Archive of SID

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۳ پاییز ۸۵ (۲۳۲-۲۲۱)

تهیه مواد جایگزین سرم جنین گاو و بررسی اثر آن‌ها بر رشد دودمان‌های سلولی هیبریدومایی و میزان ترشح آنتی‌بادی‌های منوکلونال

دکتر رضا گلستانی[۱]، دکتر سید محمد مؤذنی[۲]، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله[۳]، لطیف حمیدپور[۴]، دکتر مجتبی شرفی[۵]، دکتر زهره عطارچی[۶]، دکتر بشیر حاجی‌بیگی[۶]، فرزانه توسلی[۷]، جمشید اسماعیلی[۸]، سعید ریوندی[۹]

چکیده

سابقه و هدف

دست‌یابی به منابع جایگزین سرم جنین گاو به عنوان ماده مغذی کشت سلول به علت کمبود این نوع سرم و نیازهای متفاوت سلول‌های مختلف همواره مورد بررسی می باشد . این مطالعه به تهیه مواد مغذی جانشین سرم جنین گاو و بررسی اثر آن‌ها بر رشد سلول‌ها و ترشح آنتی‌بادی‌های منوکلونال توسط دودمان‌های سلولی هیبریدومایی پرداخته‌است.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پلاکت‌های تاریخ گذشته با گروه‌های مختلف به منظور استخراج عوامل رشد موجود در آن‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. پلاسما با گروه AB نیز به سرم تبدیل شد و اثر آن با محیط‌های حاوی سرم جنین گاو، هیپوگزانتین ـ تیمیدین (HT) و RPMI ۱۶۴۰ مورد مقایسه قرار گرفت. شاخص‌های رشد مورد ارزیابی شامل شمارش ابتدایی سلول‌ها، Confluency (میزان پر شدن چاهک) روزانه و تیتراسیون آنتی‌بادی‌های منوکلونال آنتی‌A و آنتی‌B گروه‌های خونی بودند. آنالیز آماری شامل آزمون t تک نمونه‌ای، برازش منحنی رگرسیون چندگانه لگاریتمی و تحلیل عاملی منحنی‌های رشد توسط نرم‌افزار SPSS۱۲ انجام شد.

یافته‌ها

چهار ماده مغذی سرم AB انسانی(AB)، سرم جنین گاو (FCS)، عصاره پلاکتی انسان (PLT) و مخلوط AB و PLT (ABP)جهت رشد سلول‌های هیبریدومایی موشی تولیدکننده آنتی‌سرم‌های گروه‌های خونی A و B مورد ارزیابی قرار گرفتند و با شاخص‌های رشد در محیط پایه RPMI ۱۶۴۰ مقایسه شدند. بیشترین اثر مثبت بر رشد به ترتیب نزولی عبارت بود از: ۱- ۵٪ABP، ۲- ۱۰٪FCS، ۳- ۱۰٪ABP، ۴- ۵٪AB، ۵- ۱۰٪AB، ۶- ۵٪PLT، ۷- ۲۰٪ABP ، ۸- ۱۰٪PLT، ۹- ۲۰٪PLT، ۱۰- هیپوگزانتین ـ تیمیدین و تنها ۲۰٪AB مانع رشد گردید. تیتر آنتی‌A و آنتی‌B ایجاد شده توسط هیبریدوم‌ها در مقادیر ۵ و ۱۰ درصد از PLT، AB و مخلوط این دو(ABP) نسبت به FCS ۵ تا ۱۰ درصد به ترتیب نزولی به صورت زیر به دست آمد: ۱- ۵٪PLT، ۲- ۱۰٪PLT، ۵٪ABP، ۱۰٪ABP، ۱۰٪AB، ۳- ۵٪ AB .

نتیجه گیری

به طور کلی FCS دارای بیشترین اثر در شیب تکثیر و مرگ و کمترین اثر در مرحله ثبات منحنی رشد سلول‌ها می‌باشد لذا جهت تکثیر سلول‌ها در شمارش پایین مناسب به نظر می‌رسد. سرم AB، عصاره پلاکتی و مخلوط این دو در مقادیر مناسب دارای شیب کمتر تکثیر نسبت به FCS بوده و باعث طولانی شدن مرحله ثبات و کاهش شیب مرگ می‌گردند (این مواد در غلظت‌های بالا باعث مرگ سلول‌ها می‌شوند). بنابراین ممکن است جهت کشت سلول در سیستم‌های ممتد کشت مناسب باشند.

کلمات کلیدی: سرم انسانی، کشت سلول، کینتیک رشد، گروه‌های خونی، تحلیل عاملی

تاریخ دریافت : ۸۴/ ۷/۱۴
تاریخ پذیرش : ۸۵/ ۲/۱۲

۱- دکترای علوم آزمایشگاهی ـ دانشجوی PhD دانشگاه تربیت مدرس
۲- مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی ـ دانشیار دانشگاه تربیت مدرس ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون ـ صندوق پستی۱۱۱-۱۴۱۵۵
۳- PhD ایمونولوژی ـ استاد دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴- کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون
۵- دکترای علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون
۶- پزشک عمومی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون تهران
۷- کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون
۸- کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون تهران
۹- کارشناس ارشد باکتری شناسی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کشت سلول‌ها در خارج از بدن کاربردهای تحقیقاتی فراوانی دارد. سرم جنین گاو (FCS) برای کشت بسیاری از سلول‌ها ضروری است و مواد افزایش‌دهنده رشد و سیتوکاین‌های مورد نیاز یک کشت موفق را فراهم می‌کند. با درنظر گرفتن مباحث سلامتی و حقوق حیوانات که در تولید FCS مطرح است، ضرورت استفاده از یک ماده جایگزین یا کاهش‌دهنده مصرف FCS احساس می‌گردد(۱). هزینه بسیار بالای تهیه FCS از دیگر عوامل محرک جهت جستجوی جایگزینی مناسب برای آن می‌باشد(۲). زرده تخم‌مرغ، عصاره پلاکتی انسان، سرم انسان، پلاسمای انسان، مایع داخل چشم گاو، سرم موش، سرم موش صحرایی(رات) و سرم اسب از جمله افزودنی‌های محیط کشت هستند که با FCS مقایسه شده‌اند(۸-۱). از آن‌جا که در کشت سلول‌ها نیاز به مواد افزودنی به محیط کشت با منشا انسانی وجود دارد، بر آن شدیم تا این مواد را از پلاکت‌های تاریخ گذشته سازمان انتقال خون ایران در حجم‌های نیمه صنعتی تهیه نماییم و اثر آن را بر انواع سلول، مورد مقایسه قرار دهیم تا قابلیت جایگزینی و مقدمات عرضه به بازار را به عنوان یک جایگزین مناسب FCS بررسی نماییم.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود و در مراحل زیر به انجام رسید؛

الف- تهیه عصاره پلاکتی و سرم AB : از پلاکت‌های تاریخ گذشته پایگاه انتقال خون استان تهران مطابق با روش کلیمون و همکاران، سرم AB و عصاره پلاکتی به دست آمد(۹). مخلوط پلاکت‌های تاریخ گذشته سانتریفوژ گردید تا گلبول‌های قرمز آن رسوب داده شود. سپس پلاسمای حاوی پلاکت جدا شده سانتریفوژ گردید تا پلاکت‌ها رسوب داده شوند و پلاسمای پلاکت‌ها با گروه AB تبدیل به سرم شود. پلاکت‌ها چندین بار شستشو داده شدند تا اثری از پلاسما در آن‌ها باقی نماند. پلاکت‌های شسته‌شده با روش‌های مختلفی مانند انجماد و ذوب، اسیدی شدن، انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یا اضافه نمودن ترومبین وادار به تخلیه گرانول‌های خود می‌گردند. در این تحقیق از سه روش اول استفاده شد و محصول را مخلوط نمودیم. تعداد کل واحد پلاکت مصرف شده حدود ۱۵۰ واحد بود که هر بار ۲۰ تا ۳۰ واحد استخراج شدند.

