

## اثر استرس کشت در محیط فاقد سرم بر نتایج کشت مختلط سلول‌های تک هسته‌ای طحال موش: معرفی تعدیل‌گر ایمنی جدید

گیلدا پارسامنش<sup>۱</sup> (M.Sc)، مریم مهری<sup>۱</sup> (M.Sc)، مصطفی شیخ‌زاده<sup>۲</sup> (M.D)، سید حسین موسوی انیجدان<sup>۳</sup> (Ph.D)، امرالله مصطفی‌زاده<sup>۵</sup> (Ph.D)

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۲- آزمایشگاه مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۳- گروه آموزشی پرتوپزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۴- بخش رادیوتراپی، بیمارستان شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۵- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۴

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۱۲۶۵۱۰۵ amrolah65@yahoo.com

† دو نویسنده به یک اندازه مشارکت داشته‌اند

### چکیده

هدف: پیوند مغز استخوان و سلول‌های ایمنی یک روش رایج برای درمان برخی از بیماری‌های خونی در سراسر جهان است. با این حال به دلیل بدتنظیمی سیستم ایمنی استفاده از آن همیشه کارآمد نمی‌باشد. در این مطالعه برآنیم تا پتانسیل استرس کشت در محیط فاقد سرم را در تنظیم سیستم ایمنی ارزیابی کنیم.

مواد و روش‌ها: سلول‌های تک هسته‌ای طحال با استفاده از روش گردایان فایکول از موش‌های Balb/C و C57bl/6 جدا شدند. سلول‌های موش C57bl/6 در شرایط دارای سرم و فاقد سرم در نقاط زمانی مشخص کشت یافتند و میزان بقاء سلول‌ها به روش MTT تعیین گردید. سپس جهت تعیین آلوژنیسیته سلول‌های مذکور، کشت مختلط لنفوسیتی (مدل آزمایشگاهی پیوند) با سلول‌های طحال موش Balb/C انجام شد و با استفاده از روش MTT تکثیر سلولی مورد بررسی قرار گرفت و عکس‌های لازم تهیه گردید.

یافته‌ها: میزان بقاء سلول‌های ایمنی پس از ۷۲ ساعت کشت در محیط فاقد سرم نسبت به گروه کنترل ۸۲/۱٪ بود. هم‌چنین پس از ۲۴ ساعت، آلوژنیسیته این سلول‌ها نسبت به سلول‌های کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $P < 0/01$ ). این کاهش در نقاط زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بارزتر شد ( $P < 0/0001$ )؛ به‌میزانی که پاسخ لنفوسیت‌های موش Balb/C به سلول‌های استرس یافته کم‌تر از سلول‌هایی بوده است که هیچ‌گونه محرکی دریافت نکرده‌اند ( $P < 0/0001$ ). یافته‌های مورفولوژی به وضوح این کاهش را تأیید می‌کنند.

نتیجه‌گیری: استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم موجب کاهش آلوژنیسیته و تعدیل آلوری اکتیویته سلول‌های ایمنی می‌شود. در آینده استفاده از مدل حیوانی موش می‌تواند کاربرد این تکنیک را در پیوند مغز استخوان روشن‌تر سازد.

واژه‌های کلیدی: پیوند، تکنیک کشت سلول، موش، تنظیم ایمنی

### مقدمه

انواع لوسمی لنفوبلاستیک و مولتیپل میلوما [۱]، امیدهای تازه‌ای در ایمونوتراپی سرطان ایجاد نموده است. با این حال، مهم‌ترین مانع در افزایش موفقیت پیوند بافت‌های حامل سلول‌های ایمنی، شناسایی و از بین بردن آن‌ها توسط سیستم ایمنی میزبان است. علاوه بر این، بیماران پیش از دریافت پیوند مغز استخوان جهت از بین بردن سلول‌های بنیادین خون ساز معیوب، تحت اشعه درمانی قرار می‌گیرند که این امر

پیوند مغز استخوان یکی از شیوه‌های درمانی رایج برای برخی از سرطان‌ها و ناهنجاری‌های خون‌شناسی و ایمنی‌شناسی می‌باشد. هم‌چنین در سال‌های اخیر انتقال سلول‌های ایمنی مهندسی شده، از جمله لنفوسیت‌های T با رسپتورهای کایمریک Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T cells، در درمان سرطان‌های مرتبط با خون مانند

میزان فاکتور رشد تغییردهنده-بتا (Transforming Growth Factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) در مایع رویی کشت این سلول‌ها گردید [۱۶،۱۵]. بنابراین یافته‌های این گروه نشان‌دهنده‌ی پتانسیل این تکنیک در تنظیم سیستم ایمنی می‌باشد. جالب است بدانیم که بدن ما نیز روزه‌داری را به عنوان یک استرس در نظر می‌گیرد و در مقابله با آن از طریق مسیری تحت عنوان مدیریت خود تنظیمی استرس باعث کاهش سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌گردد [۱۷].

در مطالعه‌ی حاضر رفتار نفوسیت‌های تهیه شده از طحال موش در برابر استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم بر میزان تحریک‌کنندگی آلونفوسیت‌ها در مدل آزمایشگاهی بررسی گردید. نتیجه این تحقیق نشان داد که این تکنیک می‌تواند در کاهش واکنش‌های نامطلوب در پیوند سلول‌های ایمنی موثر باشد.

