دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و یکم، شماره ۴، صفحه ۳۱۸ - ۳۰۴ (مهر و آبان ۱۳۹۷)

Iran South Med J 2018; 21(4): 304-318

مایع آمنیون حمایت کننده رشد پلاسماسل‌ها

مرضیه بختیاری (MSc)[1*]، سعید کاویانی (PhD)[1**]، سعید آبرون (PhD)[1]، مریم معلمی (MSc)[1]، حسن جلائی‌خو (PhD)[1]

[1] گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۵/۶/۹- پذیرش مقاله: ۹۶/۱۱/۲۵)

چکیده

زمینه: مالتیپل میلوما نوعی سرطان پلاسماسل‌های خون می‌باشد که پیشرفت آن بستگی به تعامل بین سلول بدخیم پلاسماسل و ریز محیط مربوطه دارد که توسط گیرنده‌ها تنظیم می‌شود. هر چند چسبندگی اولیه سلول‌ها و مقاومت به آپوپتوز و افزایش ترشح سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد باعث زنده ماندن، رشد و تکثیر سلول میلوما می‌شود ولی امکان نگهداری سلول‌های میلومایی در محیط آزمایشگاه به راحتی وجود ندارد و با چالش‌های خاصی روبروست و از آنجایی که انجام تحقیقات بر روی میلوما مستلزم بهینه‌سازی و حفظ شرایط کشت آنها در داخل آزمایشگاه می‌باشد، به نظر می‌رسد مایع آمنیوتیک می‌تواند منجر به ارتقا شرایط کشت این سلول‌ها در محیط داخل آزمایشگاه گردد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های میلومایی ۶ بیمار با استفاده از تکنیک MACS جدا شدند. سلول‌ها در محیط کشت شامل RPMI به همراه ۱۰۰ درصد FBS (فعال و غیرفعال) و غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ درصد مایع آمنیوتیک (فعال و غیرفعال) به مدت دو هفته کشت داده شدند. بقای سلولی با استفاده از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو در طی این دو هفته به صورت یک روز در میان اندازه‌گیری شد و در ادامه بیان ژن‌های مربوط به تکثیر (BCL-2)، لانه گزینی (CXCR4) و توقف چرخه سلولی (P27، P21) با استفاده از تکنیک PCR کیفی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که محیط شامل ۲۵ درصد مایع آمنیوتیک غیرفعال به همراه ۱۰ درصد FBS غیر فعال به میزان قابل ملاحظه‌ای تکثیر سلول میلوما را افزایش می‌دهد همچنین در روز صفر (روز جداسازی) همه ژن‌های نامبرده بیان شدند. از طرف دیگر، در همه گروه‌ها، در روز چهارم کشت، ژن‌های BCL-2 و CXCR4 بیان داشته، در حالی که ژن‌های P21 و P27 هیچ بیانی نداشتند که می‌تواند نشان دهنده تأثیر مایع آمنیون بر روی رشد و تکثیر سلول‌های میلومایی باشد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به‌دست آمده، استفاده از محیط، شامل ۲۵ درصد مایع آمنیوتیک غیرفعال به همراه محیط پایه که شامل RPMI و ۱۰ درصد FBS غیرفعال می‌باشد برای کشت سلول‌های میلوما توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: مایع آمنیون، مالتیپل میلوما، پلاسماسل، تکثیر

* تهران، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشگاه علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

Email: kavianis@modares.ac.ir
***ORCID: 0000-0002-6370-916X**
****ORCID:0000-0003-8142-2213**

مقدمه

مالتیپل میلوما نوعی سرطان پلاسماسل‌های خون می‌باشد که پیشرفت بیماری بستگی به تعامل بین سلول بدخیم پلاسماسل و ریز محیط مربوطه دارد که توسط گیرنده‌ها تنظیم می‌شود. چسبندگی اولیه سلول‌ها و مقاومت به آپوپتوز و افزایش ترشح سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد باعث زنده ماندن و رشد و تکثیر سلول میلوما می‌شود (۱). اعتقاد بر این است که مالتیپل میلوما توسط آسیب‌های ژنتیکی مانند جابه جایی‌های کروموزومی ایجاد شده است که این جابه جایی‌های کروموزومی باعث افزایش بیان انکوژن‌ها می‌شود. سیگنال‌هایی که باعث حفظ، بقا و رشد سلول شده تحریک می‌شود و سیگنال‌هایی که سبب آپوپتوز می‌شوند غیرفعال می‌شوند. شناخته شده‌ترین فاکتور رشد سلول میلوما اینترلوکین -۶ می‌باشد که تحریک سلول توسط اینترلوکین -۶ سبب انتقال سیگنال JAK-STAT از طریق ۱۳۰gp گیرنده اینترلوکین -۶ و فسفریلاسیون STAT3 می‌شود (۶-۲).

