از کشت شبانه کاهش یافته (۲۴) و می‌توان از موادگرادیان ساز مانند متریزامایدو نایکودنز برای جداسازی DCs استفاده نمود .تحقیقات انجام گرفته با استفاده از این روش، خلوص ۷۸-۲درصد با متریزامایدو (۲۵) و خلوص حدود ۲۰درصد بانایکودنز را گزارش می‌کنند (۱۹). در این روشها نیز DCs جدا شده از لحاظ ماهیت و عملکرد باDCs اولیه تفاوت دارند زیرا همانند روش Adherence depletion سلولهای دندریتیک به علت کشت شبانه بالغ شده وخاصیت دست نخوردهٔ خود را از دست می‌دهد. در عین حال چون دانسیتی زیر گروهها و به خصوص پیشسازهایDCs به صورت یکسان کاهش نمی‌یابند، DCs جدا شده نمایندهٔ همهٔ زیر گروههای DCs نخواهند بود (۱۸). علاوه بر این شواهدی مبنی بر القا تغییرات فنوتیپی و عملکردی در DCs به علت تماس با مواد گرادیان ساز مانند متریزامایدو وجود دارد (۲۰).

از جمله روشهایRemoval of contaminating cells می‌توان از روش panning نام برد. در این روش سلولهای غیر چسبندهٔ حاصل از کشت شبانهٔ MNC که واجد گیرندهٔ FC یا ایمنوگلبولین سطحی هستند با اتصال به پلیت پوشیده از Ig یا anti-Ig حذف می‌شوند (۲۶). مشکل این روش همانند روش‌های قبلی، دستکاری شدن سلول در اثر کشت شبانه و وجود گزارشاتی مبنی بر بروز $FCR_{\gamma}I,FCR_{\gamma}II$ به مقدار کم برروی تعدادی از سلولهایDC است. براساس این گزارشات روش Panning سبب حذف این دسته از DCs خواهند شد (۱۸). خلوص به دست آمده با این روش در حدود ۲۷-۹درصد گزارش شده است (۲۰).

روش Immunomagnetic depletion روش مناسبی برای جداسازی DCs تازه از خون محیطی است .این روش در مقایسه با روشهای کلاسیک جداسازی DC که از کشت in vitro ، مواد گرادیان ساز و panning استفاده می‌شود، منجر به حذف زیرگروه خاصی از DCs و القا بلوغ در آنها نشده، نیاز به وقت کمتری داشته، ساده‌تر بوده و در عین حال چون DCs بدون کشت قبلی و با روش انتخاب منفی جدا می‌شوند با مواد تغییر دهندهٔ فنوتیپ و عملکرد تماس نداشته و دستکاری نمی‌شوند. DCs جدا شده در این تحقیق، در طی مسیر غنی سازی بالغ و فعال نشده، از لحاظ اندازه در حد لنفوسیت متوسط و فاقد زایده بوده، در عین حال میزان ابراز HLA-DR بر آن زیاد نبوده (۲۰) و نمایندهٔ PBDCs واقعی می‌باشد.

متوسط خلوص به دست آمده در این تحقیق، مشابه مطالعات مشابه خارجی است. در مطالعاتی که Livingstone و همکاران که از روش مشابه استفاده نموده‌اند (خلوص ۵۳درصد) (۲۷) و Fearnely و همکاران (خلوص ۸۰-۳۰درصد) (۲۸) گزارش شده است و در تحقیق حاضر میزان خلوص حدود ۶۰درصد می‌باشد.