## مواد و روش‌ها

### حیوان آزمایشگاهی

موش‌های درون‌زاد (Inbred) شش تا هشت هفته‌ای C57bl/6 نر و Balb/C نر به ترتیب به عنوان موش‌های تحریک‌کننده‌ی پاسخ آلونژنیک (Stimulator) و پاسخ‌دهنده (Responder) از پژوهشکده‌ی شمال انستیتو پاستور ایران خریداری شد. متوسط وزن این موش‌ها ۲۰-۱۹ گرم بوده و در بخش حیوان‌خانه‌ی دانشگاه در دمای ۱۸-۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰٪ و دارای تهویه‌ی مناسب نگهداری شدند. جهت کشتن موش‌ها از روش اخلاقی نخاعی کردن استفاده گردید. این طرح در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل تصویب شد (MUBABOL.REC.1394.82).

### جداسازی لکوسیت‌های تک هسته‌ای طحال

ابتدا موش‌ها به روش اخلاقی قربانی شده و در کنار شعله، طحال با وسایل جراحی استریل خارج گردید. سپس زیر هود کشت سلولی به کمک سرنگ از سولین محیط کشت کامل به داخل بافت طحال چندین مرتبه تزریق گردید؛ به طوری که رنگ تمامی بافت طحال سفید گردد. سو سپانسیون سلولی جمع‌آوری گشته و سلول‌های تک هسته‌ای طحال با استفاده از شیب چگالی فایکول جدا گردید. بدین منظور ابتدا نمونه‌ی سو سپانسیون سلول‌های طحالی به نسبت ۲:۱ بر روی فایکول (GE health care, USA) اضافه شد (به ترتیب فایکول: سو سپانسیون سلولی). لوله‌ها با سرعت ۴۵۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از اتمام سانتریفیوژ هاله‌ای ابر مانند حاوی لکوسیت‌های تک هسته‌ای طحال به آرامی جمع‌آوری گردید و به فالكون جدیدی منتقل شد و به منظور

خود سبب ایجاد التهاب در آنان می‌گردد. این التهاب زمینه را برای رد پیوند مغز استخوان آلونژنیک مهیا می‌سازد. از سوی دیگر فقدان سلول‌های کارآمد ایمنی در میزبان، فرد در یافت‌کننده پیوند را در معرض واکنش پیوند علیه میزبان (Graft versus host disease, GVHD) قرار می‌دهد [۲]. بنابراین جستجوی راه‌کارهایی که بتوان با استفاده از آن‌ها آلونژنوسیت‌های سلول‌های پیوندی را کاهش داده و التهاب را تعدیل نمود، می‌تواند در پیوند مغز استخوان امید آفرین باشد. اخیراً استفاده از پاسخ یکپارچه سلول به استرس (Integrated Stress Response, ISR) در در مان برخی از بیماری‌های پیچیده مورد توجه محققین قرار گرفته است [۳،۴]. در حال حاضر استفاده از استرس ناشی از تابش اشعه ماورابنفش به لکوسیت‌های بیمار به منظور تعدیل سیستم ایمنی در دریافت‌کنندگان پیوند مغز استخوان امر رایجی می‌باشد [۵]. به‌طور طبیعی نیز مشخص شده است که ساکنین مناطق با تابش طبیعی بالا دارای تغییراتی در سیستم ایمنی خود هستند؛ از جمله تعداد سلول‌های T سیتوتوکسیک و سلول‌های کشته‌کننده طبیعی فعال (Natural Killer Cells, NK cells) در این افراد کاهش می‌یابد [۶،۷]. از دیگر استرس‌های سلولی با دسترسی آسان، کشت سلول در محیط فاقد سرم می‌باشد. در این نوع شرایط کشت، به استثنای سرم، دیگر فاکتورها و مواد مغذی مانند گلوکز و اسیدهای آمینه ضروری که سلول برای رشد خود به آن‌ها وابسته است در محیط موجود است. کشت در محیط فاقد سرم از جمله تکنیک‌هایی است که در بیولوژی سلولی برای اهداف گوناگون مانند افزایش فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblast Growth Factor, FGF) [۸]، القای آپاپتوز و اتوفازی [۹،۱۰]، توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G0/G1 [۱۱]، انتقال هسته‌ی سلول سوماتیک [۱۲] و بررسی رفتار سلول‌های سرطانی در شرایط فقدان سرم [۱۳،۱۴] مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مطالعات گذشته که بر روی سلول‌های فیبروبلاست انسانی صورت گرفت، نشان داده شده است که مایع رویی کشت فاقد سرم این سلول‌ها سبب افزایش تکثیر و مهاجرت این سلول‌ها و افزایش توانایی آن‌ها در تسریع ترمیم زخم می‌گردد. [Patent: H01G:A61B-2014] هم‌چنین در مطالعه‌ی دیگر که بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) انسان صورت گرفت، کشت فاقد سرم سبب کاهش معنی‌دار سطح آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی اصلی کلاس یک (Major Histocompatibility Complex, MHC)، کاهش قدرت تحریک آلونژنیک این سلول‌ها، افزایش سلول‌های لنفوسیت تنظیمی (Regulatory T cells, Treg) و هم‌چنین افزایش

در صد جذب نور Optical Density (OD) بر روی و گزارش گردید.