ب- دودمان‌های سلولی مورد استفاده: هیبریدوم‌های مولد آنتی‌A و آنتی‌B گروه‌های خونی از شرکت پالایش و پژوهش خون تهیه گردیدند.

ج- مواد مغذی سلول: FCS از جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه و نیم ساعت در ۵۶ درجه سانتی‌گراد غیر فعال گردید. پلاکت‌های تاریخ گذشته از پایگاه انتقال خون استان تهران تهیه شدند.

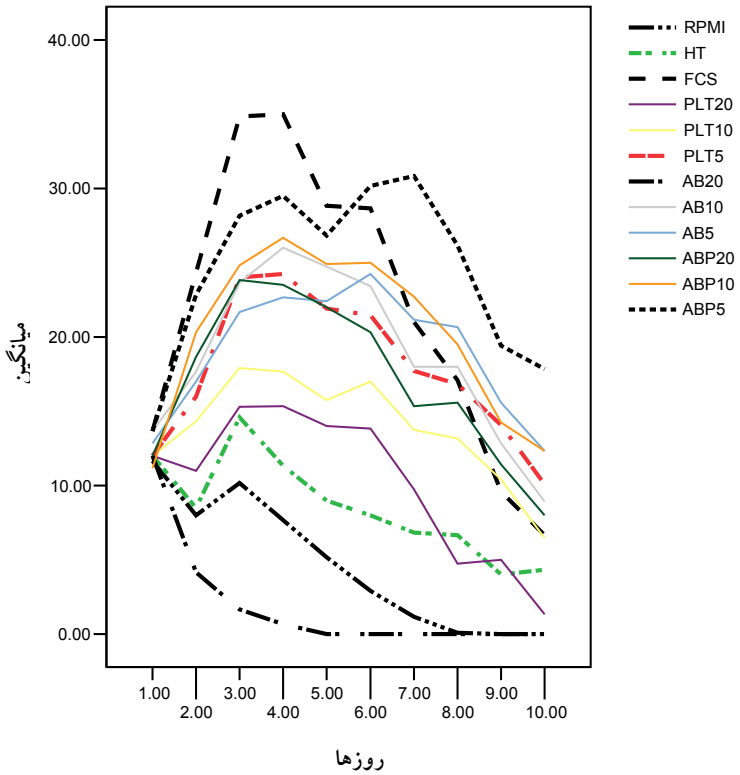
د- کشت سلول‌ها و چگونگی بررسی آن‌ها: چهار ماده مغذی سرم AB انسانی (AB)، سرم جنین گاو (FCS)، عصاره پلاکتی انسان (PLT) و مخلوط AB و PLT(ABP) به میزان مساوی جهت رشد سلول‌های هیبریدومای موشی تولید کننده آنتی‌سرم‌های گروه‌های خونی A و B مورد ارزیابی قرار گرفتند و با شاخص‌های رشد در محیط پایه RPMI۱۶۴۰ مقایسه شدند. مواد مغذی آزمایش شده با درصدها و ترکیب‌های مختلف شامل سرم جنین گاو (FCS)، سرم AB انسانی (AB)، عصاره پلاکت (PLT) و مخلوط AB و PLT(ABP)، هیپوگزانتین - تیمیدین (HT) به محیط پایه RPMI۱۶۴۰ حاوی ۵۰ میکرومولار ۲- مرکاپتو اتانول، ۲ میلی‌مولار ال - گلوتامین، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) - استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه شدند. میزان هیپوگزانتین ۰/۱ میکرومولار و تیمیدین ۰/۰۱۶ میکرو مولار بود. هیبریدوم‌های مولد آنتی‌A و آنتی‌B با سه رقت متوالی چهار برابر در پلیت‌های ۹۶ خانه جهت بررسی میزان پرشدن چاهک و در فلاسک‌های ۲۵ و ۷۵ سانتی‌متری جهت ارزیابی تیتر کشت داده شدند. میزان پرشدن چاهک (Confluency) درصدی از سطح هر چاهک است که توسط سلول‌ها پر می‌شود. میزان پر شدن چاهک روزانه با میکروسکوپ معکوس مورد ارزیابی قرار گرفت و روز بعد از ریختن سلول‌ها در چاهک به عنوان روز اول در نظر گرفته شد. در پلیت‌های ۹۶ خانه، ۱۰۰ میکرولیتر محیط

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱: نحوه امتیازدهی چاهک‌ها بر اساس میزان پر شدن سطح آن‌ها

۱۰<<<	۱۰<<	قرائت >< از هر یک از اعداد جدول	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	درصد پرشدن چاهک
۱	۳	+۵ یا -۵	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	امتیاز



منحنی شماره ۱: نمونه‌ای از منحنی رشد هیبریدوم‌های مولد آنتی A و مولد آنتی B در محیط‌هایی با مواد مغذی RPMI، HT، FCS10%، PLT20%، PLT10%، PLT5%، AB20%، AB10%، AB5%، ABP20%، ABP10%، ABP5% بر حسب میانگین درصد پر شدن چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه در هر روز

اضافه شد.در طول بررسی هیچ تعویض محیطی انجام نگرفت. سلول‌های واجد رنگدانه (پیکنوتیک) مرده قلمداد شدند و میزان امتیاز پر شدن چاهک توسط آن‌ها بر اساس جدول شماره ۱ محاسبه و از امتیاز کل چاهک مربوطه کم شد و منحنی رشد هر سلول در هر چاهک بر اساس امتیاز محاسبه شده در هر روز رسم و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. میزان پر شدن چاهک در هیبریدوم‌های مولد آنتی A و آنتی B، ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت (منحنی شماره۱).

امتیاز میزان پرشدن چاهک هر سلول در FCS در روز اول به شرح زیرتعیین شد: در پلیت‌های ۹۶ خانه سه رقت متوالی هیبریدوم مولد آنتی A ریخته شد که اگر شمارش چاهک ۱۴۰۰۰ بود، میزان پر شدن چاهک در حدود ۴۰٪ برابر با ۴۰ امتیاز، اگر شمارش چاهک ۳۵۰۰ بود، میزان پر شدن چاهک در حدود ۱۰٪ برابر با ۱۰ امتیاز و با شمارش ۸۷۵ که میزان پر شدن چاهک در حدود کمتر از ۱۰٪ بود ۵ امتیاز در نظر گرفته شد. هم‌چنین در سه رقت متوالی، هیبریدوم مولد آنتی B با شمارش ۹۰۰۰ در هر چاهک که میزان پر شدن چاهک در حدود ۲۰٪ بود برابر با ۲۰ امتیاز، با شمارش ۲۲۵۰ که میزان پر شدن

www.SID.ir

Archive of SID

چاهک در حدود ۱۰٪ بود برابر با ۵ امتیاز و با شمارش ۵۶۰ که میزان پر شدن چاهک در حدود ۲٪ بود ۲ امتیاز تعلق گرفت.

هیبریدوم‌های مولد آنتی A و آنتی B در فلاسک‌های ۲۵ و ۷۵ سانتی‌متری (Corning) با رقت $۰/۲\times۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر کشت داده شد و با میزان مرگ سلول حدود ۵۰٪ مورد جداسازی مایع رویی قرار گرفت و تیتراسیون و آزمون‌های کنترل کیفی بر روی آن‌ها انجام‌شد.

