اثر هم‌افزایی سیکلوسپورین A به همراه فاکتورهای رشد خونساز بر روی تکثیر سلولهای مغز استخوان انسان در کشت طولانی مدت مغزاستخوان و کشت کلونال در محیط نیمه‌جامد آگار

مینو سیاری.M.Sc[☆]، علی اکبر پورفتح‌الله .Ph.D[☆♦]، کامران علی مقدم .M.D[☆]، مسعود سلیمانی .M.Sc[☆]

☆سازمان انتقال خون ایران

✯ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون

☆دانشگاه تهران، بیمارستان شریعتی، مرکز تحقیقات پیوند مغز استخوان

♦آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی:۱۷۵-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی

پست الکترونیک: pourf@modares.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۴/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۳/۵/۶

✯ هدف: بررسی اثرتحریک خونسازی یا عدم تحریک خونسازی سیکلوسپورین A همراه با فاکتورهای رشد خونسازی IL-3,IL-6,SCF برروی فاکتورهای رشد خونساز مغزاستخوان انسان و ابعاد یک محیط کشت مناسب جهت نگهداری و تکثیر سلولهای خونساز مغز استخوان

✯ مواد و روشها: جمعیت مورد مطالعه را به طور تصادفی از داوطلبان سالم دهنده مغز استخوان در گروه سنی ۳۳-۵ سال درمرکز تحقیقات پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی انتخاب گردید ،کشت طولانی مدت مغزاستخوان در محیط IMDM (Iscovs Modified Dulbiccos Medium) به مدت ۴ هفته و کشت کلونال سلولهای مغزاستخوان در محیط نیمه‌جامد آگار به مدت ۱۴ روز صورت گرفت ، سپس شمارش سلولی توسط میکروسکوپ معمولی و شمارش کلنی سلولهای خونساز توسط میکروسکوپ معکوس (Invert) انجام شد و جهت مشاهده مورفولوژی سلولهای خونساز توسط سایتواسپین لام تهیه و رنگ‌آمیزی گردید .

✯ یافته ها: در این مطالعه افزایش سلولهای تشکیل‌دهنده کلنی خونساز در محیط کشت حاوی سیکلوسپورین A (CyA)، اینترلوکین ۳ (IL-3)، اینترلوکین۶ (IL-6) و استم سل فاکتور (SCF) در مقایسه با محیط کشت بدون فاکتور رشد و CyA ، محیط کشت حاوی CyA و محیط کشت حاوی IL-3,IL-6,SCF مشاهده شد. باتوجه به نتایج بدست آمده افزایش سلولهای غیرچسبان در محیط حاوی IL-3, IL-6,SCF,CyA با میانگین (۱۰۱/۱۵) نسبت به محیط حاوی IL-3,IL-6,SCF با میانگین(۸۲/۸) و محیط حاوی CyA با میانگین (۷۱/۴۵) است. در محیط کشت کلونال افزایش تعداد سلولهای تشکیل‌دهنده کلنی مربوط به اثر تحریک کنندگی فاکتورهای رشد خونساز و سیکلوسپورین A با میانگین(۵۶) نسبت به محیط کشت حاوی فاکتور رشد IL-3, IL-6, SCF با میانگین (۳۲/۶۵) و محیط کشت حاوی CyA با میانگین (۴۵/۰۵) مشاهده شد. همچنین افزایش کلنی خونساز در محیط PHA-Inactive با میانگین(۳۱/۳۷) نسبت به محیط PHA-Active با میانگین(۲۵) نشان دهندهٔ کاهش فعالیت فاکتورهای ممانعت کننده رشد در محیط PHA-Inactive است. در این مطالعه برای بررسی اثر تحریک کنندگی CyA و فاکتورهای رشد خونساز بر روی سلولهای خونساز مغزاستخوان در کشت LTBMC و افزایش کلنی سلولهای خونساز از طریق آزمون مستقل Student - t - test با (P< ۰/۰۵) به عنوان سطح معنی‌داری استفاده شد.

✯ نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست‌آمده لازم است تحقیقات گسترده‌ای در مورد اثرسیکلوسپورین A و فاکتورهای رشد خونساز بر روی مسیر های نسخه‌برداری و ارسال پیام جهت حیات و تکثیر سلولهای خونساز صورت بگیرد.