### کشت مختلط لنفوسیتی یک طرفه (MLR) Mixed Lymphocyte Reaction

ابتدا سه موش نر دهنده سلول‌های تحریک‌کننده به روش اخلاقی قربانی شدند. سپس از طحال آن‌ها به روش ذکر شده در بالا لکوسیت‌های تک هسته‌ای جدا گردید. جهت انجام این تست ابتدا طبق پروتکل ذکر شده، تعداد ۳۰۰ هزار سلول از هر موش به عنوان تحریک‌کننده (Responder) در محیط کشت دارا و فاقد سرم به صورت سه تایی در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. همچنین، همین تعداد سلول جهت بررسی و تایید عملکرد مهای اشعه بر تکثیر سلول‌ها به دو گروه سه تایی از چاهک‌ها اضافه شدند. سپس پلیت حاوی سلول‌ها تحت تابش ۳۰۰۰ راد (با انرژی ۶Mv) با دستگاه شتاب‌دهنده خطی مدل Primus ساخت شرکت زیمنس آلمان قرار گرفتند. سپس سه موش Balb/C نر به روش اخلاقی کشته شده و طبق روشی که قبلاً توضیح داده شد از طحال آن‌ها لکوسیت‌های تک هسته‌ای به عنوان سلول‌های پاسخ‌دهنده (Responder) جدا گردید. ۱۵۰ هزار سلول پاسخ‌دهنده به نسبت ۱:۲ با سلول‌های تحریک‌کننده (به ترتیب لکوسیت‌های طحال موش C57bl/6: لکوسیت‌های طحال موش Balb/C) در حجم ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت کامل [۱٪ PS، ۱۰٪ RPMI-1640، FBS] کشت یافتند. همچنین به عنوان کنترل مثبت ۱۵۰ هزار سلول لکوسیت طحال موش Balb/C نیز به صورت سه بار تکرار با سه میکرولیتر میتوزن [Phytohemagglutinin A (PHA), Sigma-Aldrich, USA] تحریک شدند. به عنوان کنترل تقسیم خودبه‌خودی (Background) تعداد برابر سلول‌های طحال موش Balb/C بدون هیچ‌گونه محرکی در سه چاهک دیگر همین پلیت کاشته شدند. همچنین به سلول‌های سه چاهک از گروه کنترل اشعه، سه میکرولیتر PHA اضافه گردید؛ در حالی که به سه چاهک دیگر تنها سه میکرولیتر محیط کشت اضافه شد و به عنوان کنترل تقسیم سلولی خودبه‌خودی برای سلول‌های اشعه دیده در نظر گرفته شدند.

پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط استاندارد کشت سلولی، تست MTT به روش ذکر شده در بالا برای هر گروه انجام شد و نتایج به صورت در صد OD گزارش گردید. پیش از لیز سلول‌ها با DMSO عکس‌های لازم از پلیت کشت تهیه شد.

### آنالیز آماری

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین بیان شده‌اند. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Prism- (version 8.0.1) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آزمون

حذف فایکول، سلول‌ها با محیط [Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640)] در حجم مناسب، ۲ مرتبه شستشو داده شدند (با سرعت ۴۵۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ گردید).

### کشت سلول در محیط فاقد سرم

تعداد  $3 \times 10^5$  از سلول‌های لکوسیت طحال موش C57bl/6 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای در محیط کشت کامل شامل RPMI-1640 (Biosera, France)، سرم گوساله ۱۰٪ [Fetal bovine serum (FBS), Gibco, USA]، پنی سیلین ۱/۱ سترپتوماای سین ۱٪ [Penicillin/Streptomycin (PS), Gibco, USA] و همین تعداد سلول در محیط کشت فاقد سرم گوساله [۱٪ RPMI-1640 + PS] به صورت سه بار تکرار برای هر نقطه‌ی زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، در شرایط استاندارد کشت سلول پستانداران (دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و ۹۵٪ هوا و ۵٪ دی اکسیدکربن) کشت داده شدند. جهت انجام پروتکل کشت در محیط فاقد سرم به مدت ۷۲ ساعت، روز اول (روز کاشتن سلول‌ها) سلول‌های سه چاهک پلیت در محیط کشت دارای سرم به عنوان کنترل و سلول‌های سه چاهک دیگر در محیط کشت فاقد سرم انکوبه شدند. در روز دوم کشت، به عنوان آغاز پروتکل ۴۸ ساعت کشت فاقد سرم، سلول‌ها از شش چاهک جمع‌آوری شدند و سلول‌های هر چاهک به یک میکروتیوب خاص خود منتقل و سانتیفریوژ شدند. سپس به سلول‌های سه میکروتیوب، محیط کشت دارای سرم و به سلول‌های میکروتیوب‌های دیگر، محیط کشت فاقد سرم اضافه گردید؛ سپس سلول‌ها به چاهک‌های اولیه خود اضافه شدند. برای نقطه‌ی زمانی ۲۴ ساعت نیز در روز سوم کشت این عمل تکرار گردید.

