مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۶، شماره ۴، تیر ۱۳۹۸ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی اثر مایع آمنیوتیک انسانی بر بقا و تکثیر رده‌های سلولی میلومای انسانی RPMI8226 و U266 در مقایسه با سرم جنین گاوی

فاطمه مجتهدی: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

رضا منصوری: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

سعید آبرون: گروه خون شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (*نویسنده مسئول) abroun@modares.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: بیماری مالتیپل میلوما یک بدخیمی مربوط به پلاسماسل می‌باشد. از آنجا که مطالعه‌ی مکانیسم‌های بیماری‌زایی و مسیرهای پیام رسان دخیل در سلول‌های عامل ایجاد بیماری در محیط آزمایشگاهی و نزدیک به محیط فیزیولوژیک بدن مهم می‌باشد؛ بنابراین بهترین محیط برای مطالعه‌ی سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی، محیطی با بیشترین شباهت به محیط فیزیولوژیک بدن می‌باشد. این در حالی است که استفاده از سرم جنین گاوی (FBS) به عنوان مکمل رشد سلول‌ها در فرآیند کشت سلولی بسیار رایج می‌باشد؛ بنابراین هدف این مطالعه تاثیر مایع آمنیوتیک در تکثیر (Ki-67 و Cyclin-D) و بقاء (Bax و Bcl2) دو رده میلومایی RPMI8226 و U266 در مقایسه با سرم جنین گاوی می‌باشد.

روش کار: مایع آمنیوتیک انسانی از ۶ خانم باردار در حین عمل سزارین و بصورت استریل جمع‌آوری شد. پس از کشت رده‌های سلولی میلوما (RPMI8226 و U266)، تیمار رده‌های سلولی در چهار گروه با نسبت‌های متفاوت مایع آمنیوتیک انجام شد. ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از تیمار، شمارش سلولی و بررسی حیات سلول‌ها با استفاده تریپان بلو و لام نئوبار انجام گرفت. هم چنین تست MTT جهت بررسی زنده‌مانی سلول‌های میلومایی تیمار شده انجام گرفت و در نهایت میزان بیان ژن‌های Ki67، Cyclin-D1، Bax و Bcl-2 توسط تکنیک Real time PCR و به روش SYBR Green مورد ارزیابی واقع شد.

یافته‌ها: بررسی میزان بیان ژن‌های دخیل در فرآیند تکثیر و آپوپتوز سلولی نشان داد که در گروه‌های مورد مطالعه تحت تیمار با مایع آمنیوتیک، افزایش معنادار بیان ژن های Ki-67، Cyclin-D1 و همچنین افزایش بیان ژن آنتی آپوپتوتیک bcl-2 و در مقابل کاهش معنادار بیان ژن مسئول آپوپتوز، Bax مشاهده شد. داده‌های ما نشان می‌دهد مایع آمنیوتیک به عنوان یک منبع مغذی می‌تواند رشد و تکثیر سلول ها را تا ۹۶ ساعت به صورت معناداری نسبت به سرم جنین گاوی افزایش دهد، هرچند که میزان تکثیر و بقای سلولی در ۴۸ ساعت نسبت به ۹۶ ساعت پس از کشت بیشتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بنا بر یافته‌های این مطالعه می‌توان از مایع آمنیوتیک به عنوان حامی رشد به عنوان جایگزینی برای سرم جنین گاوی تا ۹۶ ساعت استفاده نمود. در این مطالعه تاثیر این مایع بر دو رده سلولی میلومایی ارزیابی گردید که به نظر می‌رسد بهتر است برای نتیجه‌گیری جامع‌تر در این مورد بر سلول‌های دیگر نیز مورد آزمون واقع شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

مالتیپل میلوما،

مایع آمنیوتیک،

سرم جنین گاوی

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۲۳

شیوه استناد به این مقاله:

Mojtahedi F, Mansouri R, Abroun S. The effect of human amniotic fluid on the survival and proliferation of human myeloma cell lines RPMI8226 and U266 in comparison with the fetal bovine serum. Razi J Med Sci. 2019;26(4):54-69.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 1.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

Razi Journal of Medical Sciences.2019;26(4):54-69. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

The effect of human amniotic fluid on the survival and proliferation of human myeloma cell lines RPMI8226 and U266 in comparison with the fetal bovine serum

Madineh Fatemeh Mojtahedi, Department of Immunology, Shahid Sadoughi Yazd University of Medical Sciences, Yazd, Iran
Reza Mansouri, Department of Immunology, Shahid Sadoughi Yazd University of Medical Sciences, Yazd, Iran
Saeed Abroun, Department of Hematology, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran (*Corresponding author) Abroun@modares.ac.ir

Abstract

Background: Multiple Myeloma is a Plasma Cell Malignancy. Since the study of pathogenicity mechanisms and messenger pathways involved in the causative agent cells is important in the laboratory environment and close to the physiological environment of the body, therefore, the best environment for the study of cells in the laboratory environment, an environment most closely resembling the physiological environment of the body. However, the use of fetal bovine serum (FBS) as a supplement to the growth of cells in the cell culture process is very common. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of amniotic fluid on proliferation (Ki-67 and Cyclin-D) and survival (Bax and Bcl2) of both RPMI8226 and U266 Myeloma in comparison with fetal bovine serum.
Methods: Human amniotic fluid was collected from 6 pregnant women during cesarean section and sterilized. After cultivating myeloma cells (RPMI8226 and U266), cell line treatments were performed in four groups with different amniotic fluid ratios. 48 and 96 hours after treatment, cell count and cell survival were evaluated using trypan blue and neobar lam. MTT test was also used to assess the survival of the treated Myeloma cells. Finally, Ki67, Cyclin-D1, Bax and Bcl-2 genes were evaluated by Real Time PCR and SYBR Green.
Results: Evaluation of the expression of the genes involved in the process of cell proliferation and apoptosis showed that the amniotic fluid treated groups significantly increased the expression of Ki-67, Cyclin-D1 genes and also increased the anti-apoptotic gene expression of bcl 2, and a significant decrease in expression of the gene responsible for apoptosis, Bax was observed. Our data suggest that amniotic fluid as a nutrient source can increase cell growth and proliferation up to 96 hours significantly in comparison with that of fetal bovine serum, although cell proliferation and cell survival in 48 hours than 96 hours of more cultivation.
Conclusion: Based on the findings of this study, ammonia fluid can be used as a supporter of growth as a replacement for bovine serum for up to 96 hours. In this study, the effect of this fluid on the two cell lines of myeloma was evaluated, which seems to be better tested for more comprehensive conclusions in this regard on other cells.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Keywords
Multiple myeloma,
Amniotic fluid,
Bovine serum

Received: 13/12/2018
Accepted: 11/04/2019

Cite this article as:
Mojtahedi F, Mansouri R, Abroun S. The effect of human amniotic fluid on the survival and proliferation of human myeloma cell lines RPMI8226 and U266 in comparison with the fetal bovine serum. Razi J Med Sci. 2019;26(4):54-69.

This work is published under CC BY-NC-SA 1.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

مقدمه

مالتیپل میلوما، به بدخیمی لنفوسیت‌های B تمایز یافته (پلاسماسل) گفته می‌شود و در نتیجه‌ی تکثیر غیرطبیعی پلاسماسل‌های یک کلون منفرد ایجاد می‌گردد. این بدخیمی دومین سرطان خون شایع پس از لنفوم غیر هوچکین و با شیوع ۶ تا ۷ مورد در هر ۱۰۰/۰۰۰ بزرگسال می‌باشد. این بیماری یک درصد تمام بدخیمی‌ها و ده درصد موارد بدخیمی‌های خونی را شامل می‌شود شایع ترین علائم و عارضه های این بیماری عبارتند از: ضعف، آنمی، درد یا شکستگی استخوان و نارسایی کلیه؛ از طرفی اختلال شدید در سیستم ایمنی افراد مبتلا به مالتیپل میلوما و سرکوب سیستم ایمنی هومورال و سلولار، افراد را مستعد نقص ایمنی و در نتیجه ابتلا به انواع عفونت های مکرر می‌کند (۱). بقا، رشد و تمایز پلاسماسل‌ها بستگی به شرایط ریز محیط مغز استخوان دارد. واکنش‌های متقابل مثبت و منفی که میان پلاسماسل‌ها و سلول‌های استرومال مغز استخوان ایجاد می‌شود از طریق سایتوکاین‌ها، گیرنده‌ها و مولکول‌های چسبندگی گوناگونی صورت می‌گیرد که برخی از آنها عبارت اند از: IL-6، VEGF، TNF (۲).

