Archive of SID

مجله علوم دانشگاه تهران
جلد سی‌ام (۱۳۸۳) شماره ۳ (۴۸۰-۴۷۱)

مقایسه اثرات هورمون rhGM-CSF ایرانی و تجاری بر روی تکثیر سلولهای دودمان HL-60 و U937

هانیه جعفری[۱]، بهروزشاهسون بهبودی*[۱]، عبدالخالق دیزجی[۲]، باقر یخچالی[۲]
۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علوم دانشگاه تهران
۲ مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی
(دریافت: ۸۲/۳/۲۱ ؛ پذیرش:۸۳/۳/۸)

چکیده

فاکتورهای رشد خونساز نقش مهمی در تکثیر سلولهای خونساز و تمایز سلولهای اجدادی خونساز دارند. GM-CSF نوترکیب انسانی در درمان نوتروپنیا (Neutropenia) که بعد از شیمی درمانی بیماران سرطانی پدید می‌آید مورد استفاده قرار می‌گیرد. نوع نوترکیب hGM-CSF که از طریق مهندسی ژنتیک در باکتری اشریشیاکلی (*E. coli*) تهیه می‌شود و در درمان نوتروپنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق از کشت دودمانهای سلولی HL-60 و U-937 جهت بررسی اثر rhGM-CSF ایرانی گه به نام (NRCGEB) تهیه شده و rhGM-CSF محصول شرکت Sandoz استفاده شده است. برای ارزیابی میزان فعالیت بیولوژیکی rhGM-CSF درمیزان تکثیر سلولی در سلولهای HL-60 از سه روش MTT assay، NBT assay و Brdu assay استفاده شد و در مورد سلولهای U-937 تنها از MTT assay استفاده گردید. سلولهای فوق در غلظتهای مختلف ۰ تا ٤۰۰۰۰۰ pg/ml کشت داده شدند. غلظت ٤۰ تا ٤۰۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر هورمون خونساز فوق بر روی کلیه سلولها سبب حداکثر تکثیر سلولی و کلنی زایی گردید در حالیکه از غلظت ٤۰۰ تا ٤۰۰،۰۰۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر تقسیم سلولی و کلنی زایی بتدریج کاهش یافت. این نتیجه برای GM-CSF نوترکیب آزمایشگاهی و نوترکیب تجاری یکسان بوده است، با این وجود rhGM-CSF نوع تجاری اثر بیشتری در دو غلظت اول بر روی تقسیم سلولهای HL-60 داشته است. rhGM-CSF می‌تواند مدت زمان تقسیم سلولی را کوتاه کند. سلولهای U-937 در تست MTT در تمامی غلظتهای Sandoz تکثیرشان بیش از نوع NRCGEB بود، درحالیکه سلولهای HL-60 تنها در سه غلظت ۰ و ٤۰۰۰ و ٤۰۰۰۰ و ٤۰۰۰۰۰ pg/ml نوع Sandoz تکثیرشان بیشتر بوده است. نتایج حاصل از تست MTT سلولهای HL-60 تا حدودی با تست NBT و تست Brdu متفاوت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *U937، HL-60، rhGM-CSF، تکثیر سلولی، کلنی زایی.*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه پروتئینهای نوترکیب انسانی جایگاه خاصی در درمان بعضی از بیماریها دارند و به همین دلیل محققین از روشهای بیوتکنولوژی مانند بیان ژن مربوطه در باکتریها و یا مخمرها برای تولید این پروتئینها استفاده می‌کنند. اما ساختمان این پروتئینها درطی استخراج و تخلیص و به علت خصوصیات سیستم بیان ژنتیکی درکلونینگ و همچنین استفاده از مواد شیمیایی، نمکها و دترجنتها درطی مراحل تولید دستخوش تغییرات متعددی می‌گردد (Higgins, 1999). لذا جهت مصرف دارویی لازم است خصوصیات این پروتئینها قبل از استفاده مطالعه شود.