هـ ـ نحوه تیتراسیون آنتی‌بادی: تیتراسیون و کنترل کیفی آنتی‌بادی‌های گروه‌های خونی کشت شده بر روی غلظت‌های ۵ و ۱۰ درصد از HT-PLT، HT-AB و HT-ABP به روش لوله‌ای با سوسپانسیون گلبول‌های قرمز ۵ درصد انجام شد. کنترل کیفی شامل واکنش با O-cell در شرایط دمای اتاق، آلبومین در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و کومبس غیر مستقیم همراه با بررسی واکنش آگلوتیناسیون با گلبول‌های قرمز به‌دست‌آمده از کوردهای چهار کیسه خون مجزا برای هر یک از گروه‌های خونی O، A و B بود. جهت تیتراسیون آنتی A از گلبول‌های قرمز با فنوتیپ $A_۱$، $A_۲$، $A_۲B$ و برای آنتی B از گلبول‌های قرمز با فنوتیپ $B_۱$ استفاده شد. مخلوط چند سری ساخت (پولد) هر یک از آنتی‌سرم‌های A و B محصولات شرکت پالایش و پژوهش خون به عنوان آنتی‌سرم کنترل در تمامی آزمایش‌های کنترل کیفی یاد شده مورد مقایسه بودند.

وـ تجزیه و تحلیل آماری: مقایسه میانگین میزان پر شدن چاهک‌ها و تیتر آنتی A و آنتی B با آزمون t تک نمونه‌ای انجام شد. بررسی میزان اثر مواد مغذی مختلف بر میزان پر شدن چاهک‌ها توسط برازش منحنی رگرسیون چندگانه لگاریتمی صورت گرفت. تعیین اثر محیط‌های مختلف بر مراحل متفاوت منحنی‌های رشد سلول‌ها بر حسب میزان پر شدن چاهک‌ها(تحلیل کینتیک رشد) توسط تحلیل عاملی با نرم‌افزار SPSS۱۲ انجام شد.

یافته ها

چهار ماده مغذی سرم AB انسانی (AB)، سرم جنین گاو (FCS)، عصاره پلاکتی انسان (PLT) و مخلوط AB و PLT(ABP) سلول‌های هیبریدومایی موشی تولید کننده آنتی‌سرم‌های گروه‌های خونی A و B مورد ارزیابی قرار گرفتند و با شاخص‌های رشد در محیط پایه RPMI ۱۶۴۰ مقایسه شدند.

در آزمون t تک نمونه‌ای از اختلاف میانگین (MD) پرشدن چاهک‌ها درگروه‌های مختلف نسبت به RPMI در صورت معنی‌دار بودن به عنوان معیار رتبه‌بندی اثر رشد استفاده شد.

در کشت هیبریدوم‌های مولد آنتی A و آنتی B، اختلاف میانگین کلی(MD) میزان پر شدن چاهک‌ها در همه گروه‌های مواد مغذی نسبت به میانگین رشد در RPMI اختلاف معنی‌داری را نشان دادند؛ ۵٪ ABP (MD=۱۹/۸۵، p=۰/۰۰۱) بیشترین اختلاف میانگین مثبت (بیشترین اثر رشد مثبت)، HT(MD=۳/۸۴، p =۰/۰۴۹) کمترین اختلاف میانگین مثبت را نشان دادند و ۲۰٪AB(MD= −۲/۸۳، p=۰/۰۰۱) دارای اختلاف میانگین منفی معنی‌دار (اثر منفی بر رشد) بود. ۱۰٪ FCS (MD = ۱۷/۲۸ ، p = ۰/۰۰۱) در رتبه دوم و ۲۰٪ PLT (MD=۵/۵۴، p=۰/۰۰۶) در رتبه نهم قرار داشتند.

در مجموع سه رقت سلولی هیبریدوم مولد آنتی A همه گروه‌ها اختلاف میانگین معنی‌دار داشتند به جز ۲۰٪PLT و HT که اختلاف بی‌معنی بود. ۵٪ ABP (MD=۲۶/۰۱، p=۰/۰۰۱) بیشترین اختلاف میانگین مثبت و ۱۰٪PLT (MD=۱۳/۹۲، p=۰/۰۰۱) کمترین اختلاف معنی‌دار مثبت را داشتند و ۲۰٪ AB(MD=−۴/۹۶، p=۰/۰۰۲) اختلاف میانگین منفی معنی‌دار (اثر رشد منفی) نسبت به RPMI داشت و ۱۰٪FCS(MD=۱۷/۹۸، p=۰/۰۰۱) در رتبه چهارم قرار گرفت.

در مجموع سه رقت سلولی هیبریدوم مولد آنتی B همه گروه‌ها دارای اختلاف میانگین معنی‌دار بودند به جز ۲۰٪AB (p = ۰/۰۷۱ ، MD = −۰ /۶۹)؛ در ۱۰٪ FCS (P=۰/۰۰۱ ، MD=۱۶/۵۸) بیشترین اختلاف میانگین معنی‌دار مثبت و HT (p=۰/۰۱۲، MD=۲/۱۱) کمترین اختلاف میانگین (کمترین اثر مثبت رشد) را داشتند و ۵٪ABP(MD=۱۳/۷ و p=۰/۰۰۱) در رتبه دوم قرار داشت.

اختلاف میانگین تیتر مجموع مقادیر آنتی A و آنتی B ایجاد شده توسط هیبریدوم‌های مولد این

www.SID.ir

Archive of SID

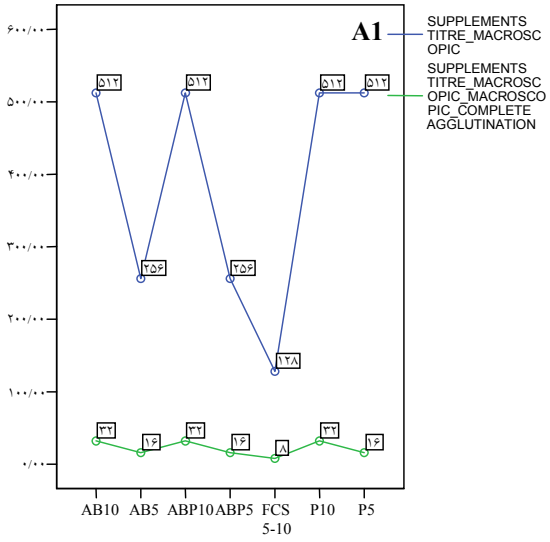
آنتی‌بادی‌ها در محیط‌هایی با مواد مغذی مختلف نسبت به تیتر مخلوط چند سری ساخت این آنتی‌بادی‌ها در محیط ۱۰٪– ۵٪ FCS با ترتیب نزولی به قرار زیر به دست آمد: ۵٪ PLT (MD =۴۴/۹۴ ، p=۰/۰۱۸)، ۱۰٪ PLT ، ۱۰٪ AB ، ۵٪ ABP ، ۱۰٪ ABP (MD = ۳۹/۷۵، p=۰/۰۳۲)، ۵٪ AB (MD=۲۶/۹۴، p=۰/۰۴۲) و تیتر آنتی‌بادی‌های منوکلونال به دست‌آمده از کشت سلول‌های مولد آنتی A و آنتی B در مواد مغذی مختلف با گلبول‌های قرمز مربوطه به دو صورت حداکثر آگلوتیناسیون ماکروسکوپی و حداکثر آگلوتیناسیون کامل ماکروسکوپی به صورت منحنی مقایسه شده‌اند (منحنی شماره۲). آنتی A تولید شده در هیچ یک از مواد مغذی با گلبول‌های قرمز O یا B واکنش نداد. آنتی B تولید شده در هیچ‌یک از مواد مغذی با گلبول‌های قرمز O یا A واکنش نداد.

جهت تعیین میزان تأثیر استفاده از مواد مغذی مختلف نسبت به RPMI از روش برازش منحنی رگرسیون چندگانه لگاریتمی استفاده شد. متغیر مستقل برای هر سلول میزان پر شدن چاهک در محیط RPMI است (Independent Variable) و میزان پر شدن چاهک‌ها با مواد مغذی دیگر به عنوان متغیرهای وابسته برای همان سلول در نظر گرفته شده‌است (Dependent Variables).