اینترلوکین -۶ از طریق فسفریلاسیون پروتئین رتینوبلاستوما باعث رشد سلول میلوما شده و به صورت اتوکرین عمل می‌کند. سلول‌های استرومایی مغز استخوان منبع مهم اینترلوکین -۶ هستند و باعث مهار آپوپتوز سلول میلوما می‌شوند (۷). مطالعات نشان داده است که علاوه بر اینترلوکین -۶ سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد دیگری در پاتوژنز مالتیپل میلوما نقش دارند که شامل: فاکتور رشد انسولین (IGF)، فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF)، فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF)، فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) و اینترلوکین -۲۱ می‌باشند. این سیتوکین‌ها از سلول‌های استرومایی، اندوتلیالی و سلول‌های میلومایی ترشح می‌شوند و بقا، رشد و مهاجرت سلول میلومایی و همچنین رگ‌زایی را در ریز محیط مغز استخوان افزایش می‌دهند (۸). یکی دیگر از سیتوکین‌های تنظیمی تکثیر سلول میلومایی اینترلوکین ۱۰ می‌باشد که از طریق تحریک رشد سیگنال‌های ثانویه از جمله انکوستاتین M و اینترلوکین ۱۱ باعث تکثیر سلول میلوما می‌شوند (۹). از دیگر سیتوکین‌های تنظیمی اینترلوکین۲۱می‌باشد که توسط لنفوسیت T تولید می‌شود و تحت تأثیر عملکرد لنفوسیت B و سلول‌های کشنده طبیعی (NK) است (۱۰). فاکتور رشد هپاتوسیت (HGF) که توسط سلول‌های استرومایی مغز استخوان تولید می‌شود نیز می‌تواند منجر به مهاجرت سلول میلوما گردد. گیرنده این فاکتور در پلاسمای مغز استخوان بیماران مالتیپل میلوما افزایش دارد (۱۱). فاکتور رشد اندوتلبال رگی یکی از فاکتورهای ضروری برای اغاز روند رگ‌زایی می‌باشد (۱۲). سلول میلوما به طور مستقیم فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) تولید می‌کند (۱۳). با توجه به مطالب ذکر شده این سلول‌ها برای رشد به محیطی نیاز دارند که فاکتورهای رشد مد نظر را فراهم نماید. تحقیقات نشان داده‌اند که مایع آمنیوتیک انسانی اثر تغذیه‌ای فراوانی دارد چرا که حاوی ۸۴۵ پروتئین مختلف، آب، الکترولیت، پروتئین، پپتید، کربوهیدرات، چربی، هورمون و اسید آمینه‌هایی نظیر: تورین، گلوتامین وطیف گسترده‌ای از فاکتورهای رشد از جمله فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF)[1]، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)[2]، فاکتور تغییر رشد (TGF-β)[3] و همچنین

[1] Fibroblast growth factor
[2] Epidermal growth factor
[3] Transforming growth factor

عوامل ضد میکروبی فعالی مانند آلفا دفنسین‌ها[4]، لاکتوفرین‌ها[5]، لیزوزوم[6]، کالپروتکتین‌ها[7] و کاتلسیدین‌ها[8] می‌باشد (۱۴ و ۱۵) و با توجه به اینکه نگهداری سلول میلوما در محیط آزمایشگاه به راحتی امکان‌پذیر نیست و تاکنون هیچ‌گونه محیط کشتی جهت رشد و تکثیر سلول میلوما طراحی نشده است و به دلیل لزوم انجام تحقیقات داخل آزمایشگاهی و همچنین به منظور بررسی اثر داروهای شیمی درمانی بر روی سلول‌های اولیه تصمیم گرفتیم محیطی را طراحی کنیم که به شرایط فیزیولوژیک بدن نزدیک‌تر باشد و امکان رشد این سلول را در محیط آزمایشگاه به وجود آورد به همین علت مایع آمنیون مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های آسپیراسیون مغز استخوان