در این تحقیق بدنبال بررسی فعالیت پروتئین نوترکیب GM-CSF نوترکیب انسانی می باشیم که در ایران تهیه شده و به نام (National Research Center for (Genetic NRCGEB Engineering and Biotechnology خوانده می‌شود. فاکتور رشد خونساز GM-CSF باعث تحریک تکثیر (Proliferation) و بلوغ (Maturation) و تمایز(Differentiation) سلولهای اجدادی (Precursor Cell) میلوئید (Myeloid) به نوتروفیل و مونوسیت و ائوزینوفیل می‌شود (Balkwill, 1989). تولید سلولهای بالغ خونی از سلولهای پیش ساز آنها و فعالیت این سلولها مرهون وجود همین فاکتورهای رشد خونساز است. GM-CSF میلوبلاستها و مونوبلاستها را تحریک و وادار به تمایز می‌کند.GM-CSF انسانی روی ماکروفاژها و گرانولوسیتهای پریماتهای غیرانسانی نیز اثر می‌گذارد. GM-CSF اولین بار از ریه موش توسط Burgess در سال 1977 تخلیص شد (Balkwill, 1989).

GM-CSF یک سایتوکاین گلیکوپروتئینی است که مکان ژن آن در انسان 5q23-31 می باشد. ژن GM-CSF انسانی تقریباً 2.5 Kb است که دارای۴ اگزون است. این ژن یک پروتئین ۱۴۴ اسیدآمینه‌ای را کد می‌کند که دارای 17 اسیدآمینه راهنما است. دو باند دی‌سولفید دراین پروتئین وجود دارد که برای فعالیت بیولوژیکی این پروتئین لازم و ضروری است، درحالیکه کربوهیدرات متصل به پروتئین برای فعالیتش لازم نیست. وزن مولکولی GM-CSF برحسب درجه‌های مختلف گلیکوزیلاسیون بین kDa 35-14 متغیر است (Balkwill, 1989; Monroy *et al.,* 1990; Dexter, 1990).

سنتز GM-CSF توسط انواع مختلفی از سلولها مانند سلولهای اندوتلیال و سلولهای فیبروبلاست و سلولهای استروما بعد از تحریک توسط TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) ، TNF-β ، IL-1 (Interleukin) ، IFN (Interferon) صورت می‌گیرد (Dexter, 1990). استخراج فاکتور GM-CSF طبیعی طاقت فرسا و از لحاظ هزینه مقرون به صرف نیست. این فاکتور در درمان دارویی کاربردهای زیادی دارد به همین دلیل از روشهای بیوتکنولوژی برای تولید

www.SID.ir

Archive of SID

GM-CSF نوترکیب انسانی استفاده می‌کنند. با این وجود به راحتی و سرعت نمی‌توان از rhGM-CSF کلون شده برای درمان استفاده کرد.GM-CSF بعنوان فاکتور رشد قوی هم در invitro و هم درinvivo عمل می‌کند. این فاکتور در درمان لوسمی‌ها (Leukemia) و در ازدیاد توانایی دفاعی سلولهای میزبان و بیگانه خواری و تخریب بعضی از میکروارگانیسمها و تومورها نقش دارد (Pistia, 1991; Glaspy & Gold, 1990).

GM-CSF یک جاذب شیمیایی قوی برای نوتروفیلها است که فعالیت ضدمیکروبی، فعالیت فاگوسیتیک نوتروفیلها و ماکروفاژها را زیاد می‌کند (Cannistra *et al.,* 1987). می‌توان گفت که یکی از کاربردهای مهم rhGM-CSF در درمان عفونتهای بعد از شیمی درمانی است. هدف این تحقیق بر روی مقایسه میزان فعالیت بیولوژیکی هورمونهای فوق (نوع ایرانی و تجاری خارجی) بر روی دو دودمان سلولی می‌باشد.