گل واژگان: فاکتورهای رشد ،کشت طولانی مدت مغز استخوان ، سیکلوسپورین A

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، تابستان ۸۳، شمارهٔ ۲۲، صفحات ۱۰۲-۹۷

مقدمه

سلولهای خونساز اولیه در حالت استراحت (خاموش) دارای قدرت تولید تعداد زیادی سلولهای خونی هستند. خاصیت خودسازی ، تکثیر و تمایز سلولهای خونساز مادر اولیه (Stem cell) در ریزمحیط مغزاستخوان(Microenvironment)ایجاد می‌شود. استفاده از کشت طولانی‌مدت مغزاستخوان مدل مناسبی برای مشخص نمودن نقش ریزمحیط مغزاستخوان است و سبب تشکیل‌لایه تغذیه‌کننده برای حفظ حیات و تکثیرسلولهای خونساز وترشح سایتوکاینها می‌گردد(۱). سیکلوسپورین A پلی پپتید محصول قارچ هوازی توليپوکلادیم اینفلاتوم است و به صورت یک پپتید حلقوی با یازده اسید امینه محلول در چربی تهیه می‌شود (۲) . امروزه علاوه بر این که سیکلوسپورین A به عنوان یک داروی ایمونوسوپرسیو بطور گسترده در پیوند بافت استفاده می‌شود، درانکوباسیون با بافت مغزاستخوان در شرایط خارج بدن (In vitro) سبب تحریک رشد سلولهای خونساز

Archive of SID

www.SID.ir

پس از تزریق در محیط داخل بدن (*In vivo*) می‌گردد. همچنین اثر وابسته به دوز CyA درافزایش تحریک تشکیل کلنی سلولهای خونساز موش در محیط نیمه‌جامد متیل‌سلولز مورد مطالعه قرارگرفت و به نظر می‌رسد سیکلوسپورین A عامل مهار ژن اینترفرون گاما (γ-IFN) در لنفوسیت T است که اینترفرون گاما (γ-IFN) سبب مهار خونسازی می‌گردد و این نظریه با استفاده از آنتی‌بادی ضد اینترفرون گاما و تحریک خونسازی در محیط داخل بدن (*In vivo*) و تشکیل کلنی خونساز در محیط خارج بدن (*In vitro*) اثبات شده است(۳، ۴). در این مطالعه محیط کشت مناسب جهت نگهداری و رشد سلولهای خونساز مغزاستخوان انسان فراهم شد تا به کمک آن بتوان اثر فاکتورهای رشد خونساز و داروی سیکلوسپورین A برروی سلولهای خونساز بررسی شود و جهت ارزیابی رشد سلولهای خونساز وتشکیل کلنی خونساز از محیط نیمه جامد آگار استفاده شد. همچنین برای تحریک سلولهای خونساز در محیط نیمه جامد آگار از محیط مغذی از فاکتورهای رشد که در محیط PHA-LCM ساخته شد، استفاده گردید . با توجه به نتایج تاثیر سیکلوسپورین A برروی کشت طولانی مدت و کشت کلونال مغزاستخوان انسان افزایش حیات و تکثیر سلولهای خونساز در حضور فاکتورهای رشد خونساز مشاهده گردید ، همچنین اثرغلظت فاکتور رشد و وجود عوامل مهار کننده رشد سلولهای خونساز در محیط مغذی(PHA-LCM) ساخته شده در محیط آزمایشگاه در مقایسه با فاکتورهای رشد نوترکیب برروی کشت سلولهای خونساز ارزیابی شد .

مواد و روشها

سلول مغزاستخوان

سلول مغزاستخوان از ۶ فرد سالم دهنده پیوند مغزاستخوان در گروه سنی ۳۳-۵ سال ۲ مرد و ۴ زن (که سلامت داوطلبان توسط دستورالعمل کمیته مرکز تحقیقات پیوند مغزاستخوان بیمارستان شریعتی تائید شد) توسط سرنگ هپارینه (۸۰U /ml) از ناحیه تاج خلفی-فوقانی ایلیاک جمع‌آوری و سپس با نسبت ۱:۱با محیط IMDM در لوله ۱۵cc (Fulcon) ترکیب شد و سپس بر روی محلول فایکل (پالایشگاه سازمان انتقال خون ایران) بانسبت ۱:۲ دردور ۴۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سلولهای منونوکلئار جداسازی شد و سپس شمارش سلولی برروی لام نئوبارتوسط میکروسکوپ معمولی انجام شد.

محیط کشت

برای کشت طولانی مدت مغز استخوان از محیط IMDM(Sigma) با pH=۷/۴ به همراه ۱۲/۵درصد سرم اسب (Sigma) ۱۲/۵درصد FBS(Gibco)[1]، هیدروکورتیزون (Sigma) mmol/ml ۵×۱۰^{-۷}، استرپتومایسین(Sigma) ۰/۱mg/ml پنی‌سیلین ۱۰۰u/ml(Sigma) و بی‌کربنات سدیم ۲m g/ ml(Sigma) استفاده شد(۵).