در روش برازش منحنی رگرسیون چندگانه لگاریتمی، R^2 واریانس مشترک متغیر مستقل با متغیرهای وابسته برای هر سلول است؛ بتا به عنوان ضریب تاثیر متغیر مستقل استاندارد شده بر متغیرهای وابسته در نظر گرفته می‌شود و B ضریب تاثیر متغیر مستقل در متغیرهای وابسته است. ضریب بتا قدر مطلق و علامت مثبت یا منفی آن با رتبه‌بندی میزان اثر مواد مغذی که در آزمون t تک نمونه‌ای مشاهده شد، مطابقت ندارد. لذا از آزمون تحلیل عاملی استفاده شد و مشخص گردید که شاخص رشد میزان پرشدن چاهک یک تا سه عامل را شامل می‌شود. در مواقعی که فقط یک عامل در تحلیل عاملی مشاهده شد، R^2 و بتا جهت تعیین رتبه‌بندی، میزان اثر مورد استفاده قرار گرفتند (که با رتبه‌بندی مشاهده شده در تحلیل عاملی و t تک نمونه‌ای هم‌خوانی دارد). در مواقع مشاهده بیش از یک جزء، از ضریب B جهت تعیین رتبه‌بندی میزان اثر استفاده شد که با نتایج t تک نمونه‌ای و نتایج تحلیل عاملی هم‌خوانی دارد.

در کشت هیبریدوم‌های مولد آنتی A و آنتی B نتایج کلی رگرسیون به شرح زیر به دست آمد: ۵٪ ABP (B=۲۰/۶۷، sig t=۰/۰۰۰۱) بیشترین ضریب تاثیر رشد و ۲۰٪ AB(B=۴/۲۴، sig t=۰/۰۰۰۷) کمترین ضریب تاثیر رشد را دارا بود و ۱۰٪ FCS (B=۲۰/۰۵، sig t=۰/۰۰۰۱) در رتبه دوم قرار داشت.

در مجموع سه رقت هیبریدوم مولد آنتی A ، ۵٪ ABP (B=۲۲/۵۳، sig t=۰/۰۰۰۲) بیشترین ضریب تاثیر رشد و ۲۰٪ AB (B=۴/۶۵، sig t=۰/۰۴) کمترین ضریب تاثیر رشد



منحنی شماره ۲: نمونه‌ای از منحنی حداکثر تیتر و حداکثر تیتر ۴+ ماکروسکوپی به روش آگلوتیناسیون در لوله مشاهده شده در مایع‌رویی هیبریدوم مولد آنتیA با گلبول قرمز A_1، A_2، A_2B و هیبریدوم مولد آنتیB با گلبول‌های قرمز B در محیط‌هایی با مواد مغذی مختلف.

را نشان دادند و ۱۰٪ FCS(B=۲۱/۰۹، sig t=۰/۰۰۰۲) در رتبه چهارم قرار گرفت.

در مجموع سه رقت هیبریدوم مولد آنتی B ، ۱۰٪ FCS و ۵٪ ABP (B=۱۵/۴۱، sig t=۰/۰۰۰۱) بیشترین ضریب تاثیر رشد و ۲۰٪ AB (B=۲/۱۹، sig t=۰/۰۵۲) بی‌معنی کمترین ضریب تاثیر را دارند.

جهت تعیین اثر مواد مغذی مختلف بر مراحل منحنی

www.SID.ir

Archive of SID

رشد سلول‌ها بر حسب میزان پر شدن چاهک‌ها، از تحلیل عاملی استفاده شد(تحلیل کینتیک رشد).

در تحلیل عاملی سه جزیی یا سه عاملی، هر جزء نماینده یکی از مراحل منحنی رشد سلول شامل فاز "تکثیر"، فاز "ثبات" و فاز "مرگ" می‌باشد. در تحلیل عاملی دو جزیی، یک جزء نماینده ترکیب فاز اول و دوم رشد یعنی تکثیر ـ ثبات و جزء دیگر نماینده فاز مرگ است.

فاز Ascending یا تکثیر شیب منحنی، نماینده مرحله رشد است و هر چه بیشتر باشد سرعت رسیدن به حداکثر رشد بیشتر و زمان آن کوتاه‌تر است و بر عکس فاز Stationary یا ثبات نماینده مدت زمانی است که سلول با رشد حداکثر یا نزدیک به آن در محیط زنده می‌ماند و هر چه این فاز بیشتر باشد این زمان زنده ماندن بیشتر است. فاز Descending یا مرگ، شیب یا سرعت مرگ سلول‌ها در محیط است و هر چه بیشتر باشد سلول‌ها زودتر می‌میرند. برآیند این سه مرحله سرنوشت یعنی شمارش و مدت زنده‌ماندن سلول در هر محیط کشت را معین می‌سازد. ما از تحلیل عاملی به عنوان شاخص تاثیر مواد مغذی مختلف در هر مرحله از رشد (کینتیک رشد) سلول‌های مختلف استفاده نمودیم.

در تحلیل عاملی منحنی‌های رشد(منحنی شماره ۱- میانگین Anti B و Anti A بر حسب میزان پرشدن چاهک در هر روز) هیبریدوم‌های مولد آنتی A و آنتی B دو جزء یا عامل (Component) مشاهده می‌شود؛ الف- جزء یا عامل شماره ۲ نماینده مجموع دو فاز تکثیر و ثبات منحنی رشد است که در آن ۵٪ ABP (۰/۲۲۶-) در رتبه اول مجموع دو فاز تکثیر و ثبات و ۲۰٪ AB(۰/۸۵۹) دارای کمترین میزان این جزء بودند و ۱۰٪ FCS (۰/۰۷۹-) در رتبه ششم قرار گرفت؛ ب- جزء شماره ۱ نماینده فاز مرگ منحنی رشد می‌باشد که ۲۰٪ AB(۰/۴۴۲) در رتبه اول فاز مرگ،۱۰٪ FCS (۰/۷۷۷) در رتبه دوم و ۲۰٪ ABP (۰/۹۷۸) کمترین میزان مرگ را نشان دادند.

تحلیل عاملی منحنی رشد به دست آمده از مجموع سه رقت هیبریدوم مولد آنتیA دو جزء را نشان می‌دهد. الف- جزء شماره ۲ یا تکثیرـ ثبات که ۵٪ PLT (۰/۲۶۸-) در رتبه اول، ۵٪ ABP (۰/۲۲۷-) در رتبه دوم، ۱۰٪ FCS (۰/۰۷۹) در رتبه دهم و ۲۰٪ AB (۰/۸۷۸) در رتبه دوازدهم یا آخر است؛ ب- در جزء شماره ۱ یا مرگ ۲۰٪ AB (۰/۴۲۵) دارای حداکثر میزان فاز مرگ ۱۰٪ FCS (۰/۷۶۱) در رتبه دوم و ۲۰٪ ABP (۰/۹۸۴) دارای حداقل میزان فاز مرگ است.

در تحلیل عاملی منحنی رشد به دست آمده از مجموع سه رقت هیبریدوم مولد آنتیB سه جزء شناسایی شدند: الفـ جزء شماره ۲ یا فاز تکثیر، ب- جزء شماره ۱ یا فاز مرگ و ج- جزء شماره ۳ یا فاز ثبات. الف- در جزء ۲ یا فاز تکثیر ۱۰٪ FCS(۰/۳۱۶-) بالاترین رتبه، ۵٪ AB (۰/۲۸۱) رتبه دوم، RPMI (۰/۷۲۵) رتبه یازدهم و ۲۰٪ AB (۰/۸۸۷) رتبه آخر یا دوازدهم را دارا می‌باشند؛ ب- در جزء ۳ یا فاز ثبات، ۱۰٪ PLT (۰/۵۳۰-) رتبه اول، ۲۰٪ PLT (۰/۴۵۰-) رتبه دوم، ۵٪ PLT (۰/۲۳۰-) رتبه سوم، ۱۰٪ FCS (۰/۳۰۴) رتبه دهم، ۲۰٪ AB (۰/۳۱۰) رتبه یازدهم وRPMI (۰/۳۵۵) رتبه دوازدهم را دارند؛ ج- در جزء ۱ یا فاز مرگ۲۰٪ AB (۰/۱۰۲) رتبه اول، RPMI (۰/۴۸۵) رتبه دوم، ۱۰٪ FCS (۰/۸۴۰) رتبه چهارم، ۵٪ ABP و ۵٪ PLT (۰/۹۵۱) رتبه دهم و ۱۰٪ AB (۰/۹۷۱) رتبه آخر را دارند.