مواد و روشها

۱- *کشت نیمه جامد (Semi Solid Culture) سلولهای HL-60 و U-937*

به منظورمقایسه فعالیت بیولوژیکی rhGM-CSF نوع Sandoz و نوع NRCGEB برروی کلنی زایی سلولهای HL-60 و U-937 (از سلولهای موجود در آزمایشگاه مرکز تحقیقات استفاده شد) از روش کشت نیمه جامد سلولها در محیط آگار استفاده شد. لازم به توضیح است که نوع Sandoz نمونه تجاری rhGM-CSF ای است که در درمان نارساییهای خونی در ایران بکارمی-رود. سلولهای HL-60 و U-937 در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ [۱] FCS (Fetal Calf Serum) ، داخل انکوباتور در دمای ۳۷ ºC ، غلظت CO_2 ۵٪ و رطوبت ۹۰٪ کشت داده شدند. این سلولها در هر هفته ۲ بار با محیط جدید پاساژ داده شدند و در هر بار پاساژ از سلولها تعیین درصد سلولهای زنده (Viability) شد. در این روش رنگ تریپان بلو (Trypan Blue) توسط سلولهایی‌که غشاء آنها آسیب دیده و نفوذپذیر شده و در نهایت مرده اند جذب می‌گردد. برای شمارش، سلولها با استفاده از رنگ متیل‌گرین (Methylen Green) رنگ آمیزی شده و سپس با لام هموسیتومتر نئوبار شمارش شدند.

هنگامیکه Viability سلولی به ۹۵٪ رسید سلولها آماده برای کشت نیمه جامد آگار می‌شوند. تعداد سلولها با استفاده از روش رنگ آمیزی بالا در میلی‌لیتر تعیین شدند، سپس به هریک از حفره‌های پلیت ۲۴ تایی، غلظتهای ۴۰، ۴۰۰، ۴۰۰۰، ۴۰۰۰۰، ۴۰۰۰۰۰ pg/ml از هردو نوع فاکتور رشد خونساز به صورت دو تایی اضافه گردید و ۴ حفره برای کنترل نگه داشته

www.SID.ir

Archive of SID

شد، محیطی نیز شامل محیط کشت DMEM(2x) به نسبت ۵۰٪ ، FCS ۲۰٪ و آگار با غلظت نهایی ۰/۳ ٪ با درجه حرارت ºC ۳۷ ساخته شده و به ازاء هر میلی‌لیتر از این محیط، ۱۰۰۰ سلول از محیط سوسپانسیون به آن اضافه و پس از افزودن مقدار مناسب این محیط به حفره‌های حاوی rhGM-CSF با چرخش منظم، محتوی حفره‌ها مخلوط گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۳-۱۲روز در انکوباتور در حرارت ºC ۳۷ و رطوبت ۹۰٪ قرار گرفتند تا بدین ترتیب فرصت لازم برای تشکیل کلنی به سلولها داده شود.

برای رنگ‌آمیزی کلنی‌های بدست آمده به روش زیر عمل شد. ml ۰/۵ . متانول در هر یک از حفره‌ها ریخته و بعد از ۱۰ دقیقه متانول را با کمک سمپلر از حفرات خارج کرده صبر کرده تا حفرات خشک گردید. ml ۰/۵ . رنگ گیمسا ۱:۱۰ رقیق شده با آب مقطر را صاف و سپس به هر یک از حفرات اضافه گردید، ۲۵ دقیقه صبر کرده وسپس رنگ را خارج کرده و هر حفره با آب مقطر چندین بار شستشو داده شد تا رنگ زمینه محو شود.

۲- *ارزیابی تکثیر سلولی*

۲-۱ *تست NBT (Nitro Blue Tetrazolium)*

سلولهای HL-60 با غلظت 2×10^5 در میلی‌لیتر در پلیتهای ۲۴ حفره درمحیط DMEM حاوی 10% FCS در غلظتهای مختلف دو نوع فاکتور رشد خونساز کشت داده شدند. بعد از ۹۶ ساعت انکوباسیون، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه با rpm ۱۵۰۰ سانتریفوژ شد. سپس به هر حفره، ۵۰۰ میکرولیتر PBS اضافه و دوباره عمل سانتریفوژ انجام شد. محیط رویی را دور ریخته و رسوب در ۲۰۰ میکرولیتر محیط FCS (1X) ۲۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. محلول تهیه شده NBT نیز قبلا در بن ماری ºC ۳۷ می‌باید گرم شود. ۲۰۰ میکرولیتر NBT به حفره‌ها اضافه و به مدت۳۰ دقیقه انکوبه شد. پلیت به مدت ۵ دقیقه در یخ گذاشته شد و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ شده و سوپ رویی دور ریخته شد و سلولها با ۵۰۰ میکرولیتر PBS شستشو و سانتریفوژ شد. محیط رویی دور ریخته شد و روی رسوب متانل ۷۰٪ ریخته و ۵ دقیقه سلولها سانتریفوژ شدند تا سلولها ثابت شوند.