### بررسی بقاء سلولی (Viability)

۳۰۰ هزار سلول لکوسیت طحال موش C57bl/6 در پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به صورت سه بار تکرار در محیط کشت دارای سرم (گروه کنترل) و فاقد سرم، به شیوه‌ی فوق‌الذکر کشت داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول ۲، ۵- [(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Sigma-Aldrich, USA] به غلظت ۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵٪  $\text{CO}_2$  انکوبه گردید. پس از پایان انکوباسیون به هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر (DMSO) Dimethyl sulfoxide که حلال رنگ MTT است اضافه و به خوبی پیست گردید. جذب نوری پلیت‌ها توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و نتایج بر اساس

کشت در محیط فاقد سرم سبب کاهش معنی دار سطح آلوزنیسته‌ی سلول‌های ایمنی موش می‌گردد.

به منظور بررسی نقش استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم به عنوان یک ابزار تعدیل‌گر ایمنی از آزمایش MLR یک طرفه که یک مدل آزمایشگاهی پیوند می‌باشد؛ استفاده شد. در این مدل میزان تکثیر سلول‌های ایمنی پاسخ‌دهنده‌ی موش Balb/C در مجاورت سلول‌های ایمنی تک هسته‌ای موش C57bl/6 که در اثر تابش اشعه، قدرت تکثیر خود را از دست داده‌اند؛ به طور هم‌زمان کشت داده شدند و تکثیر سلولی توسط تست MTT سنجیده شد.

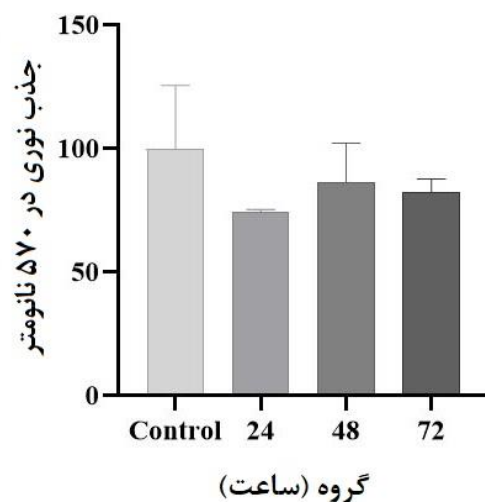
در مطالعه‌ی حاضر تابش اشعه به طور موثری توانسته است مانع تکثیر سلولی شود. زیرا که سلول‌های تحریک‌کننده در حضور میتوزن PHA نتوانستند رنگ MTT را احیا کنند. میانگین  $\pm$  انحراف جذب نوری سلول‌های تحریک‌کننده که تحت تابش قرار گرفته‌اند و توسط PHA تحریک شدند برابر با  $0.48 \pm 0.00$  بوده است. این مقدار برای سلول کنترل  $0.46 \pm 0.04$  بوده که از نظر آماری معنی دار نبوده است ( $P > 0.05$ ). تفاوتی از لحاظ مورفولوژی بین سلول‌های تحریک‌کننده (C57bl/6) چه در حضور PHA و چه در غیاب این میتوزن وجود ندارد (شکل ۲-الف). بنابراین در کشت مختلط لنفو سیتی تکثیر مشاهده شده تنها توسط سلول‌های پاسخ‌دهنده واسطه‌گری می‌شود. همان‌طور که در شکل ۲-ب می‌توان مشاهده کرد، در تمام نقاط زمانی مورد تحقیق این مطالعه، پاسخ سلول‌های ایمنی موش Balb/C به سلول‌های آلوزنی که در شرایط محیط فاقد سرم کشت یافته‌اند ضعیف‌تر از لنفوسیت‌هایی بوده است که با سلول‌های آلوزنی تحریک شدند که از قبل در مدت مشابه در محیط دارای سرم کشت یافته بودند. این اختلاف در نقاط زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت ( $P < 0.001$ ) بارزتر از نقطه زمانی ۲۴ ساعت ( $P < 0.01$ ) بوده است. جالب است بدانیم که در مقایسه با سلول‌های ایمنی پاسخ‌دهنده که هیچ‌گونه تحریک‌کننده‌ای (PHA و یا لنفوسیت‌های آلوزن) دریافت نکرده‌اند (Background)، سلول‌های تحریک شده با لنفوسیت‌های آلوزنی که از قبل به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم را تحمل کردند به طور معنی‌داری جذب کم‌تری در طول موج ۵۷۰ نانومتر داشتند. به ترتیب ( $P < 0.01$ )، ( $P < 0.001$ )، ( $P < 0.001$ ). به عبارت دیگر این سلول‌های استرس یافته آلوزنیک قادر بودند سلول‌های ایمنی پاسخ‌دهنده‌ی موش Balb/C را مهار کنند (شکل ۲-ب). یافته‌های مورفولوژی سلول‌های تحریک شده نیز به وضوح تاییدکننده‌ی نتایج کمی حاصل از آنالیز تست MTT در کشت مختلط

Kolmogorov-Smirnov برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده گردید. از آزمون T-test برای مقایسه‌ی میانگین‌ها بین دو گروه استفاده شد. نمودارها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism (version 8.0.1) رسم گردید.  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری آماری در نظر گرفته شد.