نمونه‌های آسپیراسیون مغز استخوان ۶ بیمار مبتلا به مالتیپل میلوما مراجعه کننده به بخش هماتولوژی بیمارستان‌های ارتش و امام خمینی در لوله‌های خلا استریل حاوی ضد انعقاد EDTA به مقدار ۶ سی‌سی بر اساس پروتکل روتین درمان گرفته شد که اضافه نمونه تشخیصی بود و بلافاصله سلول‌های میلومایی این بیماران با استفاده از تکنیک MACS جدا شد.

جدول۱) مشخصات مربوط به بیماران مبتلا به مالتیپل میلوما

شماره بیمار	سن	جنس	تشخیص	نوع نمونه	درصد پلاسماسل
P۱	۵۸	زن	مالتیپل میلوما	آسپیراسیون مغز استخوان	۵۰
P۲	۶۱	مرد	مالتیپل میلوما	آسپیراسیون مغز استخوان	۶۰
P۳	۶۱	زن	مالتیپل میلوما	آسپیراسیون مغز استخوان	۶۵
P۴	۷۷	مرد	مالتیپل میلوما	آسپیراسیون مغز استخوان	۸۵
P۵	۵۴	زن	مالتیپل میلوما	آسپیراسیون مغز استخوان	۹۰
P۶	۳۲	زن	مالتیپل میلوما	آسپیراسیون مغز استخوان	۷۰

جمع‌آوری مایع آمنیون و نحوه استریل شدن

نمونه‌های مایع آمنیون از ۱۵ سزارین مختلف گرفته شد و در دور g۱۰۰۰۰ به مدت ۱ ساعت و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از سانتریفوژ یخچال دار سانتریفوژ شدو از کاغذهای صافی استریل عبور داده شد و پس از آن ۲ مرتبه از فیلترهای ۰/۲۲ عبور داده شد که این کار باعث استریل شدن مایع آمنیون شد.

نحوه غیرفعال شدن سرم FBS و مایع آمنیون

میکروتیوپ‌های حاوی FBS و مایع آمنیون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بلافاصله به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از این مرحله سرم‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و در نهایت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

[4] alpha defnesin
[5] lactopherin
[6] lysosom
[7] calprotectin
[8] catlsidin

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای نمونه مغز استخوان

آسپیراسیون مغز استخوان به نسبت ۷ به ۱ (۷ سی‌سی نمونه مغز استخوان با ۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی) رقیق شد و نمونه مغز استخوان به آرامی روی فایکول ریخته شد و در دور g۴۴۵ (برای مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد.

جداسازی پلاسما سل‌ها (CD 138)

۸ میکرولیتر آنتی‌بادی CD138 میکروبید به رسوب سلولی اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴-۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سلول‌ها را با اضافه کردن ۲-۱ میلی‌لیتر بافر شستشو داده و در دور ۳۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ نموده و در مرحله بعد سوسپانسیون سلولی از ستون LS عبور داده شد.

تأیید سلول‌ها با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری

بعد از جداسازی سلول‌های پلاسماسل (CD138) توسط تکنیک MACS، برای تعیین خلوص سلول‌ها بلافاصله بعد از جداسازی فلوسایتومتری در روز صفر انجام شد.

کشت سلول‌ها

پلاسماسل‌ها در محیط‌های کشت حاوی مایع آمنیون در ۴ گروه متفاوت به مدت ۲ هفته متوالی کشت داده شد و تعداد سلول‌های هر گروه به صورت یک روز در میان شمارش شد.