دوباره محیط رویی دور ریخته شد و روی سلولها ۲۰۰ میکرولیتر ، KOH ، ۲ مولار ریخته شد. در آخر کار به هر حفره ، ۲۵ میکرولیتر DMSO اضافه و جذب در nm ۶۲۰ خوانده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

۲-۲ *تست MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)*

نمکهای تترازولیوم مانند WST-1 و XTT و MTT را می توان برای ارزیابی تکثیر سلولهای زنده بکار برد. این رنگها فقط در سلولهای زنده به فرم رنگ فورمازان شکسته می شوند.

روش سنجش تکثیر سلولی مطابق بروشور کیتMTT (Cell Proliferation Kit I Cat. No. 1 Rosh , 465 007) صورت گرفت. در این روش از ماده رادیواکتیو استفاده نمی شود و مراحل شستشو نیاز ندارد. در این روش حتی مقادیر کم تکثیر سلولی قابل اندازه گیری است.

در ابتدا سلولهای HL-60 و U-937 را با تراکم سلولی ۲×۱۰^{۵} در محیط DMEM حاوی FCS ۱۰٪ با غلظتهای مختلف (۰- ۴۰۰۰۰۰pg/ml) rhGM-CSF نوع Sandoz و NRCGEB و Roch در پلیت‌های ۹۶ حفره با غلظت نهایی ۱۰۰ میکرولیتر در انکوباتور ۳۷ºC و رطوبت ۹۵٪ به مدت ۹۶ ساعت کشت داده شدند.

بعد از تمام شدن زمان انکوباسیون ۱۰ میکرولیتر از رنگ MTT با غلظت نهایی ۰/۵ mg/ml به حفره‌ها اضافه شد و برای ۴ ساعت در انکوباتور دردمای ۳۷ ºC و رطوبت ۹۰ ٪ انکوبه شد. بعد از انکوباسیون ۱۰۰ میکرولیتر ازمحلول حلال‌که حاویSDS ۱۰٪ در ۰/۰۱ مولار HCl است به حفره‌ها اضافه گردید. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ ºC انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت جذب نمونه‌ها در ۵۴۰nm با دستگاه ELISA reader مدل Labsystems MultisKan MS خوانده شد.

۲-۳ *تست Brdu*

این روش یک روش مفید و موثر برای سنجش مقادیر زیاد سلولها می‌باشد. در این روش تکثیر سلولی براساس میزان سنتز DNA اندازه گرفته می‌شود.

ازBrdu (5-bromo-2'-deoxyuridine) به عنوان جانشینی برای پیریمیدین استفاده می‌کنند. بعد از آنکه Brdu وارد DNA شد توسط روشهای Immunoassay قابل شناسایی و پیگیری است. دراین روش میزان تکثیر سلولی که توسط فاکتورهای رشد، سایتوکاینها اثرات محرک و یا بازدارنده محیط ایجاد شده است قابل اندازه‌گیری باشد. می‌توان در اندازه‌گیری حساسیت یک تومور به داروهای مختلف شیمیایی از این روش نیز استفاده نمود. این روش با استفاده از کیت الایزا (Cell Proliferation ELISA Colorimetric با Cat. No. 1 647 226) انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

۲-۳-۱ *روش کار*

سلولهای HL-60 با غلظت ۲×۱۰^{۵} در میلی لیتر در پلیت ۹۶ حفره درمحیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FCS در غلظتهای مختلف دو نوع فاکتور رشد خونساز ایرانی و تجاری درحجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر کشت داده شدند.