از این جهت روش به کار رفته در این تحقیق، روشی مناسب جهت جداسازی نمودن DC تازه بوده که با غنی‌سازی مناسب DCs زمینه را برای انجام مطالعات مختلف در مورد سلولهای دندریتیک و در پاسخهای ایمنی وهمچنین کاربرد کلینیکی آنها را فراهم می‌نماید. سلولهای دندریتیک امروزه به عنوان عامل بسیار مهم در واکسیناسیون علیه سرطانها (۲۹)، میکروارگانیسمهای عفونی (۳۰، ۳۱)، درمان عفونت HIV (۱۷) و خود ایمنی مطرح می‌باشد. جای خالی تحقیقات در این زمینه در کشور ما بارز بوده و Immunomagentic depletion روشی مناسب جهت تأمین DCs در تحقیقات آینده خواهد بود.

تقدیر و تشکر

تحقیق فوق بخشی از طرح تحقیقاتی مشترک بین سازمان انتقال خون ایران - مرکزتحقیقات، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد، که لازم است از همکاری سازمانهای فوق در تأمین منابع مالی و پشتیبانی طرح تشکر و قدردانی شود.

References

1. Steinman RM: Dendritic cells. In “Fundamental Immunology” (Paul WE ed.), 4th ed, Lippincott-Raven, Philadelphia,1999; 547-574

2. Robinson SP: Identification and immunophenotypic analysis of peripheral blood dendritic cells. In “Dendritic cell protocols” (Robinson SP and stagg AJ eds.) 1. Humana press, New Jersey, 2002; 111-199

3. Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P: Langerhans cells-dendritic cells of the epidermis. APMIS. 2003; 111(7-8): 725-740

4. Hart DNJ: Dendritic cells and their emerging clinical applications. Pathol. 2001; 33: 479-492

5. Strobl H, Scheinecker C, Riedl E,Csmaritis B,Bello-Fernandez C, Pickl WF, Majdic O, Knapp W: Identification of $CD68^{+}$ in peripheral blood cells with dendritic precursor charcteristics. J Immunol. 1998; 161(2);740-748

6. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, ebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Paluka K: Immunobiology of dendritic cells. Ann Rew Immunol. 2000; 18: 767-811