در زمینه ی پاتوبیولوژی سرطان، با کمک مدل های مختلف آزمایشگاهی از جمله رده های سلولی مطالعات متنوع امکان پذیر شده اند. رده های سلولی جمعیتی از سلول ها با توانایی بالقوه در رشد و تکثیر مستمر در محیط های کشت دارند (۱۷). اغلب محیط های کشت سلولی خودشان به تنهائی نمی توانند شرایط رشد سلول را به طور کامل فراهم کنند، بنابراین افزودن سرم حیوانات در تهیه محیط های کشت سلول امر معمولی است که مدتها است صورت می گیرد. از عملکرد های اصلی محیط های کشت سلول حفظ و نگهداری pH و اسمولاریته لازم برای حیات سلول و فراهم آوردن نیازهای غذایی و انرژی لازم برای رشد و تکثیر سلول است. به منظور کسب نتایج بهتر، موفقیت در کشت و تکثیر سلول ها و شبیه سازی محیط درون بدن (In vivo) گونه‌های مختلف جانوران، سالهاست که انواع سرم‌های جانوری به ویژه سرم گوساله (Calf Serum-CS) و جنین آن (Fetal Bovine Serum-FBS) برای کشت و تکثیر رده های مختلف سلول در شرایط in-vitro به عنوان مکمّلی غنی کننده و سرشار از مواد مغذّی به همراه محیط های متنوع کشت سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند. به دلیل آنکه استفاده از FBS می تواند دارای مشکلات اخلاقی، بهداشتی یا اقتصادی مختلفی باشد، استفاده از ترکیبات طبیعی و انسانی جایگزین آن می تواند سودمند باشد.

مایع آمنیوتیک (Amniotic Fluid)، ترکیبی پیچیده، حیرت‌آور و دینامیک بوده و در داخل فضایی به نام کیسه‌ی آمنیون که کمی پس از لانه‌گزینی و حتی قبل از قابل تشخیص بودن جنین ایجاد می‌شود، قرار دارد. این مایع علاوه بر دارا بودن اثرات آنتی‌میکروبیال، محتوی مواد مغذی و فاکتورهای رشد متعددی است که از رشد جنین انسان حمایت می کند. حجم کلی آن در اواخر بارداری به ۵۰۰-۲۵۰۰ میلی‌لیتر می‌رسد و در کیسه‌ی غشایی به‌نام حفره‌ی آمنیون که از غشایی به همین نام محصور شده است، جای داشته و اطراف جنین را احاطه می‌کند. مطالعات نشان می‌دهند که فاکتورهای رشد یافت شده در مایع آمنیوتیک که نقش مهمی در رشد و تکامل جنین انسان بازی می‌کند، با فاکتورهای موجود در شیر انسان قابل مقایسه است (۳). از آنجا که برخی تفاوت‌ها در نتایج ممکن است ناشی از تفاوت در محیط های آزمایشگاهی باشد بنابراین در این مطالعه تاثیر مایع آمنیوتیک در تکثیر (*Ki-67* و *Cyclin-D*) و بقاء (*Bax* و *Bcl2*) دو رده میلومایی RPMI8226 و U266 در مقایسه با سرم جنین گاوی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار

تهیه مایع آمنیوتیک: برای جمع آوری نمونه های مایع آمنیوتیک در سال ۱۳۹۶ به بخش زنان و زایمان بیمارستان‌های امام خمینی (ره) و بهمن مراجعه شد. نمونه‌ی مایع آمنیوتیک از هفت خانم باردار بدون سابقه‌ی ابتلا به بیماری خاص و عفونت و از هرکدام به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

میزان ۲۰ میلی لیتر تهیه شد. پیش از تهیه نمونه ها روش کار توسط کمیته اخلاق دانشگاه شهید صدوقی یزد تأیید شد و کد اخلاق IR.SSU.MEDICINE.REC.1396.140 نمونه‌ها به صورت استریل و در لوله های فالکون توسط زنجیره ی سرد به دانشگاه منتقل شدند. به منظور جداسازی سلول ها، نمونه ها به مدت ۱ ساعت در دور 12000g و در دمای 4° C سانتریفوژ شدند. پس از جداسازی مایع رویی در زیر هود لامینار و با حفظ شرایط استریل نمونه ها توسط فیلتر ۰,۲۲ استریل شده و سپس به نسبت مساوی مخلوط و الیکوت شده و در دمای ۷۰ ° C – نگه داری شدند. از هفت نمونه ی تهیه شده یکی از نمونه ها به دلیل داشتن رنگی تیره تر نسبت به سایر نمونه ها و نیز رسوب تیره پس از سانتریفیوژ به دلیل احتمال آلودگی به مکونیوم کنار گذاشته شد و از آزمایش حذف گردید.

رده های سلولی میلومایی: در این مطالعه، دو رده ی سلولی میلومایی (U-266 و RPMI8226) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران-تهران خریداری شد. جهت تایید رده های سلولی خریداری شده از روش فلوسایتومتری و بررسی شاخص های CD38 و CD138 که برای پلاسماسل اختصاصی هستند، استفاده شد (CD38+، CD138+ و CD19-).

فلوسایتومتری: روش آماده سازی سلولها جهت قرائت در دستگاه فلوسیتومتری بدین شرح بود. 5×10^4 سلول شمارش شده و با PBS مورد شستشو قرار گرفت. سپس سلول‌ها در 100µl از 3% BSA معلق شدند. در ادامه میزان 5µl از آنتی بادی اولیه anti-CD38,anti-CD138,anti-CD19) ISO antibody) به آن ها اضافه شد. به دنبال ۳۰ تا ۴۵ دقیقه انکوباسیون در یخچال با 1میلی لیترPBS سرد شسته شد و تجمع سلولی در 100µlاز 3% BSA معلق شد.

کشت رده های سلولی میلومایی: پس از تهیه این رده های سلولی، این سلول ها در فلاسک های $25cm^2$ در حضور محیط کشت RPMI1640 که حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) بود، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵٪ دی اکسید کربن و ۹۵٪ رطوبت به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از گذشت زمان ذکر شده، تمام محتویات فلاسک ها به لوله های فالکون ۵۰ میلی لیتری استریل منتقل شد و با سرعت 300 g به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شد، مایع رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی به دست آمده در ۱ میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 مخلوط گشت و سپس درصد سلول های زنده با استفاده از محلول تریپان بلو و لام نئوبار تعیین گردید و زمانی که این مقدار بیشتر از ۹۵٪ بود، این سلول ها برای ادامه ی مطالعه و تیمار با مایع آمنیوتیک مورد استفاده قرار گرفتند.

طراحی مطالعه از نظر میزان دوز و نقاط زمان بررسی: پس از انجام تست های پایلوت و ارزیابی دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد از آمنیوتیک و ارزیابی میزان رشد سلولی طی روزهای، ۱، ۲، ۳ و ۶ و مشاهده نتایج، مبنای طراحی را بر استفاده از مایع آمنیوتیک ۱۰ و ۲۰ درصد و نقاط زمانی ارزیابی را ۴۸ و ۹۶ ساعت قرار دادیم. بنابراین طراحی شرایط سلول‌ها به شرح ذیل می باشد: گروه G1-کنترل منفی: رده های سلولی میلومایی که به مدت ۴۸ و ۹۶ ساعت در شرایط کشت با محیط RPMI-1640 قرار داشتند و هیچ گونه سرمی به آن ها اضافه نشد. گروه G2-کنترل مثبت: رده های سلولی میلومایی که به مدت ۴۸و ۹۶ ساعت در شرایط کشت با RPMI-1640 به همراه FBS10% قرار داشتند. گروه G3-تحت مطالعه: رده های سلولی میلومایی که به مدت ۴۸و ۹۶ ساعت در شرایط کشت با RPMI-1640 به همراه FBS10% و مایع آمنیوتیک 10% قرار گرفتند. گروه G4-تحت مطالعه: رده‌های سلولی میلومایی که به مدت ۴۸و ۹۶ ساعت در شرایط کشت با RPMI-1640 به همراه ۲۰٪Amniotic Fluid قرار گرفتند. گروه های مورد مطالعه و نحوه ی تیمار رده های سلولی با مایع آمنیوتیک در جدول ۱ به طور خلاصه آورده شده است.

ارزیابی حیات سلولی با روش MTT: پیش از آن شمارش تام و تعیین درصد سلول های زنده با استفاده از محلول تریپان بلو به روش Trypan Blue Dye Exclusion انجام شد. روش MTT یک روش رنگ سنجی است که بر مبنای توانایی سلول های زنده در احیای نمک تترازولیوم بروماید و تبدیل آن به رسوب فورمازان می باشد. در این تست، تبدیل رنگ از زرد به بنفش اساس تمایز سلول های زنده و مرده می باشد و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

جدول ۱- گروه‌های مورد مطالعه و نحوه‌ی تیمار رده‌های سلولی با مایع آمنیوتیک در جدول ۱ به طور خلاصه آورده شده است.