فاکتورهای رشد

فاکتورهای رشد مغذی در محیط کشت LTBM و در محیط کشت نیمه‌جامد آگار فاکتورهای رشد نوترکیب انسانی شامل: اینترلوکین ۳(IL-3)، اینترلوکین ۶(IL-6)، استم سل فاکتور (SCF) با غلظت ng/ml ۱۰فاکتور رشد گرانولوسیت- منوسیت (GM-CSF) با غلظت ۱۰۰ng/ml (Sigma) و PHA- LCM(Sigma) با غلظت ۱µg/ml استفاده شد(۶، ۷).

سیکلوسپورین A

سیکلوسپورین A استفاده شده در این تحقیق از نوع درمانی بود که توسط اتانل ۹۰ درجه با رقت ml/ ۰/۳µg تهیه و جهت کشت LTBM و کشت کلونال (۳) به کارگرفته شد (۲).

PHA- LCM

تعداد ۱×۱۰^{۶}/ml سلول منونوکلئار خون محیطی که توسط محلول فایکل جدا شد پس از دو بار شستشو با محیط IMDM در محیط IMDM همراه با ۱۰ درصد FBS و PHA باغلظت ۱µg/ml به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۱۰۰درصد کشت داده شد ، پس از یک هفته محیط رویی برداشته شد و جهت حذف سلولهای موجود به مدت ۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید سپس جهت استریل کردن از فیلتر ۰/۲ میکرون استفاده گردید (۸). جهت ارزیابی عوامل مهارکننده رشد در این محیط آن را دو قسمت کرده و یک قسمت از محیط را در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و به عنوان Condition medium active و قسمت دیگر را که دراین شرایط قرار داده نشد به عنوان Condition medium inactive درارزیابی کلنی استفاده نمودیم.

کشت طولانی مدت مغزاستخوان

تعداد ۲×۱۰^{۶}/ ml سلول منونوکلئار مغزاستخوان پس از شمارش توسط لام نئوبار در پلیت کشت۲۴ خانه (Nunck) به همراه محیط کشت مخصوص LTBM و فاکتورهای رشد خونساز (۱۰ ng/ml) IL-3,IL-6,SCF و سیکلوسپورین A (۰/۳µg/ml) به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۱۰۰ درصد انکوبه نمودیم .در فواصل هر هفته با تعویض محیط کشت، محیط کشت جدید به همراه فاکتورهای رشد خونساز IL-3,IL-6,SCF و سیکلوسپورین A به پلیت کشت اضافه نمودیم. سلولهای غیرچسبان برداشت شده درفواصل هر هفته توسط لام نئوبار شمارش شده و سپس دوبار با محیط IMDM همراه با ۲ درصد FBS شسته شد.

1. Fetal Bouvin Serum

Archive of SID
www.SID.ir

کشت کلونال سلولهای غیرچسبان کشت طولانی مدت مغزاستخوان

تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول شسته شده غیرچسبان در هر میلی‌لیتر به همراه محیط مخصوص ارزیابی کلنی (IMDM، ۲۰FBS درصد، آگار ۱درصد) و فاکتورهای رشد خونساز IL-3 ,IL-6, SCF (۱۰ng/ml) و GM-CSF (۱۰۰ ng/ml) برای ارزیابی سلولهای تشکیل‌دهنده کلنی در پلیت کشت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد و سپس به مدت ۱۴ روز در محیط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۱۰۰ درصد انکوبه نمودیم.در روز ۱۴ با استفاده از میکروسکوپ معکوس (Ziess) کلنی‌ها را شمارش و از نظر مورفولوژی بررسی نموده و برای تهیه اسمیر از کلنی‌ها با استفاده از پیپت پاستور از کلنی‌ها نمونه برداری کرده و شمارش سلولی انجام داده و جهت تهیه لام توسط سایتواسپین ۱۰۰λ از نمونه سلولی را در دور ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ نموده و لام تهیه شده را جهت مشاهده مورفولوژی سلولهای تشکیل‌دهنده کلنی خونساز توسط رنگ رایت- گیمسا رنگ‌آمیزی شد، ولی از نتایج به علت کمبود امکانات عکس گرفته نشد (۸).

کشت کلونال سلولهای مغزاستخوان و بررسی اثر PHA-LCM,IL-3,IL-6,SCF,GM-CSF,Cy A

در این مطالعه جهت بررسی اثر سیکلوسپورین A برروی کشت کلونال سلولهای خونساز مغزاستخوان از روش کشت نیمه جامد آگار استفاده شد دراین روش سلولهای مغزاستخوان پس از جمع‌آوری توسط سرنگ هپارینه (۸۰U/ml) و جداسازی سلولهای منونوکلئار برروی محلول فایکل به میزان ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیترمحیط کشت (۲۰FBS, IMDM) در پلیت کشت ۲۴ خانه به همراه فاکتورهای رشد خونساز IL-3, IL-6, SCF (۱۰ng/ml) GM-CSF (۱۰۰ ng/ml) PHA-LCM (۱۰۰ λ/ML) و CyA (۰/۳μg/ml) به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد Co_2 و رطوبت ۱۰۰ درصد انکوبه نموده و در روز۱۴ کلنی‌های تشکیل‌شده در پلیت کشت توسط میکروسکوپ معکوس (Invert) مشاهده و شمارش کلنی‌ها انجام شد.