تحلیل عاملی منحنی رشد به دست آمده از رقت اول کشت هیبریدوم مولد آنتی A دو جزء دارد. الف- جزء شماره ۱ یا فاز تکثیر- ثبات که در آن ۱۰٪ AB(۰/۹۸۷) بالاترین میزان، ۱۰٪ FCS (۰/۹۷۰) در رتبه چهارم و ۲۰٪AB (۰/۲۷۷) در رتبه آخر جزء تکثیر- ثبات قرار دارند؛ ب- جزء شماره ۲ یا فاز مرگ که در آن ۲۰٪AB (۰/۹۵۰) در بالاترین میزان، RPMI (۰/۳۶۵) و ۱۰٪FCS (۰/۱۱۲) به ترتیب در رتبه دوم و سوم و ۵٪ PLT (۰/۴۳۴-) در رتبه آخر این جزء یا کمترین میزان مرگ قرار دارند.

در تحلیل عاملی منحنی رشد به دست آمده از رقت دوم هیبریدوم مولد آنتیA سه جزء مشخص گردید؛ الف- جزء شماره ۳ یا تکثیر که در آن ۱۰٪ FCS (۰/۴۹۱-) در رتبه اول، ۱۰٪ AB (۰/۱۰۰-) در رتبه دوم، ۲۰٪ AB (۰/۴۲۳) در رتبه یازدهم و ۲۰٪ PLT (۰/۷۷۱)

www.SID.ir

Archive of SID

در رتبه دوازدهم یا آخر می‌باشند؛ ب- جزء شماره۲ یا فاز ثبات کـه در آن ۵٪ PLT (۰/۴۳۸-) دارای رتبـه اول، ۵٪ ABP (۰/۲۳۳-) رتبه دوم، ۲۰٪ ABP رتبه یازدهم و ۱۰٪ FCS (۰/۸۳۹) رتبه دوازدهم یا آخر مـی‌باشـند؛ ج- جـزء شماره ۱ یا فاز مـرگ کـه در آن HT (۰/۸۲۳-) رتبـه اول، RPMI (۰/۷۹۵-) رتبـــه دوم، ۲۰٪ AB (۰/۷۷۹-) رتبـــه سوم، ۱۰٪ FCS (۰/۱۶۲) رتبه چهـارم، ۵٪ ABP (۰/۸۹۰) رتبـه یازدهم و ۱۰٪ PLT رتبه دوازدهم را دارا می‌باشند.

تحلیل عاملی رقت سوم هیبریدوم مولد آنتیA سه جزء را نشان می‌دهد الف- جزء شماره ۳ یا فاز تکثیر که در آن ۱۰٪ FCS (۰/۵۷۹) رتبـه اول و ۵٪ ABP (۰/۴۶۳-) رتبـه آخر را دارا می باشد؛ ب- در جزء شماره ۲ یـا فـاز ثبـات ۵٪ PLT (۰/۸۹۸-) در رتبـــه اول و ۱۰٪ PLT (۰/۸۵۳-) در رتبه دوم است، ۱۰٪ FCS (۰/۵۲۳) در رتبه یـازدهم و ۲۰٪ PLT (۰/۵۸۲) در رتبـه آخـر قـرار دارنـد؛ ج- جـزء شـماره ۱ یـا مـرگ کـه در آن HT (۰/۸۹۷-) و ۲۰٪ AB (۰/۸۵۶-) به ترتیب در رتبه اول و دوم قـرار دارنـد، ۱۰٪ FCS (۰/۶۰۱) در رتبه هفـتم و ۵٪ AB (۰/۹۴۸) در رتبـه دوازدهم یا آخر هستند.

تحلیل عاملی منحنی رشـد رقـت اول هیبریـدوم مولـد آنتی B نیز سه جزء را نشان می‌دهد؛ الف- جزء شـماره ۱ یا تکثیر که در آن ۵٪ AB (۰/۹۸۰) در رتبه اول، ۵٪ ABP (۰/۹۵۹) در رتبه دوم، ۱۰٪ FCS (۰/۹۴۲) در رتبه چهارم، RPMI (۰/۰۶۲) در رتبه یازدهم و ۲۰٪ AB (۰/۳۶۶-) در رتبه دوازدهم قرار دارند؛ ب- جزء شماره ۲ یـا ثبـات کـه ۱۰٪ PLT (۰/۷۷۳-) رتبـه اول، ۲۰٪ PLT (۰/۷۲۰) رتبـه دوم، ۱۰٪ FCS (۰/۱۴۶) رتبـه شـشم، ۲۰٪ AB (۰/۶۳۹) رتبه یازدهم و RPMI (۰/۸۶۵) رتبه دوازدهم را دارند؛ ج- جزء شماره ۳ یا مـرگ کـه در آن ۲۰٪ AB (۰/۶۳۲) رتبـه اول، ۱۰٪ PLT (۰/۴۶۲) رتبـــه دوم، ۱۰٪ FCS (۰/۰۴۹) رتبـه نهـم و ۱۰٪ ABP (۰/۵۱۲-) رتبـه دوازدهـم را دارا می‌باشند.

در تحلیل عاملی منحنی رشد رقت دوم هیبریدوم مولـد آنتی B سه جزء رقت یافت شد؛ الف- جـزء شـماره ۱ یـا تکثیـر کـه در آن ۲۰٪ ABP(۰/۹۴۸) رتبـه اول، ۵٪ AB (۰/۹۴۳) رتبـه دوم، ۱۰٪ FCS(۰/۹۳۷) رتبـه سـوم، HT (۰/۸۱۶-) رتبـــه یـــازدهم و ۱۰٪ PLT(۰/۸۳۳-) رتبـــه دوازدهم را دارند؛ ب- جزء شماره ۳ یا ثبات که در آن ۵٪ PLT (۰/۵۲۰) رتبـــه اول، ۱۰٪ PLT(۰/۴۲۰) رتبـــه دوم، ۱۰٪ FCS (۰/۲۷۹) رتبه ششم، HT (۰/۱۴۲) رتبه یازدهم و ۲۰٪ AB (۰/۱۲۷)رتبـه دوازدهـــم را دارنـد؛ ج- جـزء شماره ۲ یا مـرگ کـه در آن ۲۰٪ AB (۰/۸۳۱) رتبـه اول، RPMI (۰/۶۱۲) رتبـه دوم، ۱۰٪ FCS رتبـه هـشتم، ۱۰٪ PLT (۰/۳۱۳-) رتبه یـازدهم و ۵٪ PLT (۰/۶۱۰-) رتبـه دوازدهم را دارند.

هم چنین در تحلیل عـاملی منحنـی رشـد رقـت سـوم هیبریدوم مولد آنتـیB دو جـزء یافـت شـد؛ الـف- جـزء شماره ۱ یا تکثیرـ ثبات که در آن ۵٪ ABP (۰/۸۸۸) رتبـه اول، ۵٪ AB(۰/۸۳۳-) رتبـــه دوم، ۱۰٪ FCS (۰/۶۶۳-) رتبه پنجم، ۱۰٪PLT، ۲۰٪PLT و ۵٪ PLT (۰/۹۳۵) رتبه آخر را دارند؛ ب- جزء شماره ۲ یـا مـرگ کـه ۱۰٪ FCS (۰/۶۵۲) رتبـه اول، ۲۰٪ ABP رتبـه دوم ۲۰٪ PLT، ۱۰٪ PLT، ۵٪ PLT (۰/۲۹۰) رتبـــه ماقبـــل آخـــر و ۵٪ ABP(۰/۲۲۵) رتبـه آخر را دارا مـــی‌باشند.