	گروه G1 (کنترل منفی)	گروه G2 (کنترل مثبت)	گروهG3	گروه G4
۴۸ ساعت	RPMI1640	RPMI1640+FBS10%	RPMI1640+%10FBS+ 10%AF	RMPI1640+20%AF
۹۶ ساعت	RPMI1640	RPMI1640+FBS10%	RPMI1640+%10FBS+ 10%AF	RMPI1640+20%AF

مقدار دانسیته نوری (Optical Density) در هر چاهک نشانگر میزان این تبدیل رنگ ناشی از فعالیت دهیدروژناز میتوکندریایی می باشد. پس از کشت سلول ها در محیط های مورد نظر، هریک از نمونه ها به میکروپلیت استریل ۹۶ خانه ای ته گرد انتقال یافته و به مدت ۴۸ و ۹۶ ساعت در انکوباتور مرطوب حاوی 5% Co2 و دمای 37◦C کشت داده شدند. به منظور کنترل تکرارپذیری آزمون، ۴ چاهک برای هر گروه مورد مطالعه در نظر گرفته شد. پس از طی شدن زمان‌های مذکور، به میزان ۱۰ میکرولیتر محلول MTT به هر یک از چاهک ها اضافه شد. پلیت به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و با استفاده از پوشش فویل در تاریکی کامل در انکوباتور قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان مذکور، پلیت به مدت ۱۰ دقیقه و با دور g 400 سانتریفیوژ شد. سپس محیط رویی در هر چاهک با دقت بالا خارج شد و میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO جایگزین آن گردید. پلیت پس از پوشانده شدن مجدد با فویل به مدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شد و در نهایت جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه خوانش الایزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید.

Real Time PCR: در این مطالعه RNA تام به کمک TRIzol بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. به منظور ارزیابی کنترل کیفی RNA استخراج شده از لحاظ کمی و کیفی به ترتیب، میزان جذب نوری آن در طول موج های A۲۶۰/۲۸۰ به کمک دستگاه بیوفتومتر و بارگذاری روی ژل آگاروز ٪۲/۵ انجام گرفت (۴). سنتز cDNA با استفاده از کیت Thermo Fisher طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. واکنش Real Time PCR به صورت سه مرحله ای با استفاده از Biofact 2X Master Mix و به روش SYBR Green طبق دستورالعمل شرکت سازنده

جدول ۲- توالی پرایمر های ژن ها Bax, Ki67, CYCLIN-D1, Bcl2 و β-actin.

Primer		Sequence (5'⟶ 3')	Product Size (bp)
Bax	F	5'-CAA ACT GGT GCT CAA GGC-3'	178 bp
	R	5'-CAC AAA GATGGT CAC CGT-3'	
Ki67	F	5'-TTC TGA CCC TGA TGA GAG TGAG-3'	111 bp
	R	5'-GAG AGG CGT ATT AGG AGG CA-3'	
CYCLIN-D1	F	5'-GGC GGA GAA CAA ACA GA-3'	181 bp
	R	5'-TGT GAG GCG GTA GGA CA-3'	
Bcl2	F	5'-GTA CTT AAA AAA TAC AAC ATC ACA-3'	148 bp
	R	5'-CTT GAT TCT GGT GTT TCC C-3'	
β-actin	F	5'-TGA AGA TCA AGA TCA TTG CTC CC-3'	168 bp
	R	5'-AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC-3'	

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

انجام گرفت. لسیت پرایمرهای استفاده شده در این آزمایش در جدول ۲ ذکر شده است. برنامه دمایی Real Time PCR به این شرح بود: برای Holding ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه، به دنبال آن ۴۰ چرخه با پروفایل واسرشتگی ۲۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه، اتصال ۳۰ثانیه در دمای ۶۲ درجه و گسترش ۳۰ثانیه در دمای ۷۲ درجه. برای همه ژن ها منحنی ذوب از دمای ۶۰تا ۹۵ درجه رسم گردید. از ژن β-actin به عنوان ژن خانه دار (housekeeping) به منظور نرمالیزاسیون نتایج استفاده شد. به این دلیل که میزان کارآیی واکنش ژن های مورد نظر بالای ۹۰٪ بود از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و روش لیواک جهت تعیین میزان تغییرات بیان ژن مورد نظر استفاده شد (۸-۵).

آنالیز آماری: در این مطالعه، ابتدا توزیع داده ها با استفاده از آزمون آماری Kolmogorov Smirnov تعیین گردید . آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism V6.07 و آزمون های One Way ANOVA انجام گرفت. داده ها به صورت میانگین ± انحراف از معیار (Mean± SD) مورد بررسی قرار گرفت. حدود اطمینان در تمامی آزمایش ها ۹۵٪ در نظر گرفته شد و P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار محسوب گردید. در نمودارها مقادیر P کمتر / مساوی از ۰/۰۵، ۰/۰۱ ، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ به ترتیب با یک ستاره (*)، دو ستاره (**)، سه ستاره (***) و چهار ستاره (****) نشان داده شدند.

یافته‌ها

بررسی بیان مارکرهای اختصاصی رده های سلولی میلوما با فلوسایتومتری: وجود نشانگرهای سطحی اختصاصی رده سلولی میلومای انسانی از جمله CD38 و CD138 و عدم وجود نشانگرهای اختصاصی لنفوسیت B نظیر CD20 به منزله ی تایید هویت رده های سلولی میلومای انسانی می باشد.

شمارش تام و زنده مانی رده سلولی U266 در گروه‌های مورد مطالعه: نتایج شمارش سلول های رده U266 در گروه های مورد مطالعه نشان داد که ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول ها، در گروه G3 (محتوی ۱۰درصد مایع آمنیوتیک و ۱۰درصد سرم جنین گاوی) شاهد بیشترین تعداد سلول ها هستیم. پس از آن گروه G4 (محتوی ۲۰درصد مایع آمنیوتیک) و سپس G2 (کنترل مثبت) حاوی بیشترین تعداد سلول ها بودند. گروه G1 که فاقد هرگونه سرم بود کمترین تعداد سلولی را نشان داد. اما نتایج شمارش همین رده سلولی، ۹۶ ساعت پس از کشت قدری متفاوت بود؛ بدین شرح که گروه G3 همچنان بیشترین تعداد سلولی را نشان داد اما پس از آن G2 دارای بیشترین تعداد سلولی بود.تعداد سلولهای گروه G3 نسبت به ۴۸ ساعت کاهش داشت.

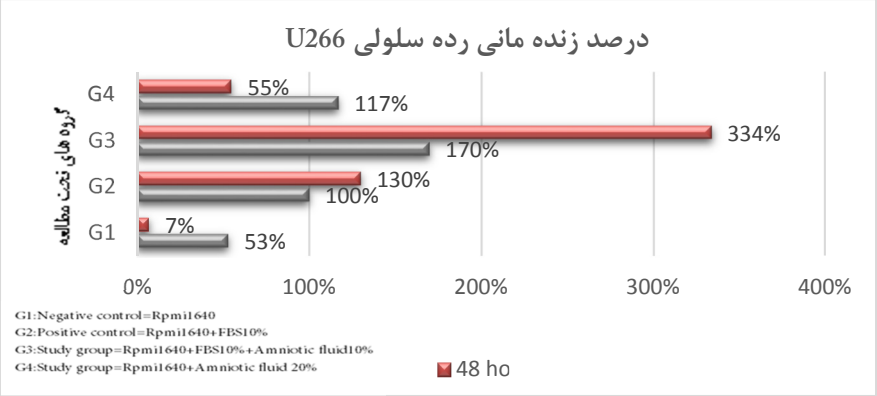
نتایج شمارش سلول های رده RPMI 8226 در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول ها، در گروه G3 شاهد بیشترین تعداد سلول ها هستیم. پس از آن گروه G4 و سپس G2حاوی بیشترین تعداد سلول ها بودند. گروه G1 که فاقد هرگونه سرم بود کمترین تعداد سلولی را نشان داد. اما نتایج شمارش این رده سلولی، ۹۶ ساعت پس از کشت در مقایسه با ۴۸ساعت پس از کشت همین رده سلولی و همینطور با نتایج به دست امده از تیمار رده سلولی U266 متفاوت بود. بدین شرح که گروه G3 همچنان بیشترین تعداد سلولی را نشان داد اما پس از آن G2 دارای بیشترین تعداد سلولی بود. تعداد سلولهای گروه G3 نسبت به ۴۸ ساعت کاهش داشت.

درصد تکثیر سلول های رده U266در محیط کشت بعد از۴۸و ۹۶ ساعت: محاسبه ی درصد زنده مانی سلول های رده U266 بر اساس شمارش ان ها پس از تیمار، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از کشت نشان می دهد: ۴۸ ساعت پس از کشت، در مقایسه با گروه کنترل (G2)، سلول های گروه G3 با ۱۷۰درصد زنده مانی بیشترین درصد زنده مانی در مقایسه با گروه های دیگر داشتند. پس از آن G4 با ۱۱۷ درصد پس از گروه G2(با ۱۰۰ درصد زنده مانی)، بیشترین زنده مانی را داشتند. ۹۶ ساعت پس از کشت، در مقایسه با گروه کنترل (G2)، سلول های گروه G3 بیشترین زنده مانی را داشتند(با ۳۳۴درصد زنده مانی) و پس از آن G4 با ۱۳۰ درصد پس از گروه G2 (۵۵ درصد)، بیشترین زنده مانی را داشتند (شکل ۱).