## نتایج

سلول‌های ایمنی موش C57bl/6 نسبت به استرس ناشی از فقدان سرم مقاوم می‌باشند.

غالباً در مطالعات تجربی پیوند مغز استخوان از موش‌های C57bl/6 به‌عنوان دهنده‌ی سلول‌های بنیادی مغز استخوان استفاده می‌شود. در این مطالعه اثر استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم بر بقای لکوسیت‌های طحال این موش مورد بررسی قرار گرفت تا برآوردی از میزان سلول‌های زنده باقی مانده پس از اتمام این نوع استرس انجام گردد. به این منظور از آزمایش MTT استفاده گردید. نتایج این تست نشان داد که میزان بقاء این سلول‌ها در ۴۸، ۷۲ و ۲۴ ساعت کشت در محیط فاقد سرم نسبت به کنترل، به ترتیب ۷۴٪، ۸۶٪ و ۸۲٪ می‌باشد که از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد ( $P > 0.05$ ) (شکل ۱). به عبارت دیگر در صد قابل توجهی از لکوسیت‌های طحال این موش نسبت به استرس ناشی از فقدان سرم مقاوم بوده‌اند. بنابراین سلول‌های کشت یافته در شرایط استرس فاقد سرم، قابلیت استفاده در مطالعات تعدیل ایمنی و یا پیوند مغز استخوان را دارا می‌باشند.

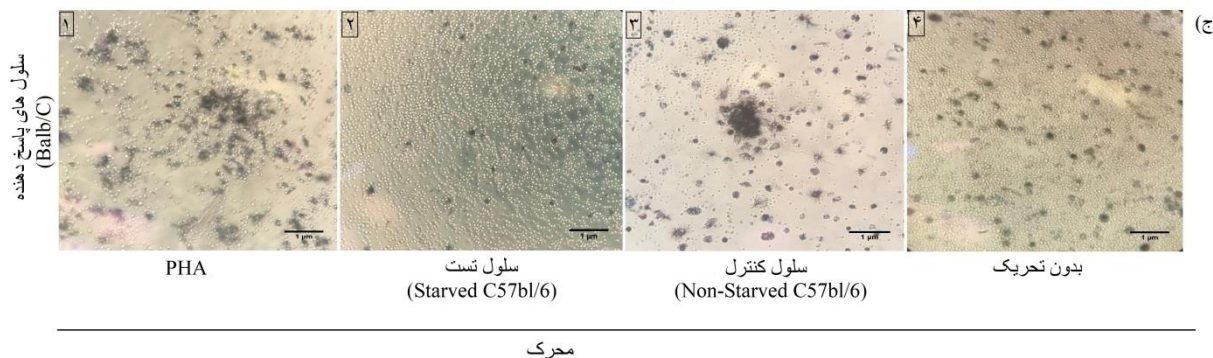
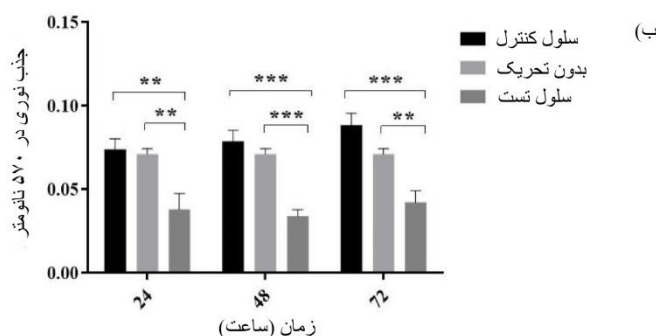
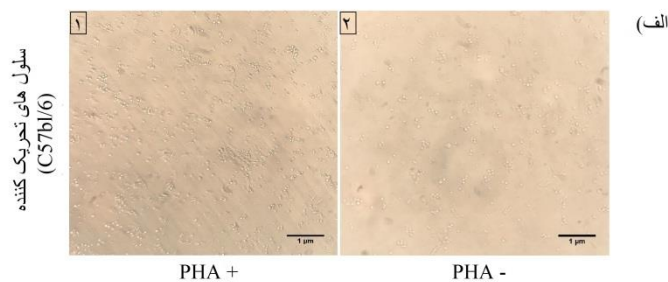


شکل ۱. نتایج تست MTT برای بررسی تفاوت در بقاء و متابولیسم سلول‌های کشت یافته در محیط فاقد سرم و دارای سرم. در مقایسه با سلول‌های کنترل درصد زنده بودن (viability) در سلول‌های تک هسته‌ای طحال موش Balb/C که استرس کشت در محیط فاقد سرم را به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تجربه کرده‌اند به ترتیب ۷۴٪، ۸۶٪ و ۸۲٪ می‌باشد که از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است ( $P > 0.05$ ).

کشت یافته‌اند (سلول‌های تست) فاقد این کریستال‌ها بوده و حتی شدت احیا رنگ MTT در آن‌ها ضعیف‌تر از سلول‌هایی بوده است که بدون هیچ‌گونه محرکی برای مدت مشابه‌ای با سلول‌های تست و کنترل کشت یافتند (Background) (شکل ۲-ج).