یافته‌ها

تکثیر سلولهای منونوکلئار مغزاستخوان در محیط کشت LTBM تحریک‌شده و تحریک‌نشده

بیشترین اثر افزایشی در تکثیر تعدادسلولهای هسته‌دار غیرچسبان در LTBM در فاصله۴ هفته در هفته۳و۴ در محیط IL-3,IL-6,SCF و CyA در مقایسه با محیط کشت حاوی IL-3,IL-6,SCF و محیط کشت حاوی CyA و محیط کشت بدون فاکتوهای رشد و CyA مشاهده شد. تشکیل لایه تغذیه کننده (Feeder) و چسبیدن سلولهای خونساز به آن و کاهش سلولهای غیرچسبان در هفته دوم که نشان دهنده چسبیدن سلولهای مغز استخوان به کف پلیت کشت و تشکیل لایه استروما است در شکل(۱-الف) مشاهده می‌شود. افزایش سلولهای غیرچسبان در هفته سوم و هفته چهارم بیان‌کننده تشکیل CobbleStone و سلولهای آدیپوسیت یا سلولهای چربی که بیان‌کننده فعالیت خونسازی و تکثیر سلولهای خونساز در محیط کشت است در شکل (۱-ب) مشاهده می‌شود. نتایج حاصل از تکثیرسلولهای منونوکلئار مغز استخوان در محیط کشت LTBMC تحریک شده و تحریک نشده در جدول ۱ آورده شده است.در شروع آزمایش به هر پلیت معادل 2×10^{6} / ml سلول مغزاستخوان به همراه فاکتورهای رشد مربوطه و سیکلوسپورین A مطابق با جدول ۱ اضافه شده است. نمودار (۱) نشان دهنده میانگین از ۶ نمونه مغز استخوان کشت داده شده در فاصله ۴ هفته مطابق جدول ۱ در محیط LTBMC است. میانگین تعداد سلولها در هرمحیط کشت به طور جداگانه محاسبه شد (میانگین سلولی مربوط به ۶ فرد دهنده سالم مورد مطالعه، محاسبه گردید) و برای مقایسه محیط های مختلف جهت توزیع نرمال از آزمون مستقل **t-test** استفاده شد و میزان ($P<0/05$) به عنوان معنی‌دار بودن تست در نظر گرفته شد. معنی دار بودن تحریک سلولهای خونی از طریق مقایسه با نمونه کنترل تحریک‌نشده و مقایسه محیط‌های تحریک‌شده با یکدیگر انجام شد، و افزایش ۲/۵ برابر تعدادسلولهای خونی در محیط حاوی IL-3,IL-6,SCF,CyA با میانگین ۱۰۱/۱۵ نسبت به محیط کنترل با میانگین ۴۷/۶ و افزایش ۱/۵ برابر نسبت به محیط حاوی فاکتور رشد بامیانگین ۸۲/۸ مشاهده شد.

جدول ۱: مقایسه نتایج آماری (M ±۲ SD) تعداد سلولهای غیرچسبان مغزاستخوان در فاصله چهار هفته در محیط LTBM (۱۰۰۰۰۰×)

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم
کنترل (A)	۸۵±۱۵	۱۰/۲±۰/۵	۱۴/۲±۲/۴	۸۱±۱۰
(B)IL-3,IL6,SCF	۱۰۲±۳۰	۳۵/۴±۸/۲	۷۹/۸±۲۱/۶	۱۱۴±۳۸
(C)IL-3,IL6, SCF, CyA	۱۵۲±۴۰/۸	۵۰±۱۰/۸	۸۲/۶±۳۰	۱۲۰±۲۲
(D) CyA	۱۲۱±۴۲	۲۵±۴/۸	۴۰/۸±۹/۶	۹۹±۱۰