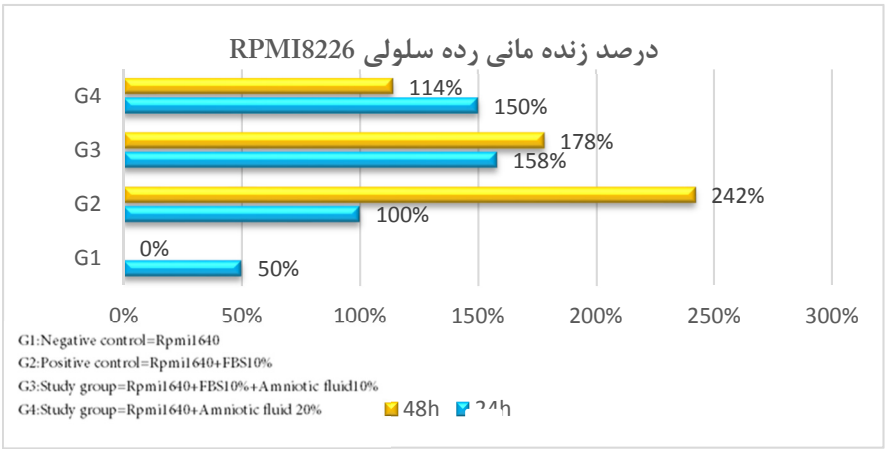
درصد تکثیر سلول های رده RPMI8226در محیط کشت بعد از ۴۸ و ۹۶ ساعت: محاسبه‌ی درصد زنده مانی سلول های رده RPMI8226 بر اساس شمارش ان

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]



شکل ۱- درصد تکثیر سلول های رده U266 در محیط کشت بعد از ۴۸ و ۹۶ ساعت



شکل ۲- درصد تکثیر سلول‌های رده RPMI8226 در محیط کشت بعد از ۴۸ و ۹۶ ساعت

ها پس از تیمار، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از کشت نشان می دهد: ۴۸ ساعت پس از کشت، در مقایسه با گروه کنترل (G2)، سلول های گروه G3 با ۱۵۸درصد زنده مانی بیشترین درصد زنده مانی در مقایسه با گروه های دیگر داشتند. پس از آن G4 با ۱۵۰ درصد پس از گروه G2 (با ۱۰۰ درصد زنده مانی)، بیشترین زنده مانی را داشتند. ۹۶ ساعت پس از کشت، سلول های گروه G2 بیشترین زنده مانی را داشتند (با ۲۴۲درصد زنده مانی) و پس از آن به ترتیب سلول های گروه G4 با ۱۷۸ درصد زنده مانی و سپس گروه G4 با ۱۱۴ درصد زنده مانی، بیشترین زنده مانی را داشتند (شکل ۲).

نتایج MTT رده سلولی U266: با استفاده از روش MTT، حیات رده های سلولی در حضور و عدم حضور دوزهای مختلف مایع آمنیوتیک انسانی ۴۸ و ۹۸ ساعت پس از کشت ارزیابی شد. نتایج این بررسی نشان داد که ۴۸ ساعت پس از کشت رده های سلولی U266، میان میانگین حیات سلولی در بین گروه G1 و گروه کنترل ($p<۰/۰۰۱$) تفاوت معناداری وجود دارد، اما بین سایر گروه ها (G3 و G4) با گروه کنترل، تفاوت معناداری وجود ندارد. ۹۶ ساعت پس از کشت، میان میانگین حیات سلولی در بین گروه G1و گروه کنترل ($p<۰/۰۰۱$) و بین گروه G4 و گروه کنترل ($p<۰/۰۱$) تفاوت معناداری وجود دارد اما میان گروه G3 و گروه کنترل تفاوت معناداری یافت نشد.

نتایج MTT رده سلولی RPMI8226: نتایج این بررسی نشان داد که ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از کشت رده های سلولی RPMI8226 ، میان میانگین حیات سلولی در بین گروه G1و گروه کنترل ($p<۰/۰۰۱$) تفاوت معناداری وجود دارد، اما بین سایر گروه ها (G3 و G4) با گروه کنترل، تفاوت معناداری وجود ندارد.

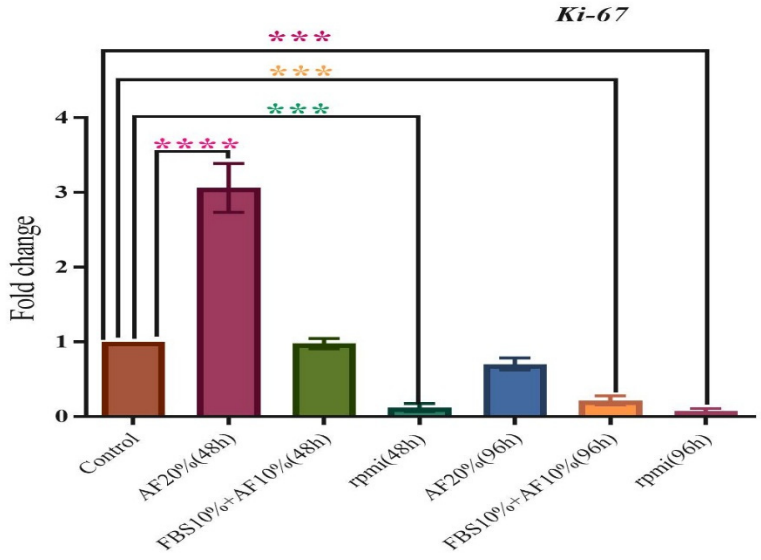
نتایج اندازه گیری بیان ژن های Bcl-2، Bax، Ki67، CYCLIN-D نسبت به β-actin

بیان ژن Ki-67 در رده سلولی U266: نتایج نشان داد که میانگین بیان Ki-67، پس از ۴۸ ساعت در سلول

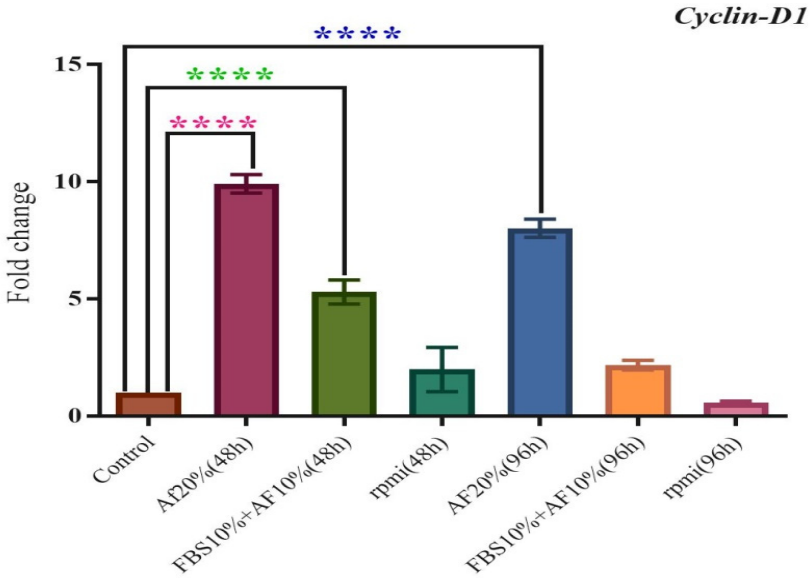
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

های گروه G4 نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان داد(P<0.0001)،در حالی که میانگین بیان Ki-67، در سلول های گروه G1 نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری را نشان داد(P<0. 001). با این وجود در سلول های گروه G3، نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشد. همچنین میانگین بیان Ki-67 پس از ۹۶ ساعت در سلول های گروه G3 نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان داد (p<۰/۰۰۱)، در حالی که میانگین بیان Ki-67، در سلول های گروه G1 نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری را نشان داد (p<۰/۰۰۱). با این وجود در سلول های گروه G4، نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشد (شکل۳).