بحث

گزارش‌های موجود مبنی بر وجود مواد مغذی رشـد در پلاکت‌ها و سرم عنوان می‌دارند که آسـیب بـه سـلول‌هـای اندوتلیال عروق خونی باعث تجمع و اتصال پلاکـت‌هـا در محل و آزاد کردن میتوژن‌هایی می‌گردد که همراه با عوامـل رشـد پلاسـمایی باعـث تکثیـر سـلول‌هـا و تـرمیم آسـیب می‌شود(۹). سرم تهیه شده از پلاسما با میـزان کـم پلاکـت (Platelet Poor Plasma) اثر میتوژنی بسیار کمی نسبت بـه عصاره پلاکتی با سرم تهیه شده از پلاسمای غنی از پلاکت یا سرم معمولی دارد و به نظر می‌رسد که کلسیم محیط نیـز عامل تکثیر نمـی‌باشـد چـون عوامـل تکثیـر منـشا پلاکتـی دارند(۱۱-۹). عصاره پلاکتی حاوی مواد زیر می‌باشـد: ۱- مواد کاتیونی رشد مـشتق از پلاکـت (۷۰۰ Da) مقـاوم بـه اسید و حرارت با اثر رشد بـر انـدوتلیوم خـوک، ۲- مـواد آنیـونی شـبه عوامـل رشـد ترانـسفورمه کننـده TGFs (transforming growth factors) (۱۴KDa) که بـا گیرنـده TGFs رقابت نمی‌کنند ولی باعث ایجاد کلونی در آگار نرم

www.SID.ir

Archive of SID

توسط سلول‌های رات NRK و غیر ترانسفورمه موش 2B-ARK می‌گردند، ۳- عوامل رشد کاتیونی مشتق از پلاکت PDGF (platelet derived growth factor) (۳۲-۳۶KDa) با اثر رشد بر سلول‌های گلیال و فیبروبلاست دیپلوییـد انسان، عضله صاف، فیبروبلاست موش ۳T۳ و ۴- TGFb هم‌چنین می‌توان از انسولین و عوامل رشد پلاکتی در محیط‌های فاقد سرم به عنوان عوامل رشد استفاده کرد. تعدادی از عوامل رشد سرمی شامل انسولین، عوامل رشد شبه انسولینی، عامل رشد اپیتلیالی، عوامل رشد پلاکتی، ترانسفرین و سوماتومدین C می‌باشند (۱۹-۱۲، ۱۰).

به طور کلی نتایج ما نشان می‌دهد FCS دارای بیشترین اثر در شیب تکثیر و شیب مرگ و کمترین اثر در مرحله ثبات منحنی رشد سلول‌ها است. لذا جهت تکثیر سلول‌ها در شمارش پایین مناسب به نظر می‌رسد. سرم AB، عصاره پلاکتی و مخلوط این دو در مقادیر مناسب دارای شیب کمتر تکثیر نسبت به FCS بوده و باعث طولانی شدن مرحله ثبات و کاهش شیب مرگ منحنی رشد سلول‌ها می‌گردند (این مواد در غلظت‌های بالا باعث مرگ سلول‌ها می‌شوند). بنابراین ممکن است جهت کشت سلول در سیستم‌های ممتد کشت که مدت زمان زنده‌بودن و تعداد سلول‌های زنده اهمیت بیشتری دارند مناسب باشند.

یافته‌های ما نشان می‌دهد که عصاره پلاکتی، سرم AB انسانی و مخلوط این دو توانایی جایگزینی کامل یا نسبی FCS را برای دودمان‌های هیبریدومایی موش دارند (اثر این مواد جایگزین FCS بر شش رده سلولی دیگر توسط مؤلفان این مقاله بررسی شده‌است ـ یافته‌های چاپ نشده). نتایج مشابه و تایید کننده نتایج این تحقیق توسط سایر محققین نیز گزارش شده است از جمله : عوامل رشد پلاکتی باعث تکثیر سلول‌های شبه استیوبلاستی جنین انسان، کندروسیت‌های مفصل گاو، افزایش ایجاد کلونی سلول‌های توموری سینه انسان و تومورهای اپیتلیالی و مزودرمی انسان، تکثیر (فاکتور رشد پلاکتی حساس به حرارت) سلول‌های ترانسفورمه ۳T۳ با ویروس سیمین(Simian) می‌گردند(۲۴-۲۰). هیبریدوم WuT۳ که علیه لنفوسیت T آنتی‌بادی ترشح می‌کند، در RPMI ۱۶۴۰ همراه با ۱٪ سرم انسانی کشت شده‌است (۲۵).

عوامل رشد پلاکتی در غلظت‌های بالا باعث مهار رشد سلول‌ها می‌گردند چنان‌که مقادیر بالای PDGF باعث مهار رشد سلول‌های پیش‌ساز خونی تحریک شده با اریتروپویتین می‌شوند ولی مقادیر پایین‌تر اثر مطلوب اریتروپویتین را تشدید می‌کنند. این اثر مهاری بر سلول‌های اندوتلیال خوک با حرارت و اسید و در مقادیر ۱۰٪ عصاره پلاکتی با حرارت رفع شد (۲۶، ۹). اثر مهاری گزارش شده در مقادیر بالای عصاره پلاکتی در نتایج ما نیز مشهود است چنان‌که ۲۰٪ PLT باعث مهار رشد انواع سلول‌های مورد آزمایش شد. ولی اثر مهاری سرم AB در غلظت‌های ۲۰٪ که حتی نسبت به RPMI تکثیر را مهار می‌کند می‌تواند تا حدودی به این علت باشد که این سرم‌ها از پلاسمای مجاور با پلاکت‌های تاریخ گذشته به دست آمده‌اند و در طول مجاورت با پلاکت‌ها به علت تخلیه گرانول‌های پلاکتی میزان میتوژن آن‌ها بیشتر از سرم AB معمولی است و در واقع سرم AB غنی از عصاره پلاکتی می‌باشند. ما عصاره پلاکتی را با حرارت غیر فعال نکردیم اما سرم AB را برای غیر فعال کردن کمپلمان حرارت دادیم که با گزارش غیر فعال نمودن اثر مهاری پلاکت‌ها با حرارت مطابقت ندارد. لذا ممکن است سرم در غلظت‌های بالا، مواد مهاری مقاوم به حرارت یا فعال شده در اثر حرارت داشته باشد. در نتایج به دست‌آمده، غلظت‌های پایین مخلوط عصاره پلاکتی با سرم AB در حد FCS یا بهتر و از عصاره پلاکتی یا سرم AB به تنهایی بهتر است که شاید به علت حضور مکمل انواع عوامل رشد پلاکتی حساس به حرارت باشد که در حین غیر فعال کردن سرم AB از بین رفته‌اند اما با اضافه کردن عصاره پلاکتی که با حرارت غیر فعال نشده‌است جایگزین می‌گردند (۲۴).

همچنین مشاهده شد که هیپوگزانتین ـ تیمیدین به ویژه بر روی سلول‌های هیبریدومایی اثر تکثیری نسبت به RPMI دارد که می‌تواند در تفسیر نتایج در مطالعات مشابه مدنظر باشد.