تکثیر CFU-Cحاصل از سلولهای غیرچسبان محیط کشت LTBM در محیط نیمه جامد آگار

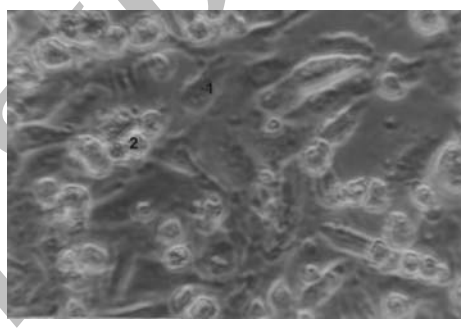
نتایج حاصل از کشت سلولهای غیرچسبان در محیط نیمه جامد آگار به منظور ارزیابی تشکیل کلنی سلولهای خونساز در حضور فاکتورهای رشد مورد نظر و سیکلوسپورین بصورت (M± SD) در جدول ۲ نشان داده شد. تعدادسلولهای کشت داده شده در هر پلیت ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر است و باتوجه به نتایج، افزایش ۲ برابر تشکیل کلنی‌های سلولهای خونساز توسط IL-3,IL-6,SCF,CyA در محیط کشت LTBM مغذی شده با میانگین ۵۶ نسبت به محیط کشت LTBM مغذی نشده با میانگین ۲۶/۲۵ و محیط‌کشت حاوی IL-3,IL-6,SCF با میانگین ۳۲/۶۵مشاهده شد. در تصویر(۲-الف) تشکیل کلنی گرانولوسیت- منوسیت در محیط کشت نیمه جامد آگار پس از ۱۴ روز مشاهده می‌شود. نمودار نشان دهنده میانگین به دست آمده از کلنی‌های

Archive of SID
www.SID.ir

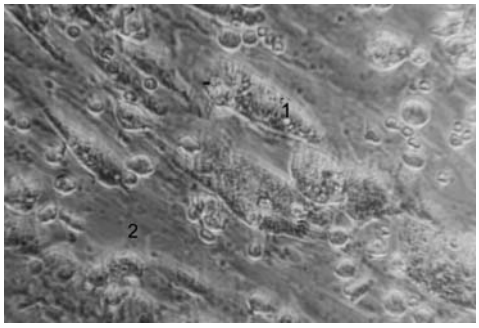
گـرانـولوسیت- مـنوسیت حـاصل از سـلولهای غـیرچسبان نـمونه مغزاستخوان کشت داده شده در محیط نیمه جامد آگار است.

A: محیط کنترل
B: محیط IL-3, IL-6, SCF
C: محیط IL-3, IL-6, SCF, CyA
D: محیط CyA

نمودار ۱: مقایسه میانگین تعداد سلولهای غیرچسبان در محیط کشت LTBM (A,B,C,D) در فاصله چهار هفته



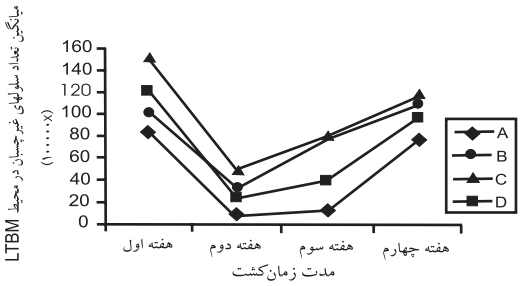
شکل ۱ الف: تشکیل لایه Feeder و چسبیدن سلولهای مغزاستخوان به لایه Feeder در هفته دوم LTBMC



شکل ۱ ب: کشت طولانی مدت مغزاستخوان در هفته چهارم و تشکیل نواحی Cobbleston به همراه فیدر لایر و سلولهای آدیپوسیت

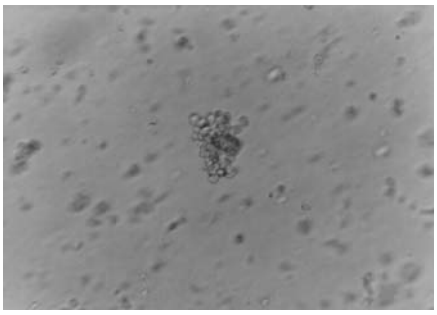
تـکثیر کـلنی‌ها در هـرمحیط کـشت بـرای ۶ نـمونه به طـور جـداگـانه محاسبه شده و برای مقایسه محیط های مختلف جهت توزیع نرمال از آزمـون مـستقل **t-test** اسـتفاده شـدو مـیزان (**P** <۰/۰۵) به عـنوان معنی‌دار بودن تست در نظر گرفته شد.معنی دار بودن تحریک سلولهای خونی از طریق مقایسه با نمونه کنترل تحریک‌نشده و مقایسه محیط‌های تحریک شده با یکدیگر انجام شد.

باتوجه به جدول افزایش قابل قبول تعداد کلنی‌ها در محیط به علت فاکتورهای رشـد و CyA می‌باشدکه جهت نشان‌دادن تکثیر سلولهای تـشکیل دهـنده کـلنی خـونساز از آزمـون مـستقل t-test اسـتفاده شـد و میزان (P<۰/۰۵) جهت معنی‌دار بودن استفاده می‌شود.