بیان ژن Cyclin-D1 در رده سلولی U266: نتایج نشان داد که میانگین بیان Cyclin-D1 ، پس از ۴۸ ساعت در سلول های گروه G4 و G3 نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان داد (p<۰/۰۰۰۱)، در حالی که در میانگین بیان Cyclin-D1، در سلول های گروه G1 نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشد. همچنین میانگین بیان Cyclin-D1



شکل ۳- میزان بیان Ki-67 در رده سلولی U266 در طی ۴۸ و۹۶ ساعت پس ازکشت



شکل ۴- میزان بیان Cyclin-D1 در رده سلولی U266 در طی ۴۸ و۹۶ ساعت پس از کشت

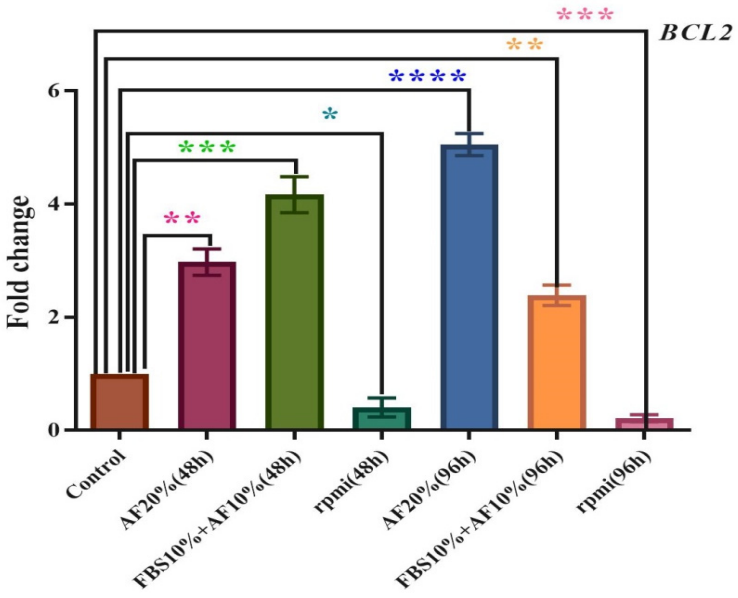
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

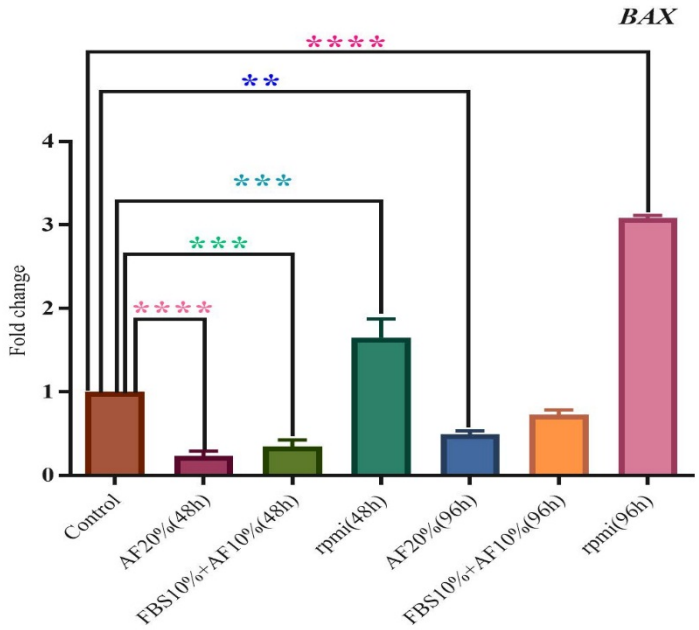
پس از ۹۶ ساعت در سلول های گروه G4 نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان (p<۰/۰۰۰۱)، در حالی که در سلول های سایر گروه های G1 و G3 نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشد (شکل ۴).

بیان ژن Bcl-2 در رده سلولی U266: نتایج نشان داد که میانگین بیان BCL-2 ، پس از ۴۸ ساعت در سلول های گروه G4 (p<۰/۰۱)، و G3 (p<۰/۰۰۱)، نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان داد. در حالی که در میانگین بیان BCL-2 ، در سلول‌های گروه G1 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری (p<۰/۱)، مشاهده شد. همچنین میانگین بیان BCL-2پس از ۹۶ ساعت در سلول های گروه G4 (p<۰/۰۰۰۱)، و G3(p<۰/۰۱) نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان داد، در حالی که در سلول های گروه G1 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری (p<۰/۰۰۱)، مشاهده شد (شکل ۵).

بیان ژن Bax در رده سلولی U266: نتایج نشان داد



شکل ۵- میزان بیان Bcl-2 در رده سلولی U266 در طی ۴۸ و۹۶ ساعت پس ازکشت

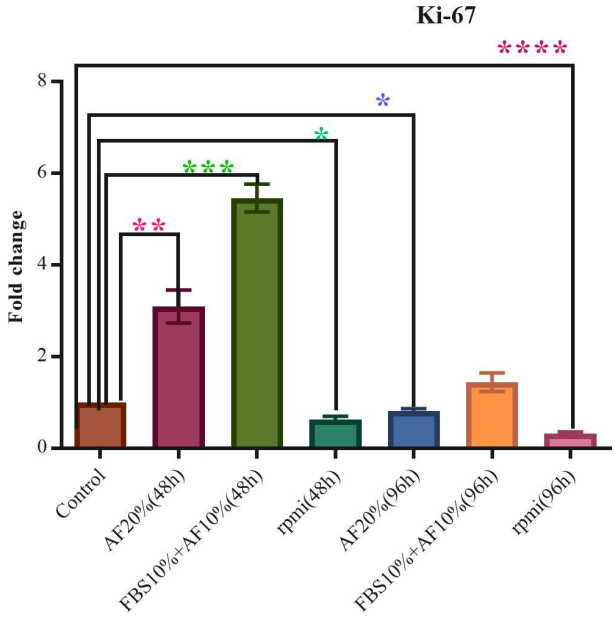


شکل ۶- میزان بیان Bax در رده سلولی U266 در طی ۴۸ و۹۶ ساعت پس ازکشت

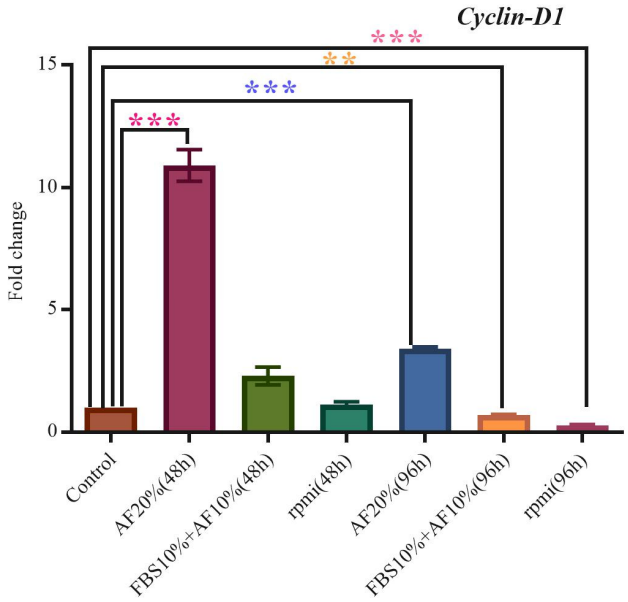
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

که میانگین بیان Bax ، پس از ۴۸ ساعت در سلول‌های گروه G1 نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان داد (p<۰/۰۰۱)، در حالی که در میانگین بیان BCL-2 ، در سلول های گروه‌های G3 (p<۰/۰۰۱)، و G4 (p<۰/۰۰۰۱) نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری مشاهده شد. همچنین میانگین بیان Bax پس از ۹۶ ساعت در سلول های گروه G1 نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری مشاهده شد (p<۰/۰۰۰۱)، در حالی که در سلول های گروه G4 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری (p<۰/۰۱)، مشاهده شد. اما در گروه G3 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری مشاهده شد (شکل ۶).

بیان ژن Ki67 در رده سلولی RPMI8226: نتایج نشان داد که میانگین بیان Ki67، پس از ۴۸ ساعت در سلول های گروه G3 (p<۰/۰۰۱)، و G4 (p<۰/۰۱) نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان داد،



شکل ۷- میزان بیان Ki-67 در رده سلولی RPMI8226 در طی ۴۸ و ۹۶ساعت پس از کشت



شکل ۸- میزان بیان cyclin-D1 در رده سلولی RPMI8226 در طی ۴۸ و ۹۶ساعت پس ازکشت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

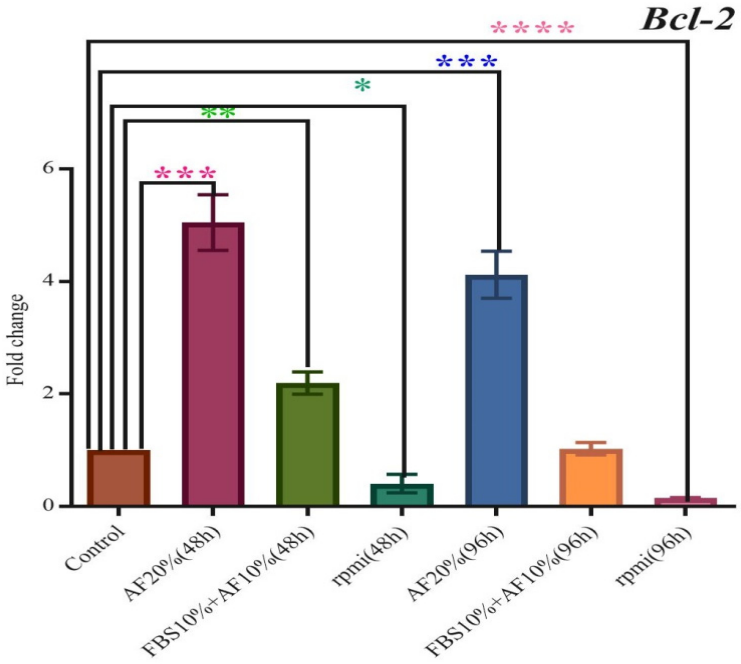
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

در حالی که در میانگین بیان BCL-2 ، در سلول های گروه G1 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری (p<۰/۱)، مشاهده شد. همچنین در میانگین بیان Ki67 پس از ۹۶ ساعت در سلول های گروه G1 نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری مشاهده شد (p<۰/۰۰۰۱)، در حالی که در سلول های گروه G4 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری (p<۰/۱) مشاهده شد. اما در گروه G3 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری مشاهده شد (شکل ۷).