در تحلیل عاملی کینتیک رشد سلول‌ها مشخص شد که عصاره پلاکتی، سرم AB انسانی یا مخلوط این دو باعث افزایش فاز ثبات و کاهش فاز مرگ می‌شوند که با اثر ضد آپوپتوزی گزارش شده مطابقت دارد. از طرفی مشاهده

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود که FCS اثر شدیدی بر رشد سلول در فاز تکثیر دارد اما دارای فاز ثبات کوتاه و فاز مرگ سریع است که با گزارش کاهش بقای سلول در FCS نسبت به محیط حاوی مواد مشتق از شیر (Whey) مطابقت دارد و نشان می‌دهد FCS برای کشت تعداد پایین سلول مانند کلون نمودن مناسب است (چنان‌که مطالعه ما نشان می‌دهد).

نتایج قابل توجه تیتراسیون آنتی A و آنتی B به دست آمده در عصاره پلاکتی و سرم AB و مخلوط این دو نسبت به FCS ممکن است با نتایج افزایش میزان بقای این سلول‌ها در این مواد تا حدودی قابل توضیح باشد. گزارش‌ها بیان می‌دارند که تکثیر هیبریدومای موشی در مواد مشتق از شیر مانند FCS است اما میزان بقا (viability) در مواد مشتق از شیر بیشتر از FCS می‌باشد. میزان تولید آنتی‌بادی در مواد مشتق از شیر ۲۰٪ بیشتر از FCS است(۲۷). فاکتورهای رشد مشتق از پلاکت دارای ویژگی ضد آپوپتوزی بر روی سلول‌های دیسک بین مهره‌های انسان در خارج بدن می‌باشند (۲۸).

به نظر می‌رسد حفظ بقای سلول مهم‌تر از سرعت رشد آن جهت تولید آنتی‌بادی است(۲۹).

از آن‌جا که عصاره پلاکتی، سرم AB یا مخلوط این دو میزان بقای سلول را با افزایش فاز ثبات و کاهش فاز مرگ بالا می‌برند شاید برای تولید محصول بیشتر، آنتی‌بادی‌های منوکلونال در سیستم‌های کشت ممتد سلول مناسب‌تر باشند. نتایج ما نشان می‌دهد عصاره پلاکتی می‌تواند در محیط بدون سرم مورد استفاده قرار گیرد. اما باید سلول مدت بیشتری با آن کشت شود تا تغییرات احتمالی کنترل شوند(نتایج تیتراسیون آنتی A و آنتی B).

در بحث جایگزینی FCS باید مراقب بود چرا که افزایش زمان تقسیم، کاهش کارآیی کشت و افزایش حجم سلول دیپلوئید فیبروبلاست انسان در کشت با سرم نوزاد گاو (newborn bovine)، سرم گوساله (bovine calf) و سرم اسب اختلالاتی هستند که در جایگزینی سرم جنین گاو ایجاد شده‌اند. لذا در جایگزینی سرم جنین گاو در مواقع کمبود یا گرانی جهت کشت فیبروبلاست انسان باید توجه بیشتری نمود (۳۰).

باید توجه داشت که این مطالعه بدون انجام سازگاری سلول‌ها با محیط جدید توسط مخلوط نمودن مقادیر FCS با مواد مغذی عنوان شده صورت گرفته‌است. لذا ممکن است نتایج بهتری با انجام سازگاری سلول‌ها به دست آید.

در مطالعات مشابه کمتر به وضعیت سلول در فاز ثبات یا مرگ و اثر مواد مغذی بر این مراحل توجه شده است چرا که اغلب بر مبنای میزان برداشت تیمیدین نشاندار در فاز تکثیر لگاریتمی انجام شده‌اند(۱۳).

مطالعه ما روش ساده در حجم کم محیط کشت و تعداد پایین سلول بدون تعویض محیط بود. الگوی تحلیل عاملی برای بررسی اثر مواد مختلف در کینتیک و مراحل رشد سلول‌ها به عنوان یک مدل ریاضی پیشنهاد می‌گردد. از آن‌جا که در حدود ۱۰٪ از پلاکت‌های تهیه شده برای مصارف بالینی، تاریخ گذشته می‌شوند در سازمان انتقال خون امکان استفاده از این منبع برای تولید مواد مغذی کشت سلول موجود می‌باشد(۳۱).

نتیجه‌گیری

فن تهیه FCS و مواد جایگزین آن در شرکت پالایش و پژوهش خون با موفقیت به انجام رسیده است لذا می‌توان از آن در تهیه این مواد به عنوان محصول صنعتی استفاده نمود.

به طور کلی FCS دارای بیشترین اثر در شیب تکثیر و مرگ و کمترین اثر در مرحله ثبات منحنی رشد سلول‌ها است لذا جهت تکثیر سلول‌ها در شمارش پایین مناسب به نظر می‌رسد. سرم AB، عصاره پلاکتی و مخلوط این دو در مقادیر مناسب دارای شیب کمتر تکثیر نسبت به FCS بوده و باعث طولانی شدن مرحله ثبات و کاهش شیب مرگ می‌گردند (این مواد در غلظت‌های بالا باعث مرگ سلول‌ها می‌شوند). بنابراین ممکن است جهت کشت سلول در سیستم‌های ممتد کشت مناسب باشند.

تحلیل عاملی منحنی‌های رشد می‌تواند به عنوان الگوی بررسی کینتیک رشد سلول‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از آقایان محمدرضا غلام‌نیای فومنی،دکتر محسن منشدی، محمد تعبدی و خانم‌ها مینا

www.SID.ir

Archive of SID

سادات الداغی و مروارید اخوان، همکاران شرکت پـالایش و پژوهش خون و خانم افتخـاری در پایگـاه انتقـال خـون تهران قدردانی می‌نمایند.

References :

1- Sasse M, Lengwinat T, Henklein P, Hlinak A, Schade R. Replacement of fetal calf serum in cell cultures by an egg yolk factor with cholecystokinin/gastrin-like immunoreactivity. Altern. Lab. Anim 2000; 28(6): 815-31.

2- Schwartz KA, Lu G, Trosko JE, Chang CC. Serum from outdated human platelet concentrates: an alternative supplement for tissue (fibroblast) culture media. Am. J. Hematol 1984; 17(1): 23-7.

3- Clemmons DR, Isley WL, Brown MT. Dialyzable factor in human serum of platelet origin stimulates endothelial cell replication and growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1983; 80(6):1641-5.

4- Pietschmann P, Stockl J, Draxler S, Majdic O, Knapp W. Functional and phenotypic characteristics of dendritic cells generated in human plasma supplemented medium. Scand. J. Immunol 2000; 51(4): 377-83.

5- Filipic B, Shehata M, Toth S, Schwarzmeier J, Koren S. Novel serum replacement based on bovine ocular fluid: a useful tool for cultivation of different animal cells in vitro. ALTEX 2002; 19(1):15-20.

6- Grace S, Guthrie LA, Johnston RB. Jr. The use of mouse serum and the presence of non-adherent cells for the culture of mouse macrophages. J. Immunol. Methods 1988; 114(1-2): 21-6.

7- Reisser D, Fady C, Pelletier H, Lagadec P, Jeannin JF, Olsson N.O. Comparative effect of rat and fetal calf serum on measurement of the natural tumoricidal activity of rat lymphocytes, macrophages and polymorphonuclear cells. Cancer Immunol. Immunother 1989; 28(1): 34-6.

8- Mangalo R, Marcovich H. Mitogenic factors for BALB/c 3T3 cells isolated from the serum of horses by affinity chromatography on a column using fetal calf serum as the ligand. C. R. Acad. Sci. III 1984; 299(11): 445-50.

9- Clemmons DR, Isley Wl, Brown MT, Clemmons DR, Isley Wl, Brown MT. Dialyzable factor in human serum of platelet origin stimulates endothelial cell replication and growth . Proc. NatL. Acad. Sci. USA 1983; 80: 1641-1645.

10- Childs CB, Proper JA, Tucker RF, Moses HL. Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. Proc. NatL. Acad. Sci. USA 1982; 79: 5312-5316.

11- Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A Platelet-Dependent, Serum Factor That Stimulates the Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells In Vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1974;71(4): 1207-1210.

12- Dainiak N, Davies G, Kalmanti M, Lawler J, Kulkarni V. Platelet-derived Growth Factor Promotes Proliferation of Erythropoietic Progenitor Cells In Vitro. J. Clin. Invest 1983;71: 1206-1214.

13- Owen III AJ, Geyer RP, Antonides HN. Human platelet-derived growth factor stimulates amino acid transport and protein synthesis by human diploid fibroblasts in plasma-free media. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982; 79: 3203-3207.

14- Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. Int. J. Periodontics Restorative Dent 2002; 22(6): 547-57.

15- Morris AE, Schmid J. Effects of insulin and LongR(3) on serum-free Chinese hamster ovary cell cultures expressing two recombinant proteins. Biotechnol. Prog 2000; 16(5): 693-7.

16- Wang XF, Cynader MS. Effects of astrocytes on neuronal attachment and survival shown in a serum-free co-culture system. Brain Res. Brain Res. Protoc 1999; 4(2): 209-16.

17- Liu C, Chu I, Hwang S. Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for CHO cells. Enzyme Microb. Technol 2001; 28(4-5): 314-321.

18- Denholm IA, Moule AJ, Bartold PM. The behaviour and proliferation of human dental pulp cell strains in Denholm IA, Moule AJ, Bartold PM. The behaviour and proliferation of human dental pulp cell strains in vitro, and their response to the application of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-1. Int. Endod. J 1998; 31(4): 251-8.

19- Sanders DA, Fiddes I, Thompson DM, Philpott MP, Westgate GE, Kealey T. In the absence of streptomycin, minoxidil potentiates the mitogenic effects of fetal calf serum, insulin-like growth factor 1, and platelet - derived growth factor on NIH 3T3 fibroblasts in a K+ channel-dependent fashion. J. Invest. Dermatol 1996; 107(2): 229-34.

20- Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. J. Orthop. Res 1995; 13(5): 655-63.

21- Kaps C, Loch A, Haisch A, Smolian H, Burmester GR, Haupl T, Sittinger M. Human platelet supernatant promotes proliferation but not differentiation of articular chondrocytes. Med. Biol. Eng. Comput 2002; 40(4): 485-90.

22- Cowan DH, Graham J, Paskevich MC, Quinn PG. Influence of platelet lysate on colony formation of

www.SID.ir

Archive of SID

human breast cancer cells. Breast Cancer Res. Treat 1983; 3(2): 171-8.
23- Cowan DH, Graham J. Stimulation of human tumor colony formation by platelet lysate. J. Lab. Clin. Med 1983; 102(6): 973-86.
24- Kepner N, Lipton A. A mitogenic factor for transformed fibroblasts from human platelets. Cancer Res 1981; 41(2): 430-2.
25- Zhang Y, Zhou Y, Yu J. Effects of peptone on hybridoma growth and monoclonal antibody formation. Cytotechnology 1994; 16(3): 147-50.
26- Blagosklonnyi MV, Zaritskii. [Thermolabile inhibiting proliferation of connective tissue cell activity from platelets] . Tsitologiia 1989; 31(4): 499-502.
27- Legrand C, Capiaumont J, Belleville F, Nabet P. Comparison of metabolism of hybridoma cells cultured in media supplemented with whey or fetal calf serum. Biotechnol. Prog 1993;9(6): 573-9.
28- Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN. Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. Spine 2000; 25(17): 2153-7.
29- Velez D, Reuveny S, Miller L, Macmillan JD. Kinetics of monoclonal antibody production in low serum growth medium. J. Immunol. Methods 1986 ; 86 (1): 45-52.
30- Zamansky GB, Arundel C , Nagasawa H , Little JB . daptation of human diploid fibroblasts in vitro toserum from different sources. J. Cell. Sci 1983; 61: 289-97.
31- Schwartz KA, Lu G, Trosko JE, Chang CC. Serum from outdated human platelet concentrates: an alternative supplement for tissue (fibroblast) culture media. Am. J. Hematol 1984; 17(1): 23-7.

www.SID.ir

Archive of SID

Preparation of fetal calf serum alternatives and their effects on growth and secretion of hybridoma cell lines

Golestani R.[1,2,3](DMT) , Moazzeni S. M.[1,2,3](PhD) , Puorfathollah A.A.[1,3](PhD) , Hamidpour L.[2](MS) , Sharafi M.[2](DMT), Attarchi Z.[4](MD) , Hadji-Beygi B.[4](MD) , Tavasoli F.[2](BS) , Esmaili J.[4](BS) , Reyvandi S.[2](MS)

[1] *Tarbiat Modarres University, Immunology Department*
[2] *Iranian Blood Research & Fractionation Company*
[3] *Iranian Blood Transfusion Organization – Research Center*
[4] *Tehran Regional Educational Blood Transfusion Center*

Abstract

Background and Objectives

Providing fetal calf serum (FCS) alternatives as cell culture supplements is an important field of research to compensate for the FCS supply shortage.This study focused on preparation of fetal calf serum alternatives and their effects on growth and secretion of hybridoma cell lines.

Materials and Methods

Outdated human platelet units undergo extraction for its growth factors to be obtained. Human AB blood group plasma was also converted to serum and its growth effect was compared to FCS, hypoxanthine-thymidine (HT) and RPMI1640 as cell culture media and supplement. Cell growth indices were preliminary counting of cells , confluency as surface area of plates filled with cells, and titration of monoclonal anti-A and anti-B blood group antibodies collected from cultured mouse hybridoma cells. Statistical analysis including one sample t-test, logarithmic multiple regression curve fit, and factor analysis was done by SPSS v12 software.

Results

The four nutritional supplements of (1) human serum AB (AB), (2) human platelet extract (PLT), (3) equal mixture of AB & PLT (ABP), and (4) fetal calf serum as cell culture were examined on mouse hybridoma anti-A and anti-B monoclonal antibody producer cell lines for cell growth indices and compared with the same indices on RPMI1640 media. The growth-stimulating effects in descending order of values were (1) ABP5% , (2) FCS10% , (3) ABP10% , (4) AB5% , (5) AB10% , (6) PLT5% , (7) ABP20% , (8) PLT10% , (9) PLT20%, and (10)HT; but AB20% inhibited growth of mentioned hybridoma cell lines. The titer of anti-A and anti-B monoclonal antibodies produced by cultured hybridoma on 5 and 10 percent concentration of AB , PLT and ABP compared to FCS5-10% at descending order were (1) PLT5%, (2) PLT10% , ABP5% , ABP10% , AB10%, and (3) AB5%.

Conclusions

In general FCS had the following effects on curves of cell growth: (1) the highest increase on slope of multiplication (ascending) phase, (2) the highest increase on slope of death (descending) phase, and (3) the lowest duration of stationary phase. Then, FCS can be appropriate for growth of cells at initial low cell count. Human serum AB, human platelet extract, and equal mixture of both at optimum concentrations (these supplements at high concentrations killed cells) compared to FCS showed (1) decreased slope of multiplication phase, (2) decreased slope of death phase, and (3) increased duration of stationary phase. Thus, AB and PLT may be suitable for continuous cell culture systems in which cell survival during longer times is required. Factor analysis was introduced as a model to evaluate kinetics of cell growth at different supplements.

Key words: Human serum, Cell culture, Growth kinetic, Blood groups, Factor analysis
SJIBTO 2006; 3(3): 221-232
Received: 26 Sep 2005
Accepted: 26 Apr 2006

Correspondence: Moazzeni S.M., PhD of Immunology. Tarbiat Modarres University.
P.O.Box: 14155-111, Tehran, Iran.Tel: (09821)88011001; Fax: (09821)88013030
E-mail: *Moazzeni@dr.com*

www.SID.ir