A: محیط کنترل
B: محیط IL-3, IL-6, SCF
C: محیط IL-3, IL-6, SCF, CyA
D: محیط CyA

نمودار ۲: مقایسه میانگین تعداد کلنی گرانولوسیت- منوسیت حاصل از سلولهای غیرچسبان درمحیط کشت نیمه‌جامد آگار



شکل ۲ –الف: تشکیل کلنی خونساز گرانولست –منوسیت پس از ۱۴ روز در محیط نیمه‌جامد آگار

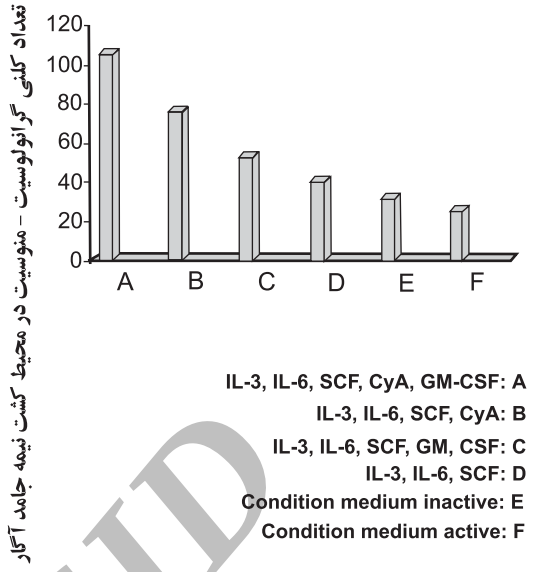
جدول ۲: مقایسه نتایج آماری تعداد کلنی گرانولوسیت- منوسیت حاصل از سلولهای غیرچسبان درمحیط کشت LTBM

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم
کنترل (A)	۱۵/۸±۴/۲	۳۰±۷/۱	۲۸/۸±۱۹	۳۰/۴±۱۰
(B)IL-3,IL-6,SCF	۱۲/۴±۹/۰۲	۳۰/۴±۰/۵	۳۸/۴±۱۷	۴۰/۶±۹/۲
(C)IL-3,IL-6, SCF, CyA	۴۵/۴±۱۰	۴۹/۲±۱۵	۶۴±۱۴	۶۵/۴±۲۰
(D) CyA	۳۸/۲±۱۵/۳	۳۵±۷/۵	۵۶/۶±۱۵/۳	۵۰/۴±۱۸

بررسی تکثیر سلولهای تشکیل‌دهنده کلنی CFU-C در محیط نیمه‌جامد آگار

تکثیر کلنی‌های خونساز GM-CFU در محیط کشت حاوی PHA-LCM (Inactive) نـسبت به PHA-LCM (Active) بـیان‌کننده مـهار فـاکتورهای مـهارکننده رشـد کـلنی خـونساز در HA-LCM(Inactive) و هـمچنین افـزایش کـلنی‌های خـونساز در مـحیط حـاوی IL-3,IL-6,SCF ,GM-CSF نـسبت به مـحیط حـاوی IL-3,IL-6,SCF,Cy A و افـزایش کـلنی در مـحیط حـاوی IL-3,IL-6,SCF,Cy A نـسبت به IL-3,IL-6,SCF نشاندهنده اثر هم‌افزائی GM-CSFو Cy A همراه با فاکتورهای رشد IL-3,IL-6,SCF برروی کشت سلولهای تشکیل دهنده کلنی است که این نتایج (M± SD) در جدول ۳ نشان داده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۳: مقایسه نتایج آماری تعداد کلنی گرانولوسیت – منوسیت در محیط کشت نیمه‌جامد آگار

تعداد سلول در هر پلیت محیط کشت نیمه‌جامد آگار 1×10^5 در هر میلی لیتر از سلولهای منونوکلئار مغزاستخوان ۶ فرد دهنده سالم انتخاب شد. ستون نشان دهنده میانگین به دست‌آمده از کلنی‌های گرانولوسیت- منوسیت حاصل ازکشت سلولهای منونوکلئار در محیط نیمه جامد آگار است.

جدول۳: مقایسه نتایج آماری تعداد کلنی گرانولوسیت – منوسیت در محیط کشت نیمه‌جامد آگارمغذی شده با PHA-LCM و فاکتورهای رشد خونساز و سیکلوسپورین A

Condition Medium Active	Condition Medium Inactive	IL-3, IL-6 SCF	IL-3, IL-6 SCF GM-CSF	IL-3, IL-6 SCF, CyA	IL-3, IL-6 SCF, CyA GM-CSF
۲۵±۷	۳۱/۳۷±۱۰	۴۰/۰۳±۱۰	۵۲/۱۲±۱۲	۷۶/۲۵±۲۰	۱۰/۸۷±۳۰

تکثیر کلنی‌ها در هرمحیط کشت به طور جداگانه محاسبه شده و برای مقایسه محیط های مختلف جهت توزیع نرمال از آزمون مستقل t-test استفاده شد و میزان $P < ۰/۰۵$ به عنوان معنی‌دار بودن تست در نظر گرفته شد.