لنفوسیتی است. در حالی که لنفوسیت‌های پاسخ‌دهنده به سلول‌های آلورنی که در محیط کشت دارای سرم کشت یافته‌اند (سلول‌های کنترل)، مانند سلول تحریک شده با میتوزن PHA، آگرگاسیون سلولی تشکیل داده‌اند و کریستال‌های فورمازان به صورت فراوان در آن‌ها تشکیل شده است. لنفوسیت‌های تحریک شده با سلول‌های آلورنی که در محیط کشت فاقد سرم

### کشت مختلط لنفوسیتی



شکل ۲. نتایج کشت مختلط لنفوسیتی. الف) سلول‌های لکوسیت موش C57bl/6 به عنوان تحریک کننده پس از تابش اشعه به میزان ۳۰۰۰ راد، عدم توانایی تکثیر را در حضور محرک PHA (الف-۱) و عدم حضور آن (الف-۲) نشان دادند. ب) نتایج جذب نوری کشت مختلط لنفوسیتی یک طرفه در ۵۷۰ نانومتر نشان دهنده کاهش معنادار قدرت تحریک کنندگی سلول‌های کشت یافته در شرایط استرس فقدان سرم (تست) در مقابل سلول‌های کشت یافته در محیط دارای سرم (کنترل) در تمامی نقاط زمانی می‌باشد. این کاهش معنی‌دار در مقایسه با سلول‌های پاسخ دهنده بدون هیچ‌گونه تحریک، جالب توجه می‌باشد. ج) نتایج مورفولوژیک سلول‌های کشت یافته در محیط فاقد سرم نیز کاهش تولید کریستال‌های فورمازان را در مقایسه با دیگر گروه‌های کنترل، بدون تحریک و همراه با محرک PHA نشان می‌دهد. (n=9) و مقادیر ( $P > 0.05$ ) معنی‌دار در نظر گرفته شد و به صورت  $0.05 < (*) < 0.01 < (***) < 0.001$  نشان داده شده است.

کاربرد عملی این تکنیک در تنظیم واکنش‌های ایمنی قضاوت صحیحی تری داشته با شیم. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داده است که در مقایسه با سلول‌های کنترل، آلورنسیته سلول‌های ایمنی جدا شده از طحال موش در ۲۴ ساعت اول

### بحث و نتیجه‌گیری

هدف اصلی این مطالعه بررسی اثر استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم بر عملکرد سلول‌های ایمنی موش در کشت یک طرفه لنفوسیتی بوده است تا بتوانیم در رابطه با

کشت در محیط فاقد سرم به صورت معنی داری کاهش می یابد ( $P < 0.01$ ). این کاهش با پیشرفت زمان ادامه پیدا می کند و حتی این اختلاف بعد از ۴۸ ساعت کشت، معنی دارتر می شود ( $P < 0.001$ ) و پس از ۷۲ ساعت نیز این سطح از اختلاف معنی دار، حفظ می گردد ( $P < 0.001$ ). در این راستا، یافته های جالب توجه این است که نه تنها پاسخ لنفوسیت های آلوری اکتیو به سلول های کشت یافته در محیط فاقد سرم (سلول تست) نسبت به لنفوسیت های آلوری اکتیو که با سلول های کنترل تحریک شده اند کاهش یافته است، بلکه این پاسخ حتی کم تر از حالتی بوده است که این لنفوسیت ها با هیچ گونه محرکی تحریک نشده اند ( $P < 0.001$ ). یافته های مورفولوژیک نیز بر بررسی های کمی فوق صحنه می گذارند. این در حالی است که لنفوسیت های پاسخ دهنده ای که با سلول های کنترل کشت یافته اند، همانند سلول های تحریک شده با میتوزن PHA، تشکیل آگرگاسیون سلولی دادند که بر طبق گزارش موجود نشان دهنده تقسیم این سلول ها می باشد [۱۸].

در تحلیل کلی این نتایج دو نکته منطقی به نظر می رسد: نکته اول این است که در اثر کشت در محیط فاقد سرم، آلورنسیته سلول های کشته یافته کاهش می یابد. اما اگر فرض کنیم که آلورنسیته سلول ها حتی به صفر برسد نباید نتایج ضعیف تری را در آزمایش کشت مختلط نسبت به سلول های پاسخ دهنده ای که با هیچ محرکی فعال نشده اند بروز دهند. بنابراین اجباراً نکته دوم به این صورت مطرح می شود که کشت یافتن در شرایط فاقد سرم سبب مهار رشد و متابولیسم و حتی شاید موجب مرگ سلول های پاسخ دهنده می شود. با توجه به این که آزمایش کشت مختلط لنفوسیتی یک طرفه به عنوان مدلی برای بررسی های تجربی مرتبط با ایمنی شناسی پیوند تعریف می شود [۱۹] و آنتی ژن اصلی دخیل در فعال سازی لنفوسیت های آلوری اکتیو نیز MHC می باشد، احتمالاً در پاسخ به استرس متابولیک ناشی از عدم حضور فاکتورهای رشد سطح بیان این آنتی ژن در لنفوسیت ها پائین می آید. اگر بپذیریم سلول های پستانداران در پاسخ به استرس های مختلف از قبیل عدم وجود اسید آمینه، گلوکز و یا فاکتورهای رشد نوعی از پاسخ سازشی را بروز می دهند که به نام پاسخ استرس یک پارچه معروف است و در طی آن تولید پروتئین ها به طور کلی کاهش می یابد [۳، ۴]، فرض فوق منطقی به نظر می رسد. ما در تحقیق گذشته نشان دادیم که سلول های ایمنی جدا شده از خون انسان در شرایط استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم سطح پایین تری از بیان مولکول های MHC را نشان می دهند که مانند مطالعه حاضر سبب کاهش