بیان ژن Cyclin-D1 در رده سلولی RPMI8226: نتایج نشان داد که میانگین بیان Cyclin-D1، پس از ۴۸ ساعت در سلول های گروه (P<0.001 G4) نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری وجود دارد، در حالی که در میانگین بیان BCL-2 ، در سلول های سایر گروه ها (G3وG1) نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری مشاهده شد. همچنین در میانگین بیان Cyclin-D1پس از ۹۶ ساعت در سلول های گروه G1 (p<۰/۰۰۱)، و G3 (p<۰/۰۱) نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری مشاهده شد، در حالی که در سلول های گروه G4 نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری (p<۰/۰۰۱) مشاهده شد (شکل ۸).

بیان ژن Bcl-2 در رده سلولی RPMI8226: میانگین بیان Bcl2، پس از ۴۸ ساعت در سلول های گروه G3 (p<۰/۰۰۱) و G4 (p<۰/۰۱) نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان داد، در حالی که در میانگین بیان BCL-2 ، در سلول های گروه G1 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری(p<۰/۱) مشاهده شد. همچنین در میانگین بیان Bcl2 پس از ۹۶ ساعت در سلول های گروه G4 نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری مشاهده شد (p<۰/۰۰۱)، در حالی که در سلول های گروه G4 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری (p<۰/۰۰۰۱)، مشاهده شد. اما در گروه G3 نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری مشاهده شد (شکل ۹).

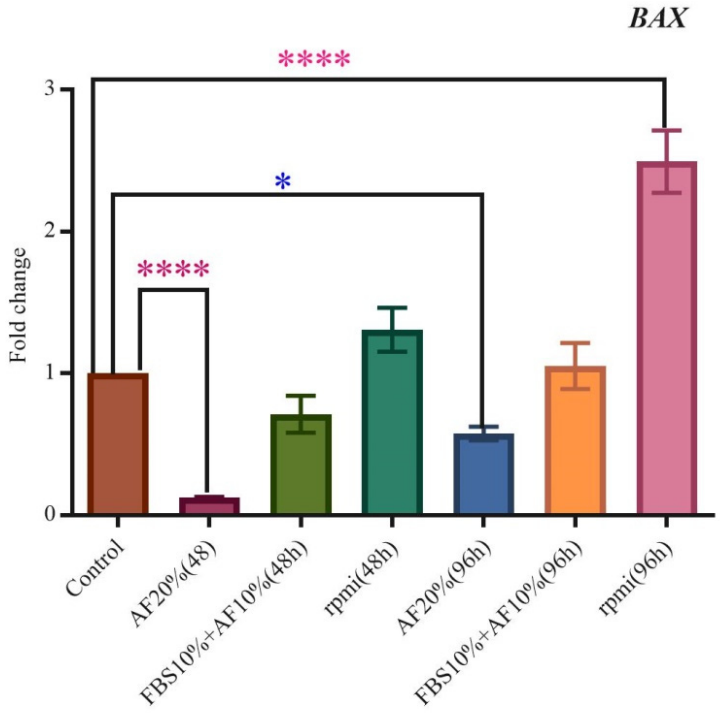
بیان ژن Bax در رده سلولی RPMI8226: میانگین بیان Bax ، پس از ۴۸ ساعت در سلول های گروه G4 (p<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری را نشان داد، در حالی که در میانگین بیان BCL-2، در سلول های سایر گروه ها) G3وG1 (نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشد. همچنین در میانگین بیان Bax پس از ۹۶ ساعت در سلول های گروه G4 نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری مشاهده شد (p<۰/۰۰۱)، در حالی که در سلول های گروه G4 نسبت به گروه کنترل افرایش معناداری (p<۰/۰۰۱) مشاهده شد. اما در گروه G3 نسبت به



شکل ۹- میزان بیان bcl2 در رده سلولی RPMI8226 در طی ۴۸ و ۹۶ساعت پس از کشت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]



شکل ۱۰- میزان بیان Bax در رده سلولی RPMI8226 در طی ۴۸ و ۹۶ساعت پس از کشت

گروه کنترل افزایش معناداری مشاهده نشد (شکل ۱۰).

بحث و نتیجه‌گیری

تکنیک های Invitro جهت کشت سلول، کشت بافت و یا اعضا درعرصه پزشکی یا صنعت از اهمیت بالایی برخوردار هستند. بنابراین فراهم آوردن یک محیط مناسب همراه با تسهیلات مشابه با محیط فیزیولوژیک بدن، برای ایجاد این محیط رشد ضروری است. کشت سلول به دلیل اهمیت آن در IVF، کلونینگ یا ایجاد حیوانات تغییر یافته ژنتیکی یا تراریخته ها از اهمیت بالایی برخوردار است. کشت سلول به طورعمده در محیطی صورت میگیرد که به طور معمول حاوی سرم جنین گاوی یا FBS است زیرا FBS دارای عناصر ضروری مانند هورمون ها، ویتامین ها، نمک ها، الکترولیت ها و سایر عوامل رشد می باشد. این سرم باید فاقد سلولهای خونی، پلاکت یا دیگر عوامل انعقادی باشد. از آنجا که FBS چه از لحاظ علمی و چه از لحاظ اخلاقی دارای موانع و مشکلاتی می باشد که در ادامه شرح داده می شود بنابراین استفاده از آن میتواند در نتایج کشت، آزمایشات یا تولید یک محصول در صنعت اختلال ایجاد کند؛ بنابراین استفاده از یک جایگزین مناسب می تواند در برطرف کردن این مشکل سودمند باشد (۹).

از جمله تناقض هایی که در شرایط کشت با FBS می توان مطرح نمود می توان به موارد زیر اشاره کرد: نحوه و زمان خونگیری از جنین گاوی نخستین موضوع می باشد که در چه زمانی یعنی در چه دوره ای از دوران جنینی خون گرفته شده است؟ آیا به هنگام خونگیری جنین زنده بوده یا مرده بوده است؟ و به عبارت دیگر قلب آن در حال تپیدن بوده است یا از کار افتاده است و مراحل انعقاد آغاز شده است یا خی؟ چه حجمی از خون گرفته شده است؟ زیرا که اگر قلب از کار افتاده باشد و مراحل انعقاد آغاز شده باشد حجم کمتری از خون را می توان دریافت کرد و مواد مغذی بیشتری تولید شده و ممکن است مواد سمی و آسیب رسان دیگری در این جریان تولید شده باشند که محیط کشت را دچار آسیب می کنند. دوم اینکه چون پمپ های سدیم-پتاسیم و غیره که برای حفظ تعادل الکتریکی دو طرف غشاء پلاسمایی به کار می رود و نیاز به انرژی دارد در یک جنین مرده از کار می افتند

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

غلظت سدیم (Na)، پتاسیم و کلسیم در دو طرف غشاء به هم ریخته و این مواد از درون سلول به بیرون سلول نشت پیدا میکنند و وارد مایع میان بافتی میشود بنابراین آنالیز این موارد و پایش آنها برای بررسی غلظت های ثابتی از آنها در وجه های مختلف سرم جنین گاوی اهمیت دارد از دیگر موارد میتوان به برداشت خون به طور مستقیم از قلب جنین اشاره کرد که از لحاظ اخلاقی مشکل آفرین است. در شرایط ذبح هم باید شرایط استریل بررسی شود و درد نکشیدن جنین را مدنظر قرار داد (۹).

