Toxicology in vitro. 2004;18(1):1-12.

4. Rauch C, Feifel E, Amann E-M, Spötl HP, Schennach H, Pfaller W, et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. ALTEX-Alternatives to animal experimentation. 2011;28(4):305-16.

5. Gstraunthaler G, Lindl T, van der Valk J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. Cytotechnology. 2013;65(5):791-3.

6. van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks W, Fu J, et al. Fetal bovine serum (FBS): past–present–future. Altex. 2018;35(1):1-20.

7. گلستانی ر, موذنی س, پورفتح اله عا, حمیدپورزارع ل, شرفی م, عطارچی ز, et al. تهیه مواد جایگزین سرم جنین گاو و بررسی اثر آن ها بر رشد دودمان های سلولی هیبریدومایی و میزان ترشح آنتی بادی های منوکلونال. پژوهشي خون. 1385;3(3):-.

8. Balk SD, Levine SP, Young LL, LaFleur MM, Raymond NM. Mitogenic factors present in serum but not in plasma. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1981;78(9):5656-60.

9. Volz A, Piper HM, Siegmund B, Schwartz P. Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in serum-free primary culture. Journal of molecular and cellular cardiology. 1991;23(2):161-73.

10. Yao T, Asayama Y. Animal‐cell culture media: History, characteristics, and current issues. Reproductive medicine and biology. 2017;16(2):99-117.

11. Van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Svenningsen ÅF, Honegger P, Knudsen LE, et al. Optimization of chemically defined cell culture media–replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. Toxicology in vitro. 2010;24(4):1053-63.