تکثیر لنفوسیت های آلوری اکتیو شده است [۱۵]. در ارتباط با مهار و یا مرگ لنفوسیت های آلوری اکتیو باید گفت که نقاط واریسی (check points) مختلفی با نقش تنظیم کنندگی منفی سیستم ایمنی وجود دارند که یکی از مهم ترین آن ها نقطه واریسی [Programmed Death-1 (PD1)/Programmed Death Ligand-1 (PDL1)] می باشد [۲۰]. طبق دانش ما تاکنون این نقطه واریسی در لنفوسیت هایی که در شرایط استرس ناشی از فقدان سرم کشت یافته اند بررسی نشده است؛ اما شواهدی وجود دارد که احتمال فعال شدن این مسیر در شرایط ذکر شده را تقویت می کند. امروزه از کشت سلول تحت استرس ناشی از کمبود مواد غذایی به عنوان حالتی یاد می شود که در محیط تومور می تواند به وجود آید [۲۱]. در این شرایط بیان PD1/PDL1 در سطح لنفوسیت ها افزایش می یابد [۲۲]. تحقیقات پیش تری لازم است که هر دو فرضیه ی فوق را مورد آزمون قرار دهیم. از سوی دیگر در مطالعه حاضر بیش از دو سوم لنفوسیت ها در محیط فاقد سرم زنده مانده اند. به عبارت دیگر پس از کشت در محیط فاقد سرم، تعداد کافی سلول جهت تزریق به حیوان آزمایشگاهی برای بررسی های پیش تر در اختیار خواهیم داشت.

از محدودیت های تحقیق حاضر می توان به عدم بررسی مولکول های MHC بر سطح لنفوسیت های تحریک کننده و عدم بررسی مرگ سلولی در لنفوسیت های پاسخ دهنده در کشت مختلط لنفوسیتی اشاره داشت که احتیاج به تحقیق بیشتر در این زمینه است.

روی هم رفته، یافته های این تحقیق نشان داده است که استفاده از استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم می تواند ابزار مناسبی در تعدیل سیستم ایمنی جهت تنظیم واکنش های ناخواسته ای ایمنی باشد. تحقیقات پیش تری لازم است تا مکانیسم های پایه ای موثر در این تعدیل سیستم ایمنی از جمله نقش ISR در این زمینه را جستجو کنیم.

کشت در محیط فاقد سرم سلول های تک هسته ای طحال موش موجب کاهش قدرت تحریک کنندگی ایمنی این سلول ها در مدل آزمایشگاهی پیوند آلورنیک می شود. بنابراین می توان گفت این روش دارای پتانسیل تعدیل سیستم ایمنی، از جمله کنترل واکنش های ناخواسته ای ایمنی، در پیوند سلول های ایمنی و مغز استخوان می باشد. در آینده استفاده از مدل حیوانی موش می تواند کاربرد این تکنیک را در پیوند مغز استخوان روشن تر سازد.

histone modifications within its promoter locus. *PLoS One* 2012; 7: e50502.

[12] Chen M, Huang J, Yang X, Liu B, Zhang W, Huang L, et al. Serum starvation induced cell cycle synchronization facilitates human somatic cells reprogramming. *PLoS One* 2012; 7: e28203.

[13] Britain CM, Dorsett KA, Bellis SL. The glycosyltransferase ST6Gal-I protects tumor cells against serum growth factor withdrawal by enhancing survival signaling and proliferative potential. *J Biol Chem* 2017; 292: 4663-4673.

[14] Tian X, Huang B, Zhang XP, Lu M, Liu F, Onuchic JN, Wang W. Modeling the response of a tumor-suppressive network to mitogenic and oncogenic signals. *Proc Natl Acad Sci* 2017; 114: 5337-5342.

[15] Rahmani M, Khorasani HR, Golpour M, Shabestani Monfared A, Nattaj H, Abedian S, Mostafazadeh A. Stable down-regulation of HLA class-I by serum starvation in human PBMCs. *Iran J Immunol* 2016; 13: 54-63. (Persian).

[16] Rahmani M, Mohammadnia-Afrouzi M, Nouri HR, Fattahi S, Akhavan-Niaki H, Mostafazadeh A. Human PBMCs fight or flight response to starvation stress: Increased T-reg, FOXP3, and TGF- $\beta$ 1 with decreased miR-21 and Constant miR-181c levels. *Biomed. Pharmacother* 2018; 108: 1404-1411.

[17] Nami S, Aghebati-Maleki A, Babaloo Z, Aghebati-Maleki L. Effects of fasting on the immune system function and its positive effects on the chemotherapy of various types of cancer. *Koomesh* 2020; 22: 404-410. (Persian)

[18] Kandoi S, Patra B, Vidyasekar P, Sivanesan D, Vijayalakshmi S, Rajagopal K, Verma RS. Evaluation of platelet lysate as a substitute for FBS in explant and enzymatic isolation methods of human umbilical cord MSCs. *Sci Rep* 2018; 8: 1-12.