7. Thomas R, Lipsk PE: Human peripheral blood dendritic cell subsets. J. Immunol. 1994; 153: 4016-4028

8. Yrlid U, Macpherson G: Phenotype and function of rat dendritic cell subsets. APMIS. 2003; 111(7-8):756-765

9. Kuwana M: Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. Hum Immunol. 2002; 63(12): 1156-1163
10. Vieweg J, Dannull J: Tumor vaccines: from gene therapy to dendritic cells-the emerging frontier. Urol Clin North Am. 2003; 30(3); 633-643
11. Svane IM, Soot ML, Buus S, Johnsen HE: Clinical application of dendritic cells in cancer vaccination therapy. APMIS. 2003; 111(7-8): 818-834
12. Cho HJ, Bhardwaj N: Against the self: dendritic cells versus cancer. APMIS. 2003; 111(7-8): 805-817
13. Bubnoff DV, Koch S, Bieber T: Dendritic cells and atopic eczema / dermatitis syndrome. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2003; 3(5): 353-358
14. Kavanaugh A: An overview of immunomodulatory intervention in rheumatoid artheritis. Drugs Today. 1999; 35(4-5): 275-286
15. Kolb-Maurer A, Kurzai O, Goebel W, Frosch M: The role of human dendritic cells in meningococcal and listerial meningitis. Int J Med Microbiol. 2003; 293(4): 41-249
16. Buentke E, Scheynius A: Dendritic cells and fungi. APMIS. 2003; 111(7-8): 789-796
17. Lore K, Larsson M: The role of dendritic cells in the pathogenesis of HIV-1 infection. APMIS. 2003; 111(7-8): 776-788
18. William LA, Egner W, Hart DNJ: Isolation and funtion of human dendritic cells. Int Reu Cytol. 1994; 153; 41-101
19. McLellan AD, Starling GC, Hart DNJ: Isolation of human blood dendritic cells by discontinuous nycodenz gradient centrifugation. J. Immunol. Methods. 1995; 81: 184-189
20. O'Doherty U, Steinman RM, Peng M, Cameron PU, Gezelter S, Kopeloff I, Swiggard WJ, Pope M, Bhardwaj N: Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. J Exp Med. 1993; 17(3): 67-1078
21. McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DNJ: Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule Eur JImmunol. 1995; 25: 2064-2068
22. Loken MR, Green CL, Wells DA: Immunofluorescence of surface markers. In:"Flow Cytometry-A Practical Approach (Ormerod MG ed.) 3th ed, 2000; 61-82
23. Van Voorhis WC, Hair LS, Steinman RM, Kaplan G: Human dendritic cells. Enrichment and characterisation of human peripheral blood dendritic cells. J Exp Med. 1982; 155: 1172-1182
24. Xu H, Friedrichs U, Gieseler RK, Ruppert J, Ocklind G, Peters JH: Huamn blood dendritic cells exhibit a distinct T-cell stimulating mechanism and differentiation pattern. Scand J Immunol. 1992; 36: 689-696
25. Knight SC, Farrant J, Bryant A, Edwards AJ, Burman S, Lever A, Clarke J, Webster AD: Nonadherent, low density cells from human peripheral blood contain dendritic cells and monocyte, both with veiled morphology. Immunology, 1986; 5: 595-603
26. Brooks CF, Moore M: Differential MHC Class II expression on human peripheral blood monocytes and dendritic cells. Immunology 1988; 63: 303-311
27. Livingstone WJ, Moore M, Innes D, Bells JE, Simmonds P: Frequent infection of peripheral blood CD8 positive T-Lyphocytes with HIV-1. Lancet 1996; 348; 649-654
28. Fearnley DB, McLellan AD, Mannering SI, Hock BD, Hart DN: Isolation of human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal Antibody: Implications for studies on Antigen-presenting cell function and Immunotherapy. Blood 1997; 89(10): 3708-3716
29. Tatsumi T, Storkus WJ: Dendritic cell-based vaccines and therapies for cancer. Expert Opin Biol Ther. 2002; 2(8): 919-928
30. Sundquist M, Johansson C, Wick MJ: Dendritic cells as inducers of antimicrobial immunity in vivo, APMIS. 2003; 111(7-8): 715-724
31. Carbone FR, Heath WR: The role of dendritic cell subsets in immunity to viruses. Curr Opin Immunol. 2003; 15(4): 416-420

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

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 سانترفیوژ 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

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 ml / $۱۰^۶$×۲ 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 <۰/۰۵) 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

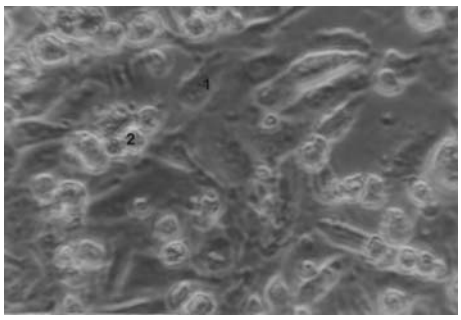
تکثیر CFU-C حاصل از سلولهای غیرچسبان محیط کشت LTBM در محیط نیمه جامد آگار

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

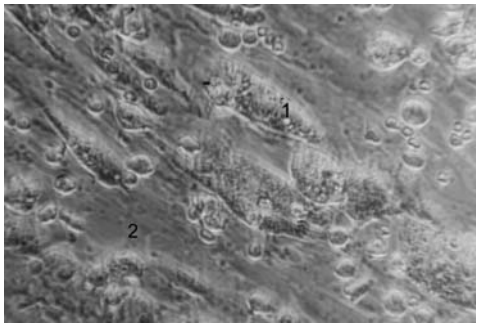
گـرانـولوسیت- مـنوسیت حـاصل از سـلولهای غـیرچسبان نـمونه مغزاستخوان کشت داده شده در محیط نیمه جامد آگار است.