معنی دار بودن تحریک سلولهای خونی از طریق مقایسه محیط‌های کشت تحریک شده با یکدیگر انجام می‌شود.

بحث

خونسازی فرایند پیچیده‌ای است که در آن سلول مادر خونساز علاوه بر تولید سلول شبیه، خود تمایز نیز می‌یابد. کشت طولانی مدت مغزاستخوان به عنوان یک مدل *In vitro* جهت ارزیابی ریز محیط مغزاستخوان در کشت مغزاستخوان استفاده می شود.این محیط باتوجه به حمایت از رشد وپرولیفراسیون و تمایز پروژنیتورهای کلونوژنیک و استم سل‌های چون CFU-S, LTC-IC مدل ناقصی از هماتوپوئز است (۵). چراکه عمر این کشتها محدود است و اثر لایه چسبنده LTBMC در حمایت از رشد و پرولیفراسیون سلول پروژنیتور به طور عمده توسط شرایط کشت متغیر است (۹، ۱۰).

توسعه روشهای *In vitro* کشت سلولهای خونساز استم‌سل و پروژنیتورهای خونساز موضوع مورد علاقه محققان برای توسعه سلولهای خونساز به منظور پیوند مغزاستخوان همچنین منبع استم‌سل‌های تکثیر شونده برای ژن‌تراپی است، با گذشت بیش از ۳۰ سال از پیوند مغزاستخوان هنوز مهمترین عامل محدودکننده پیوند، واکنش GVHD حاصل از اثر فعالیت لنفوسیتهای T واکنش‌دهنده فرد دهنده پیوند علیه آنتی‌ژنهای MHC مختلف که در فرد گیرنده پیوند، است (۱۱، ۱۲).

سیکلوسپورین A برای مدتهای طولانی به عنوان یک داروی ایمونوسوپرسیو و داروی تحریک کننده خونسازی در محیط *In vivo* و شکل گیری کلنی های خونساز در محیط *In vitro* شناخته شده است (۴).

همچنین محققان با بکارگیری آنتی‌بادی ضد اینترفرون گاما و سیکلوسپورین A درمحیط کشت ارزیابی کلنی که حاوی سلولهای مغز استخوان افراد پیوند شده و افراد سالم به طور مجزا بود به ارزیابی اثر مشابه سیکلوسپورین A وآنتی بادی ضد اینترفرون گاما پرداختند و به این ترتیب اثر مهارترشح فاکتور اینترفرون گاماتوسط سیکلوسپورین را بیان کردند (۱۳).

مطالعات برروی کشت مخلوط لنفوسیت همراه با سیکلوسپورین A با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر مهارکامل واکنشهای تکثیری در مقایسه با کشت کنترل را نشان دادندو جهت ارزیابی اثر سیکلوسپورین با به کارگیری اینترلوکین ۲ و عدم پاسخگوئی سلولهای ازقبل مجاورشده با سیکلوسپورین A به مهار اینترلوکین ۲ توسط سیکلوسپورین A دست یافتند (۱۴،۱۵، ۱۶).

در این مطالعه برای اولین بار کشت طولانی مدت و کشت کلونال سلولهای خونساز مغز استخوان انسان سالم همراه با اثر سیکلوسپورین A و فاکتورهای رشد(IL-3,IL-6,SCF) در مقایسه با کشتهای مغزاستخوان بدون CyA بررسی شد.

تاثیر سیکلوسپورین A همراه با فاکتورهای رشد روی کشت سلولهای خونساز مغزاستخوان نرمال و افزایش۲/۲برابر ($P<۰/۰۵$) تعداد سلولهای خونی در محیط LTBM با میانگین (۱۰۱/۱۵) و افزایش ۲/۱ برابر (۱۰۱/۱۵) کلنی‌های خونساز در مقایسه با سایر محیط‌های کشت با میا نگین (۵۶) نشان دهنده اثر تحریک کنندگی CyA به همراه فاکتورهای رشد IL-3, IL- 6,SCF در تکثیر و تمایز سلولهای خونی در محیط کشت نسبت به محیط فاقد فاکتور رشد و سیکلوسپورین است. همچنین افزایش کلنی‌های خونساز در محیط حاوی سیکلوسپورین نسبت به سایر محیط‌های کشت نشان دهنده مهار فعالیت ژن فاکتورهای مهارکننده خونسازی و تاییدکننده نظریه نقش سیکلوسپورین A به همراه فاکتورهای رشد خونساز اولیه در

Archive of SID

www.SID.ir

مسیرهای نسخه‌برداری از ژنها و بیان ژنهای تنظیم‌کننده فاکتورهای رشد است که جهت اثبات نیاز به مطالعات گسترده‌تر بر روی مسیرهای مولکولی که در بیان ژن دخالت دارند است.