بعد از ۹۶ ساعت انکوباسیون از محلول ۱ ، که حاوی Brdu ، ۱:۱۰۰ رقیق شده است ۲۰ میکرولیتر به هر یک از حفره‌ها اضافه شد. پلیت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. بعداز انکوباسیون پلیت به مدت ۱۰ دقیقه درrpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. محیط رویی به آرامی برداشته شد بطوریکه سلولها کنده نشوند. سپس سلولها در دمای ۶۰°C به مدت یک ساعت قرار گرفتند.

۲۰۰ میکرولیتر از بطری ۲ به هر یک از حفره ها اضافه کرده و مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت°C ۲۵– ۱۵ انکوبه گردید. بعد از انکوباسیون مایع رویی را برداشته و سه بار حفرات با محلول شستشو داده شد. سپس از محلول سوبسترا ۱۰۰ میکرولیتر به حفرات اضافه شده و بعد از ۱۵ دقیقه جذب در nm ۳۴۰ خوانده شد.

برای متوقف کردن عمل آنزیم و سوبسترا میتوان از ۱۰ میکرولیتر از H2SO4 ، ۱ مولار به هریک از حفرات اضافه کرد، رنگ آبی که از قبل تولید شده بود با اضافه شدن اسید تبدیل به رنگ زرد می‌شود. می توان جذب را در این مرحله در ۴۵۰nm خواند.

۳- *روشهای آماری*

کلیه ازمایشات سه بار تکرار گردید و از آنها میانگین گرفته شد سپس نتایج با استفاده از برنامه Excel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. P Value آزمایشات ۰/۰۵ درصد گرفته شد.

نتایج

یکی از معیارهای سنجش رشد سلولهای HL-60 و U-937 استفاده از توانایی کلنی‌زایی این سلولها درمحیط نیمه جامد آگار است. بعد از کشت سوسپانسیون، می‌توان این سلولها را در محیط نیمه جامد آگار با سری غلظتهای متفاوت rhGM-CSF به مدت ۱۲ روزکشت داد. نتایج اثر غلظتهای مختلف rhGM-CSF بر روی تعداد کلنی ها در دو نمودار الف و ب آمده است.

۳-۱ *اثر GM-CSF نوترکیب بر روی کلنی زایی دودمانهای سلولی*

در بررسی اثر فاکتوررشد خونساز rhGM-CSF در میزان کلنی زایی و تکثیر سلولهای HL-60 و U-937 در غلظتهای متفاوت ۰ ، ۴۰ ، ۴۰۰ ، ۴۰۰۰ ، ۴۰۰۰۰ ، ۴۰۰۰۰۰ pg/ml نتایج زیر

www.SID.ir

Archive of SID

حاصل گردید. درمقایسه تعداد کلنی‌های تشکیل شده HL-60 و U-937 در غلظتهای مختلف rhGM-CSF نوع NRCGEB سبب تشکیل تعداد بیشتری از کلنی های HL-60 در غلظتهای بالاتر از 40000 pg/ml نسبت به U-937 می‌گردد. به ترتیب در دو غلظت آخر در سلولهای HL-60 شاهد ۱/۲۹٪ و ۰/۶۷٪ افزایش در تعداد کلنی هستیم درحالیکه در سلولهای U-937 در همین دو غلظت به ترتیب شاهد ۰/۹۴٪ و ۰/۵۷٪ افزایش در تعداد کلنی می‌باشیم. تعداد کلنی‌های تشکیل شده در نوع Sandoz ، در ۳ غلظت آخر بیشتر از تعداد کلنی های U-937 است. در سلولهای HL-60 ، 1.08% و ۱/۰۵٪ به ترتیب در دو غلظت آخر افزایش تعداد کلنی وجود دارد در حالیکه در سلولهای U-937 ، 0.94% و 0.58% به ترتیب افزایش تعداد کلنی وجود دارد. کلنی‌های HL-60 بسیار متراکم و فشرده می‌باشند در حالیکه سلولها در کلنی‌های U-937 بسیار پراکنده هستند.

در هفته اول rhGM-CSF سبب تقسیم سریع سلولهای HL-60 و U-937 می‌شود بطوریکه سلولها از نظر مورفولوژی چندان تفاوتی با یکدیگر نمی‌کنند، ولی از هفته دوم به بعد سلولها از نظر مورفولوژی با یکدیگر تفاوت پیدا کرده و متمایزتر می‌شوند.