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



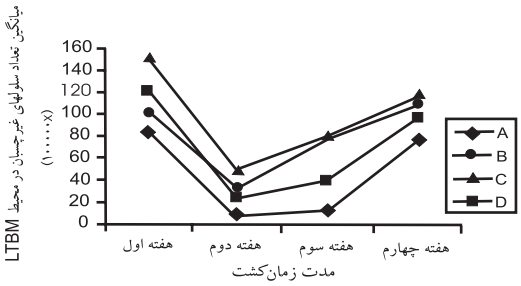
شکل ۱ الف: تشکیل لایه Feeder و چسبیدن سلولهای مغزاستخوان به لایه Feeder در هفته دوم LTBMC



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

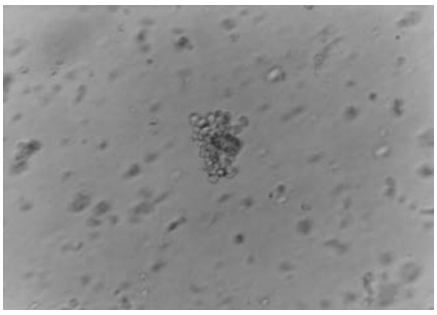
تکثیر کلنی‌ها در هرمحیط کشت برای ۶ نمونه به طور جداگانه محاسبه شده و برای مقایسه محیط های مختلف جهت توزیع نرمال از آزمون مستقل **t-test** استفاده شدو میزان (**P** <۰/۰۵) به عنوان معنی‌دار بودن تست در نظر گرفته شد.معنی دار بودن تحریک سلولهای خونی از طریق مقایسه با نمونه کنترل تحریک‌نشده و مقایسه محیط‌های تحریک شده با یکدیگر انجام شد.

باتوجه به جدول افزایش قابل قبول تعداد کلنی‌ها در محیط به علت فاکتورهای رشد و CyA می‌باشدکه جهت نشان‌دادن تکثیر سلولهای تشکیل دهنده کلنی خونساز از آزمون مستقل t-test استفاده شد 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



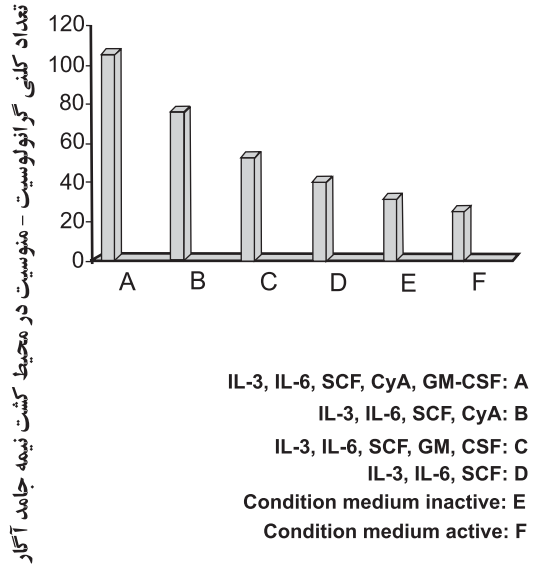
شکل ۲ –الف: تشکیل کلنی خونساز گرانولست –منوسیت پس از ۱۴ روز در محیط نیمه‌جامد آگار

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	۱۲/۲±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) نسبت به PHA-LCM (Active) بیان‌کننده مهار فاکتورهای مهارکننده رشد کلنی خونساز در HA-LCM(Inactive) و همچنین افزایش کلنی‌های خونساز در محیط حاوی IL-3,IL-6,SCF ,GM-CSF نسبت به محیط حاوی IL-3,IL-6,SCF,Cy A و افزایش کلنی در محیط حاوی IL-3,IL-6,SCF,Cy A نسبت 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.



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

تعداد سلول در هر پلیت محیط کشت نیمه‌جامد آگار $10^5 \times 1$ 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 باکشتهای 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

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