با توجه به عوامل فوق استفاده از FBS بعلت تفاوت های ذکر شده در Batch های مختلف نمیتوان نتایج آزمایشهای مشابه را با یکدیگر مقایسه کرد و به یکدیگر تعمیم داد. بنابراین FBS دیگر بعنوان یک عامل رشد در نظر گرفته نمیشود بلکه یک عامل مداخله گر خواهد بود. به این دلیل استفاده از جایگزین های بیولوژیک و مطمئن تری را میتوان مورد بررسی قرار داد. از این جایگزین ها میتوان به محیط های تعریف شده شیمیایی (مصنوعی اشاره کرد) که اختصاصی یک نوع سلول میباشد که بیشتر آنها در این محیط ها به خوبی رشد میکند به جز سلولهای اندوتلیال که سخت رشد هستند و شرایط خاصی می خواهند. راهکار دیگر استفاده از سرم های حیوانات دیگر هرچند که مسائل اخلاقی به قوت خود همچنان پابرجاست. افزون بر این، اینکه آیا سلولهای انسانی میتوانند در گونه ای دیگر که نسبت به FBS ناشناخته اند رشد کنند؟ جنین اسب ، جنین خوک نیز با استفاده از خونگیری قلب برداشت میشوند؛ بنابراین نگرانی هایی که در رابطه با FBS گفته شد در این رابطه نیز وجود دارد. همچنین میتوان از استفاده از FBS را کاهش داد زیرا این میزان بین ۵ تا ۲۰ درصد می تواند متغییر باشد بنابراین با اضافه کردن فاکتورهای رشد (synthetic) ، میتوان کاستی های این محیط را جبران کرد و استفاده از آنرا(FBS)، جبران کرد و به حداقل رساند. افزون بر این شرکت های متعددی در حال توسعه محیط های عاری از سرم (serum free) از سرم هستند تا این نیاز را برطرف کنند (۹).

در یک کارگاه در سال ۲۰۰۳ که با عنوان " پیش به سوی روش های بهتر in vitro" در هلند انجام شد به ضرورت یافتن یک جایگزین FBS اشاره و تاکید شد آنها نیز بر محیط های کشت عاری از سرم (serum free) تاکید داشتند. در این کارگاه گفته شد استفاده از محیط های حاوی سرم افزون بر مواردی که پیشتر گفته شد مشکلات دیگری دارد که عبارتند از ممکن است سرمهای گرفته شده دارای یک بیماری باشد که در آن یک فاکتور مبهم یا ناشناخته وجود داشته باشد و کشت را دچار آسیب کند. همچنین batch سرم ها نمیتواند بیانگر کیفیت یا کمیت محتویات آن باشد بنابراین ممکن است batch to batch variation رخ دهد. سرمی که صحیح جدا نشده باشد ممکن است دارای مواد سمی مثل LPS، هموگلوبین و یا دیگر مواد مضر باشد (۱۰). همچنین سرم میتواند یک منبع مهم آلودگی مثل قارچ،ویروس یا پریون باشد بنابراین پیشنهاد میشود از محیط های عاری از سرم استفاده شود که مزایای زیر را دارد:

۱. از لحاظ شیمیایی تعریف شده است که میتوان به راحتی محتویات آنرا کنترل و تنظیم بکنیم.

۲. batch to batch variation را به حداقل برسانیم.

۳. می توان منابع آلودگی را کاهش داد.

با این وجود تا فراهم آمدن تسهیلات کامل و چنین شرایطی میتوان از دیگر جایگزین ها استفاده کرد (۱۰).

از این موارد میتوان به مایع آمنیون آمنیون اشاره کرد این محیط غنی از عوامل رشد و ریز مغذی هایی است که جهت تکثیر سلولهای جنینی، تکامل و تمایز آنها مورد نیاز است. در مطالعه حاضر به بررسی غلظت و زمان مناسب، جهت کشت های سلولهای میلومایی(RPMI8226 و U266) پرداخته شد و دیده شد که ۴۸ ساعت پس از کشت رده های سلولی U266، میان میانگین حیات سلولی در بین گروه G1و گروه کنترل تفاوت معناداری وجود دارد، اما بین سایر گروه ها(G3وG4) با گروه کنترل، تفاوت معناداری وجود ندارد. همچنین ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از کشت رده های سلولی RPMI8226 ، میان میانگین حیات سلولی در بین گروه G1 و گروه کنترل تفاوت معناداری وجود داشت اما بین سایر گروه ها (G3وG4) با گروه کنترل، تفاوت معناداری وجود ندارد. نتایج نشان داد که میانگین بیان Ki-67، پس از ۴۸ ساعت در سلول های

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

گروه G4 نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان داد نتایج نشان داد که میانگین بیان Cyclin-D1، پس از ۴۸ ساعت در سلول های گروه G4 و G3 نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان داد. همچنین میانگین بیان Cyclin-D1پس از ۹۶ ساعت در سلول های گروه G4 نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان داد ،در حالی که میانگین بیان Ki-67، در سلول های گروه G1 نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری را نشان داد. این نتایج عنوان می کند به نظر می رسد مایع آمنیوتیک به تنهایی می تواند اثر بخشی بیشتری نسبت به FBS جهت تکثیر سلول های رده ی میلومایی داشته باشد.

همچنین پس از بررسی بیان ژن های مرتبط با آپوپتوز، نتایج زیر حاصل شد. میانگین بیان Bcl2، پس از ۴۸ ساعت در سلول های گروه G3 و G4نسبت به گروه کنترل افزایش معنا داری را نشان داد، در حالی که در میانگین بیان BCL-2 ، در سلول های گروه G1 نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری مشاهده شد. افزون بر این میانگین بیان Bax ، پس از ۴۸ ساعت در سلول های گروه G4 نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری را نشان داد. این نتایج نشان میدهد که ژن های ضد آپوپتوز در محیط حاوی مایع آمنیوتیک افزایش یافته در حالیکه ژنهای آپوپتوزی کاهش می یابد که آن را گزینه مناسبی برای حفظ بقای سلول های رده میلومایی می کند.

همسو با مطالعه ما، مطالعه فیضی و همکارانش بروی اثر مایع آمنیون آمنیون بروی کشت سلولهای اندوتلیال قرنیه نشان داد که استفاده از مایع آمنیون آمنیون بروی کشت سلولهای اندوتلیال قرنیه سبب تکثیر سریع سلولهای اندوتلیال شده و این تکثیر حداکثر با مایع آمنیون ۲۰ درصد مشاهده شد، چراکه غلظت ۳۰ درصد آن نتایج عکس داشته است و آسیب رسان بوده است. در مطالعه فیضی و همکارانش این تکثیر در مقایسه با گروه شاهد یک و نیم تا دو برابر گزارش شده است. در مطالعه ی آن ها ،تفاوت معناداری در بیان K67 و ویمنتین بین محیط کشت ۲۰٪ و محیط کشت کنترل مشاهده نشد. ژن k67 طی مرحله نهایی تا انتهای میتوز روی سلولها ظاهر میشود، که در کنار سایکلین D1 میتواند برای بررسی چرخه سلولی موثر باشد. در مطالعه فیضی و همکارانش سایکلین ها و نیز ژنهای آپوپتوتیک و آنتی آپوپتوتیک مثلBCL2 و Bax مورد بررسی قرار نگرفت که در مطالعه ما به آنها پرداخته شد. نتایج مطالعه آن ها نشان داد غلظتهای بالای ۳۰ درصد رشد سلولهای اندوتلیال را مهار میکند (۱۱).

مایع آمنیون دارای PH فیزیولوژیک حدود ۷,۲ است و فشار اسموتیک آن در همین محدوده است. بنابراین نیاز به بهینه سازی PH اسیدی و بازی ندارد. Cho و همکارانش (۱۲) مقادیر فروانی از پروتئین ها در مایع آمنیون در هفته ۱۶ تا ۱۸ حاملگی شناسایی کردند که شامل آلبومین، فیبرونکتین، پروتئین C3 کمپلمان، سروپلاسمین و TGFβ است. بخش C3 کمپلمان مسئول بازسازی بافت آسیب دیده است که در کنار TGFβ که خودش نقش آنژیوژنز دارد میتواند به ترمیم بافتی کمک کند (۱۳). پلاسمینوژن در تکثیر و ترمیم بافت موثر است. سایر پروتئینها مثل آلبومین و سروپلاسمین برای هومئوستاز و انتقال مواد سلولی ضروری هستند. اگرچه مطالعه دیگری در این زمینه که استفاده از این مایع آمنیون به جای FBS را مورد بحث قرار دهد، صورت نگرفته و نیاز به مطالعه بیشتری بر روی رده های سلولی متفاوتی مورد نیاز است تا بتوان داده های این مطالعه را تحکیم بخشید. با این وجود مقایسه این روش با سایر روش های جایگزین FBS نیز میتواند سودمند باشد. بعنوان مثال در سالهای اخیر از سرم گرفته شده از خون بند ناف (CBS) به جای FBS در کشتهای سلولی بنیادی مزانشیمی استفاده شده است و نشان داده شده است که میتواند برای رشد MSC ها مورد استفاده قرار بگیرد (۱۴).