۳-۲/*اثر GM-CSF نوترکیب بر میزان تکثیر دودمانهای سلولی*

به دلیل محدودیت تنها سلولهای HL-60 در دو تست NBT assay و Brdu assay مورد استفاده قرار گرفتند. در تست NBT (نمودار د) جذب سلولها در ۶۲۰nm خوانده شد، در این طول موج در سه غلظت ۴۰ ، ۴۰۰ و ۴۰۰۰۰۰ pg/ml ، rhGM-CSF نوع تجاری یعنی Sandoz اثر بیشتری در تکثیر سلولی داشته است. در غلظت ۴۰ pg/ml ، نوع Sandoz ۱/۳۵٪ در نوع NRCGEB در همین غلظت ۱/۱۳۰٪ ، در غلظت۴۰۰ pg/ml نوع Sandoz ، ۱/۳۸٪ و در نوع NRCGEB در همین غلظت ۱/۲۱٪ در غلظت۴۰۰۰۰۰ pg/ml نیز در نوع Sandoz ۰/۶۸٪ و در نوع NRCGEB ۰/۵۲٪ افزایش در جذبداشته است. در تست Brdu assay (نمودار ج) نیز جذب سلولها در ۳۴۰nm خوانده شد. در این طول موج نیز درغلظتهای ۴۰ ، ۴۰۰ ، ۴۰۰۰ pg/ml ، rhGM-CSF محصول ایرانی یعنی NRCGEB اثر بیشتری نسبت به Sandoz در تکثیر سلولهای HL-60 داشته است. به ترتیب از غلظت کمتر به بیشتر در نوع NRCGEB ، ۱/۱۱٪ ، ۱/۱۹٪ ، ۱/۰۵٪ و در نوع Sandoz ، ۱/۲۰٪ ، ۱/۳۳٪ ، ۱/۰۳٪ افزایش جذب داشته است.

www.SID.ir

Archive of SID

تست MTT (نمودار ه، و) در مورد هر دونوع سلول HL-60 و U-937 صورت گرفت. دراین تست جذب سلولها در ۵۴۰nm خوانده شد، سلولهایU-937 به جز غلظت pg/ml ۰ دربقیه غلطتهای rhGM-CSF نوع Sandoz افزایش تکثیر سلولی را نشان دادند که این افزایش به مراتب بیشتر از اثر نوع NRCGEB بود و سلولهای HL-60 در سه غلظت آخر نوع Sandoz به ترتیب ۲/۴۰٪ ، ۲/۲۸٪ ، ۲/۰۴٪ افزایش جذب نسبت به نمونه کنترل و در نوع NRCGEB به ترتیب در سه غلظت فوق از کم به زیاد ۲/۴۱٪ ، ۲/۲۶٪ ، ۲/۰۲٪ افزایش نسبت به نمونه کنترل داشته است.

در سه روش گفته شده تنها سلولها از نظر کمیت مورد بررسی قرار گرفتند. اما در روش کشت نیمه جامد آگار علاوه بر اینکه سلولها از نظر توانایی تولید کلنی بررسی شدند از نظر مورفولوژیکی نیز مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر یک از تستهای انجام شده P Value محاسبه شده از ۰/۰۵ بیشتر بود که این نشان دهنده عدم اختلاف اثر بین دو نوع rhGM-CSF است.