[19] Smith C, Miles JJ, Khanna R. Advances in direct T-cell alloreactivity: function, avidity, biophysics and structure. *Am J Transplant* 2012; 12: 15-26.

[20] Dong Y, Sun Q, Zhang X. PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 2171.

[21] Püschel F, Favaro F, Redondo-Pedraza J, Lucendo E, Iurlaro R, Marchetti S, et al. Starvation and antimetabolic therapy promote cytokine release and recruitment of immune cells. *Proc Natl Acad Sci* 2020; 117: 9932-9941.

[22] Zou MX, Peng AB, Lv GH, Wang XB, Li J, She XL, Jiang Y. Expression of programmed death-1 ligand (PD-L1) in tumor-infiltrating lymphocytes is associated with favorable spinal chordoma prognosis. *Am J Transl Res* 2016; 8: 3274.

## تشکر و قدردانی

از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی بابل به جهت تامین بودجه مورد نیاز این مطالعه تشکر به عمل می‌آید.

## منابع

[1] Dai H, Wang Y, Lu X, Han W. Chimeric antigen receptors modified T-cells for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108.

[2] Petersdorf EW. Role of major histocompatibility complex variation in graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation. *F1000Res* 2017; 6: 617.

[3] Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljujic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. *EMBO Rep* 2016; 17: 1374-1395.

[4] Costa-Mattoli M, Walter P. The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science* 2020; 80: 368.

[5] Klassen J. The role of photopheresis in the treatment of graft-versus-host disease. *Curr Oncol* 2010; 17: 55.

[6] Borzoueisileh S, Monfared AS, Abediankenari S, Mostafazadeh A. The assessment of cytotoxic T cell and natural killer cells activity in residents of high and ordinary background radiation areas of Ramsar-Iran. *J Med Phys Assoc Med Phys India* 2013; 38: 30.

[7] Borzoueisileh S, Monfared AS, Abediankenari S, Mostafazadeh A, Khosravifarsani M, Amiri M, Elahimanesh F. The comparison of CD4/CD8 ratio among high and ordinary background radiation areas in Ramsar, Iran. *Int J Low Radiat* 2011; 8: 329-337.

[8] Shin JT, Opalenik SR, Wehby JN, Mahesh VK, Jackson A, Tarantini F, et al. Serum-starvation induces the extracellular appearance of FGF-1. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Res* 1996; 1312: 27-38.

[9] Vasudevan S, Steitz JA. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 2007; 128: 1105-1118.

[10] González-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquère S, et al. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* 2005; 118: 3091-3102.

[11] Ni P, Xu H, Chen C, Wang J, Liu X, Hu Y, et al. Serum starvation induces DRAM expression in liver cancer cells via

## Effect of serum starvation stress on the mouse spleen mononuclear cells mixed culture: Introducing a new immunomodulatory method

Gilda Parsamanesh (M.Sc)<sup>†1</sup>, Maryam Mehri (M.Sc)<sup>†1</sup>, Mostafa sheikhzadeh (M.D)<sup>2</sup>, Seyyed Hossein Mousavie Anijdan (Ph.D)<sup>3,4</sup>, Amrollah Mostafazadeh (Ph.D)<sup>\*5</sup>

1- Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

2- Laboratory of Animal Care Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

3- Depat. of Radiation Technology, School of Allied Medical Sciences, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

4- Radiotherapy Center, Shahid Rajayee Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

5- Cellular and Molecular Biology Research Center, Research Institutes of Health, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

\* Corresponding author. +98 9111265105 amrolah65@yahoo.com

Received: 26 Dec 2019; Accepted: 24 Jun 2020

† Two authors contributed equally

**Introduction:** Bone marrow and immune cell transplants are a common method of treating some blood diseases around the world. However, due to the malfunction of the immune system, its use is not always effective. In this study, we evaluated the potential of culture stress in serum-free medium in regulating the immune system.

**Materials and Methods:** Spleen immune cells were isolated from Balb/C and C57bl/6 mice using the Ficol gradient method. C57bl/6 mice splenocytes were cultured in serum starved and non-starved conditions at indicated time points. Cell viability was determined by MTT assay. Then the allogenicity of these cells was determined by mixed lymphocytic culture (in vitro model of bone marrow transplantation) with Balb/C mouse splenocytes and cell proliferation was then examined using MTT method and necessary photographs were prepared too.

**Results:** The viability rate of starved immune cells after 72 h was 82.1% of the control group. After 24h, the allogenicity of these cells decreased significantly compared to the control cells ( $P<0.01$ ). This decrease was more pronounced at 48h and 72 h ( $P<0.0001$ ). Even the response of Balb/C lymphocytes to stressed cells was less than that of background control, ( $P<0.0001$ ). Morphological findings clearly confirm this reduction.

**Conclusion:** Serum starvation induced-stress decrease allogenicity and modulates immune cells allo-reactivity. In the future, the use of mouse model could shed light on the application of this technique in bone marrow transplantation.

**Keywords:** Transplantation, Cell culture Technique, Mouse, Immunoregulation.