اگرچه محدودیت سرم بند ناف هم بایستی مدنظر قرار داد که میتوان سرم چندین خون بند ناف را با همدیگر به صورت Pooled کرد که خود آن نیز میتواند مواد مغذی موجود در آن را نامتوازن کند و نتوان نتایج آزمایشهای مشابه را با یکدیگر مقایسه کرد و تعمیم داد (۱۴). در مطالعه Shetty و همکارانش کینتیک رشد سلولهای مزانشیمی مغز استخوان، سلولهای مزانشیمی خون بند ناف و سلولهای مزانشیمی خوک مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت که نشان داده شد سرم خون بند ناف در مقایسه با FBS سلولهای مزانشیمی بندناف را تا سه پاساژ بیشتر رشد داده است و در پایان پاساژ سوم

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

با CBS، سلولهای کشت داده شده MSC سه برابر FBS بود. در حالیکه stem cell های خوک از لحاظ تعداد سلولها هیچ تفاوتی را در مقایسه با FBS نشون نداد همچنین در مورد مزانکائیم stem cell های مغز استخوان انسانی تعداد سلولها تا پاساژ سوم در CBS از FBS بیشتر بود اما از پاساژ سوم به بعد در CBS کاهش پیدا کرد به طوریکه سلولهای کشت داده شده در فلاسکهای حاوی FBS به صورت تک لایه رشد پیدا کردند (۱۴).

در مطالعه Shetty و همکارانش (۱۴) برخلاف مطالعه ما به بررسی فاکتورهای آپوپتوتیک و آنتی آپوپتوتیک پرداخته نشده است. چرا که میتوان بقا (survival) و تکثیر (proliferation) مقایسه کرد چرا که ممکن است غلظت کاهش نسبی سلولها در FBS در مقایسه با CBS افزایش آپوپتوز باشد نه کاهش تکثیر. بنابراین بهتر بود که ترتیبی اتخاذ شود که فاکتورهای تکثیری یا آپوپتوزی را بتوان مورد بررسی قرار داد این کار در مطالعه ما صورت گرفته است و ژن های ضد آپوپتوز در محیط حاوی مایع آمنیوتیک افزایش یافته در حالیکه ژنهای آپوپتوزی کاهش می یابد که آن را گزینه مناسبی برای حفظ بقای سلول های رده میلومایی می کند.

در مطالعه مشابه به کار Shetty و همکارانش که توسط احمد و همکارانش انجام شد CBS و FBS را بروی رشد رده های Hella ، مزانکائیم stem cell موش (موش ویستار) و مزانکائیم stem cell های انسانی و دیگر رده های سلولی مورد بررسی قرار دادند. درصد FBS یا CBS محیط کشت عبارت بودند از ۵ – ۱۰ – ۱۵ ٪ و به مدت ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار دادند (۱۵). در حالیکه در مطالعه اخیر ما درصدها عبارت بودند از ۵ – ۱۰- ۱۵- ۲۰٪ و به مدت ۷۲ یا ۹۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه احمد نشان داد که CBS به جای FBS میتواند تکثیر MSC ها و همچنین سلولهای رده Hella و چسبندگی سلول ها رو به محیط کشت افزایش بدهد . این امر میتواند به انسانی کردن محصولات سلولی و درمان ها کمک شایانی بکند. مطالعه احمد برخلاف مطالعه ما و نیز مطالعه Shetty سلولهایش را که جدا کرده است ایمونوفنوتیپ نکرده است درصورتیکه ما در مطالعه امون سلولهای مان را ایمونوفنوتیپ کردیم و مارکرهای فلوسیتومتری همچنین در مطالعه آنها به بررسی آپوپتوز و چرخه سلولی اشاره ای نشده و مورد بررسی قرار داده نشده است. هرچند در مطالعه آن ها آپوپتوز و چرخه سلولی بررسی نشده است که در مطالعه حاضر بیان آن ها مورد بررسی واقع شده است.

هر چند مطالعات دیگری دیگری هم وجود دارد که به بررسی سایر جایگزین ها اشاره کردند از جمله Humaun platelet lysate (۱۶)، عصاره ی هیپوفیز، chicken embryo extract ، Bovine milk fraction یا آغوز استفاده کرد و حتی محیط آمنیون رو با اینها مقایسه کنیم (۱۷). پیشنهاد می شود که بر روی سایر رده های مختلف سلول میلومایی یا سرطان های دیگر با عصاره های دیگر نیز مایع آمنیوتیک مقایسه شود و افزون بر بررسی mRNA ها به بیان Micro-RNA ها هم پرداخته شود (۷).

با توجه به اینکه بررسی وضعیت سلول ها در ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از کشت انجام شده است این نتایج به طور کلی قابل تعمیم نبوده و می توانیم ادعا کنیم که تا ۹۶ ساعت، مایع آمنیوتیک ۲۰٪ به تنهایی می تواند به عنوان یک مکمل به جای سرم جنین گاوی مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین بر اساس یافته های ما مایع آمنیوتیک ۲۰ درصد تا ۹۶ ساعت می تواند از رشد دو رده سلولی میلومایی حتی بهتر از سرم جنین گاوی حمایت کند و با توجه به غنی بودن آن از فاکتورهای رشد متعدد و محتوای غنی پروتئینی، دارا بودن مقادیر لیپید، کربوهیدرات، نتیجه دور از انتظاری نبود.

References

1. Engelhardt M, Mertelsmann R. 160 years of multiple myeloma: Progress and challenges. Eur J Cancer; 2006.42(11):1507-9.
2. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma :from bench to bedside. Blood Cancer J; 2018.8(1):7.
3. Hui L, Bianchi DW. Cell-free fetal nucleic acids in amniotic fluid. Hum Reprod Update; 2011.17(3):362-71.
4. Seif F, Khoshmirsafa M, Moosavi M, Roudbary M, Khajoei S, Nikfar G, et al .Evaluating the expression of IL-17 and IL-23R genes in Peripheral

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]

Blood Mononuclear cells in Rheumatoid Arthritis patients. Razi J Med Sci; 2018.25(170):1-8.

5. Seif F, Ghalehbaghi B, Aazami H, Mohebbi A, Ahmadi A, Falak R, et al. Frequency of CD4+ and CD8+ T cells in Iranian chronic rhinosinusitis patients. Allergy Asthma Clin Immunol; 2018.14(1):47.

6.Khoshmirsafa M, Kianmehr N, Falak R, Mowla SJ, Seif F, Mirzaei B, et al. Elevated expression of miR-21 and miR-155 in peripheral blood mononuclear cells as potential biomarkers for lupus nephritis. Int J Rheumat Dis; 2018.

7. Khoshmirsafa M, Seif F, Mohsenzadegan M, Najafi M, Mokhtarian K, Shekarabi M. Circulating microRNAs, valuable biomarkers in biological fluids. Razi J Med Sci; 2017.24(160):22-36.

8. Mohsenzadegan M, Fayazi MR, Abdolmaleki M, Bakhshayesh M, Seif F, Mousavizadeh K. Direct immunomodulatory influence of IFN-β on human astrocytoma cells. Immunopharmacol immunotoxicol; 2015.37(2):214-9.

9. Jochems CE, Van Der Valk JB, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? Atla-Nottingham; 2002.30(2):219-28.

10. Van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G, et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. Toxicol In vitro; 2004.18(1):1-12.

11. Feizi S, Soheili ZS, Bagheri A, Balagholi S, Mohammadian A, Rezaei-Kanavi M, et al. Effect of amniotic fluid on the in vitro culture of human corneal endothelial cells. Experim Eye Res; 2014.122:132-40.

12. Cho CKJ, Shan SJ, Winsor EJ, Diamandis EP. Proteomics analysis of human amniotic fluid. Mol Cell Proteom; 2007.6(8):140-156.

13. Khoshmirsafa M, Seif F, Bagheri N, Beshkar P, Mousavi M, Shirzad H. Correlation of interleukin 6 and transforming growth factor β1 with peripheral blood regulatory T cells in rheumatoid arthritis patients: a potential biomarker. Central-Eur J Immunol; 2018.43(3):281.

14. Shetty P, Bharucha K, Tanavde V. Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells. Cell Biol Int; 2007.31(3):293-8.

15. Ahmad A, Umer R, Shakoori A. Human umbilical cord blood serum, a better alternative of fetal bovine serum. Pakistan J Zool; 2013.45(1).

16. Rauch C, Feifel E, Spötl HP, Amann E-M, Schennach H, Schöffl H, et al., editors. Human Platelet Lysates as a Serum Substitute in Cell Culture Media. Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, June 7-10, 2009; 2012: Springer.

17. Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. ALTEX-Alter Animal Experim; 2003.20(4):275-81.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.4.6.2]