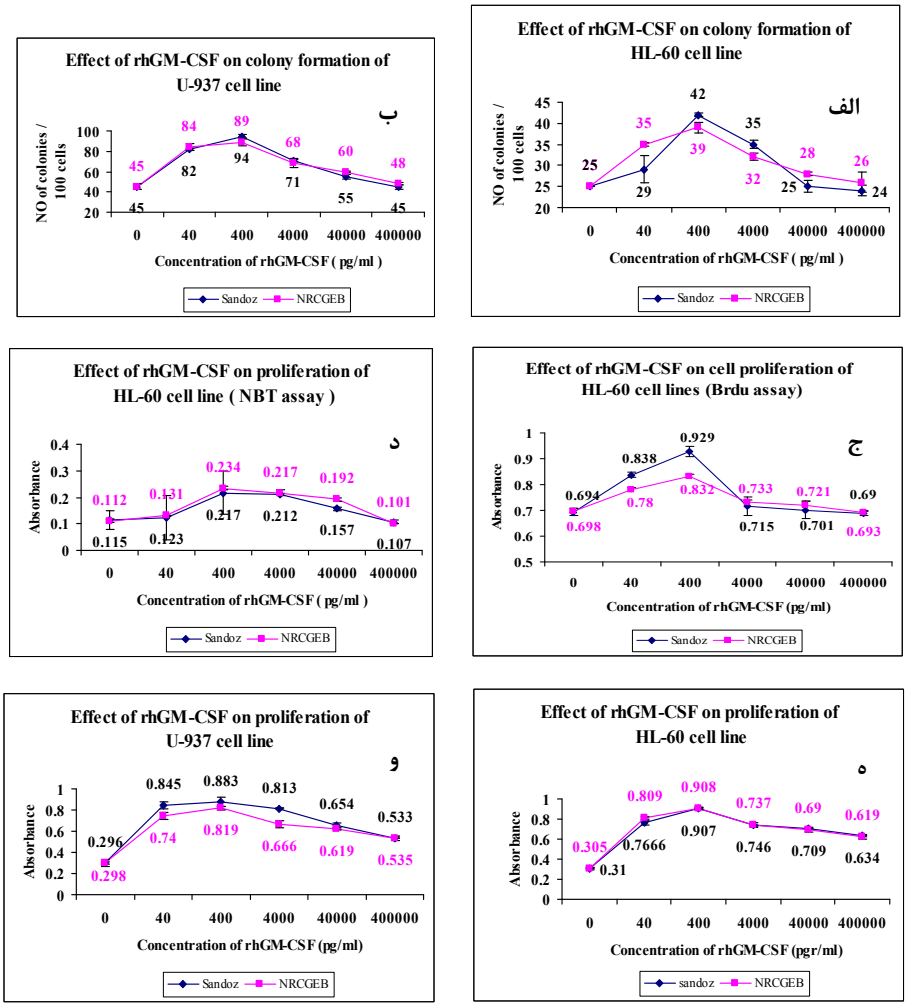
بحث

استفاده از سل لاینهای HL-60 و U-937 به عنوان مدلی مفید برای بررسی تکثیر و تمایز سلولهای لوکمیای میلوئید (Myeloid leukemia cell) در آزمایشگاه ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. عوامل مختلفی می‌تواند سبب تمایز این سلولها به سمت سلولهای گرانولوسیتیک (Granulocytic) و یا مونوسیتیک (Monocytic) گردد. بطور مثال رتینوئیک اسید سبب تمایز سلولهای HL-60 به سمت سلولهای گرانولوسیتی می‌گردد و ویتامین D3 باعث تمایز این سلولها به سمت سلولهای ماکروفاژی می‌شود.