در این مطالعه با استفاده از محیط (Condition medium active & Condition medium inactive) مشاهده شد که افزایش سلولهای خونساز در محیط‌های کشت مغذی شده با فاکتورهای رشد نوترکیب (IL-3,IL-6,SCF) نسبت به محیط کشت مغذی شده با محیط‌های (Condition medium active & Condition medium inactive) به علت غلظت مناسب و تخلیص شده فاکتورهای رشد و عدم وجود عوامل مهار کننده رشد است وهمچنین با استفاده از محیط کشت (Condition medium inactive) کاهش عوامل مهارکننده رشد در این محیط مشاهده شد.

با توجه به این مطالعه که برای اولین بار بر روی سیستم کشت طولانی مدت مغزاستخوان انسان انجام شد دریچه‌ای امید بخش جهت برداشتن گامهای موثر برای نگهداری سلولهای خونی مغز استخوان در جهت ژن‌تراپی سلولهای خونساز اتولوگ برای پیوند در افراد بیمار بجای سلولهای آلوژن جهت پیشگیری از پدیده GVHD گشوده شد با استفاده از سیکلوسپورین A به همراه فاکتورهای رشد خونساز درمحیط کشت می‌توان تعداد سلولهای خونی را افزایش داد اما جهت اثبات تاثیر سیکلوسپورین بر روی ژنهای تنظیم کننده فاکتورهای رشد خونساز و مسیرهای نسخه‌برداری از ژنها لازم است مطالعات گسترده‌ای بر روی سیستم‌های مولکولی تنظیم‌کننده پیامهای نسخه‌برداری ژنهای فاکتورهای خونساز صورت بگیرد .

References

1. Trentin JJ : Hemopoietic colony studies .V.Effect of Hemopoietic organ stroma on differentiation pluripotent Stem cell.J EXP Med 1958; 127:205

2. yonish-Roulch E, Meir shinitzky and MenashemRubinstein: A method for preparing biologically active aqueous cyclosporin A solutions avoiding the use of detergent or organic solvents.Journal of immunological methods.1990; 135: 147-153

3. Scottperry S, Mijung kim: Direct effect of cyclosporin A on proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells.Cell Transplantation. 1999: 8:339-344

4. Quesniaux VF: Immunosuppressants:Tools to investigate the physiological role of cytokines. Bioessays. 1993: 15:731-739

5. Petzer AL: Hogg DE, Landsdorp P, Reid DS, Eavesc J: Self- renewal of primitive hematopoietic cells (LTC-IC) invitro and their expansion in defined medium .Proc Natl Acadsci USA. 1996: 93:1470

6. Stephen J, Forman A, Karl C, Blume E, Donnall H: Bone Marrow Ransplantation. 1994: 53-66

7. Pazebork B, Bartuneck P, Mapava M, Zankem Y: Growth and differentiation of human stem cell factor & EPO dependent erithroied progenitor cell in vitro .Blood. 1998: 2: 3658

8. Deil F, Chen X, Louda N, Zuch H, Schneider B: Effect of interleukin -3, stem cell factor and granulocyte – macrophage colony stimulating factor on commited stem cells, long term bone merrow culture initiating cells and bone marrow stroma in a one- step- long term bone marrow culture.Ann Hematol. 2000: 79: 243-248

9. Ash C, Robert A, Detrick A, Esmail D: Studies of human pluripotential hemopoietic stem cells (CFU-GEMM) in vitro

10. Eaves CJ, Sutter Land HJ: Regulation of primitive human hematopoietic cell in long term bone marrow culture.Seminnars in Hematology. 1991; 28

11. Beradi AC, Wany A, Levine JD, Lopes P, Scadden DT: Functional isolation and charactrization of human hemopoietic stem cell. Blood. 1994; 83: 1515

12. Stephen J: Legrue, Rodency Turner, Norman Weisbrodt: Dose the binding of cyclosporin A to Calmodulin result in immuno suppression. Sience. 1986; 234: 68-71

13. Jhansen L, Houck D, Hoffman R: Primitive human hematopoietic progenitor cells express for grunolocyte-macrophage colony stimulating factor. Eperimental Hematology. 1999; 27: 762-772

14. Raghavachar A, Frickhofen A: Hematopoietic colony formation after allogenic bone marrow transplantation:Enhancement by cyclosporin A and anti-gama-(immune) interferon antiserum in vitro EXP. Hematol. 1986; 14: 621-625

15. Anasetti Beatty C: Effect of HLA in compatibility on graft versus host disease, relapse and survival after marrow- transplantation for pation with leukemia or lymphoma. Hum. Immuno. 1990;
29:79

16. Palacios R, Moller G: Cyclosporin A block receptor for HLA-DR antigen on T-Cells. Nature. 1981; 290: 246-250

Archive of SID
www.SID.ir