rhGM-CSF نیز مانند ترکیبات فوق می‌تواند روی مسیر تمایزی دودمانهای سلولی نظیر HL-60 و U-937 اثر گذارد ، غلظتهای متفاوت rhGM-CSF منجر به تغییراتی در بیان پروتوانکوژنهای(Proto-oncogen) myc و c-fos می‌گردد بطوریکه می‌توانند سبب تغییر سیکل سلولی شوند. بیان ژن c-myc می‌تواند سبب وارد شدن سلول به مرحله تقسیم شود در حالیکه بیان ژن c-fos سبب تمایز سلولها می‌گردد(Gasson, 1991). در مراحل تمایزی سلولهای HL-60 میزان بیان انکوژن c-myc به شدت کاهش پیدا می‌کند. شاید یکی از مهمترین دلیلی که سل لاینها تقریبا بطور نامحدودی تکثیر پیدا می‌کنند بیان ۳۰ بار بیشتر همین ژن نسبت به سلولهای عادی و طبیعی است. بیان هریک از این ژنها تحت کنترل راههای پیچیده‌ای می‌باشد که هر یک زمانی وارد عمل می‌شوند که GM-CSF به رسپتور خود که شامل دو زیرواحد α و β است متصل شده و مسیر انتقال پیام JAK2/STAT5 به راه بیفتد (Degos & Linch, 1999).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودارهای الف- و: مقایسه تغییرات تعداد کلنی‌های دودمانهای سلولی HL-60 و U-937 در غلظتهای مختلف rhGM-CSF دو نوع Sandoz و NRCGEB با استفاده از تکنیک کشت نیمه جامد آگـار و نیز تغییرات میزان تکثیر سلولی این دو نوع سلول درهمین غلظتها با استفاده از سـه تکنیـک NBT ، MTT ، Brdu در نمودارهای فوق آمده است. (الف)- مقایسه تغییرات تعداد کلنی سلولهای HL-60 در دو نوع rhGM-CSF . (ب)- مقایسه تغییرات تعداد کلنی سـلولهای U-937 در دو نـوع rhGM-CSF . (ج)- میزان تغییرات تعداد سلولهای HL-60 با تکنیک Brdu assay . (د)- تغییـرات میـزان تکثیر سلولهای HL-60 با تکنیک NBT assay . (ه)- سنجش تغییرات تکثیر سـلولهای HL-60 بـا تکنیک MTT assay . (و)- سنجش تغیرات تکثیر سلولهای U-937 با تکنیک MTT assay.

www.SID.ir

Archive of SID

GM-CSF سبب بیان عملکردهایی شبیه مونوسیتها مثل کشندگی وابسته به آنتی‌بادی در سلولهای U-937 می‌گردد. GM-CSF نوترکیب سبب بیان ژن TNF می‌شود و این سلولها شروع به ترشح TNF می‌کنند. اما این ترکیب درمحیط نیمه جامد آگار تاثیر چندانی بر روی تکثیر سلولها ندارد. در غلظتهای بالاتر از 400 pg/ml در کشت نیمه جامد آگار ترکیبات بازدارنده دیگری از سلولهای HL-60 و U-937 ترشح می‌شوند که مانع از تولید کلنی می‌شوند.

براساس این گفته‌ها می‌توان گفت که GM-CSF یک نقش مرکزی در پاسخ سیستم ایمنی دارد، GM-CSF فاکتوری است که از سلولهای T ترشح شده و با اثر گذاشتن بر روی مونوسیتها سبب آزادسازی TNF از این سلولها می‌شود. TNF در واقع یک فاکتور بازدارنده برای رشد سلولهای پیش ساز میلوئیدی است به خصوص درحضور IFN-gamma که این فعالیت را از خود بیشتر نشان می‌دهد(Cotter, 1994).

References

Higgins, S.J., and Hames, B.D. (1999) *Protein expression*, Oxford University press, London. pp. 20-45.

Balkwill, F.R. (1989) *Cytokines in cancer therapy*, Oxford University press, London. pp.116-146.

Gasson, J.C. (1991) *Molecular physiology of GM-CSF*, Blood, **77**(6), 1131-1145.

Monroy, R.L., Davis, T.A., Macyittie, T.J. (1990) *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor more than a haemopoetin,* Clin. Imunol. Imunopathol, **54**, 333-349.

Dexter T.M. (1990) Colony-Stimulating Factors: *Molecular and Cellular Biology*, Marcel Dekker. New Yourk, pp.111-131.

Pistia, V. (1991) *Choronic childhood neutropenia, studies on the invitro clonogenicity of bone marrow myeloid progenitors*. Acta Haemetol, **86**, 21-35.

Glaspy, J.A., Gold, D.W. (1990) *Clinical trials of myeloid growth factors*, Exp, Hematology, **18**, 100-109.

Cannistra S.A., Ramaldi A., Spriggs D. (1987) *Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor induces expression of the tumor necrosis factor gene by the U-937 cell line and by normal human monocytes*, The journal of American society for clinical investigation,**79**, 1720-1728.

Degous, L., Linch P. (1999) *Text book of malignant haematology*, Martin Dunitiz, London. pp.111-126.

Cotter, T.G. (1994) *Cell death in the myeloid lineage*. Immunological reviews, **142**, 93-111.

www.SID.ir