گروه اول، یعنی کنترل حاوی RPMI و FBS ۱۰ درصد (محیط پایه)

گروه دوم، حاوی: محیط پایه و Amnion fluid ۱۰ درصد

گروه سوم، حاوی محیط پایه و Amnion fluid ۲۵ درصد

گروه چهارم، حاوی محیط پایه و Amnion fluid ۵۰ درصد. در سه بیمار اول مورد مطالعه FBS ۱۰ درصد و Amnion fluid مورد استفاده Active بوده و در سه بیمار آخر مورد مطالعه FBS ۱۰ درصد و Amnion fluid مورد استفاده Inactive بوده است.

استخراج RNA

در روزهای صفر و چهارم کشت سلولی با استفاده از کیت شرکت سینا ژن استخراج RNA صورت گرفت و بعد از آن آماده‌سازی RNA برای سنتز cDNA صورت گرفت.

جدول۲) مشخصات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده

نام	توالی	طول محصولات
CDKN1A-F(P21)	CCA GCA TGA CAG ATT TCT ACC	۱۵۰
CDKN1A-R(P21)	AGA CAC ACA AAC TGA GAC TAA GG	
H CXCR4(F) Both variants	CGC CAC CAA CAG TCA GAG	۱۷۶
H CXCR4(R) Both variants	AAC ACA ACC ACC CAC AAG TC	
H-P27 – F	CA ACC GAC GAT TCT TCT AC	۲۰۴
H-P27 – R	TGT ATA TCT TCC TTG CTT CAT C	۲۰۴
H-BCL2-F	CAGGATAACGGAGGCTGGGATG	۷۰
H-BCL2-R	AGAAATCAAACAGAGGCCGCA	
HPRT1 – F	CCT GGC GTC GTG ATT AGT G	۱۲۵
HPRT1 – R	TCA GTC CTG TCC ATA ATT AGT CC	

سنتز cDNA

با استفاده از کیت cDNA سازی خریداری شده از شرکت یکتا تجهیز بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت از RNA، CDNA ساخته شد.به طور خلاصه، در ابتدا به محلول حاوی RNA ۱ میکرولیترRandom Hexamer اضافه کرده و میکروتیوپ را ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد اینکوبه نموده سپس مخلوط بافر آماده گردید که شامل ۴ میکرولیتر first standard buffer ، ۱ میکرولیتر Dntp، ۱ میکرولیتر m-mlv می‌باشد. مخلوط بافر را درون هر میکروتیوپ ریخته و ۱۴ میکرولیتر از نمونه را به مخلوط بافر اضافه کردیم و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن cDNA در دمای ۲۰- و ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

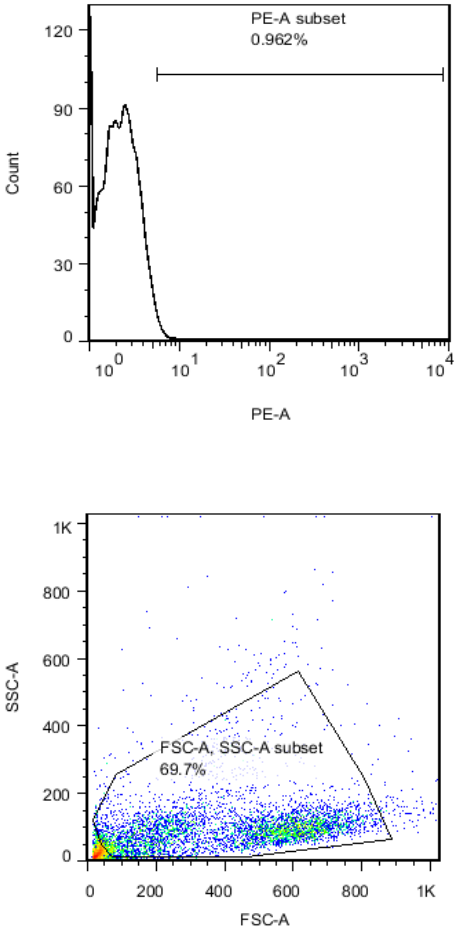
PCR

برای انجام PCR پس از دفریز شدن معرف‌ها با توجه به تعداد نمونه‌ها Master mix تهیه شود. محلول PCR شامل ۱۰ میکرولیتر Master mix amplicon، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر، ۱ میکرولیتر CDNA، ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر می‌باشد و پس از این مرحله الکتروفورز نمونه‌ها صورت گرفت.

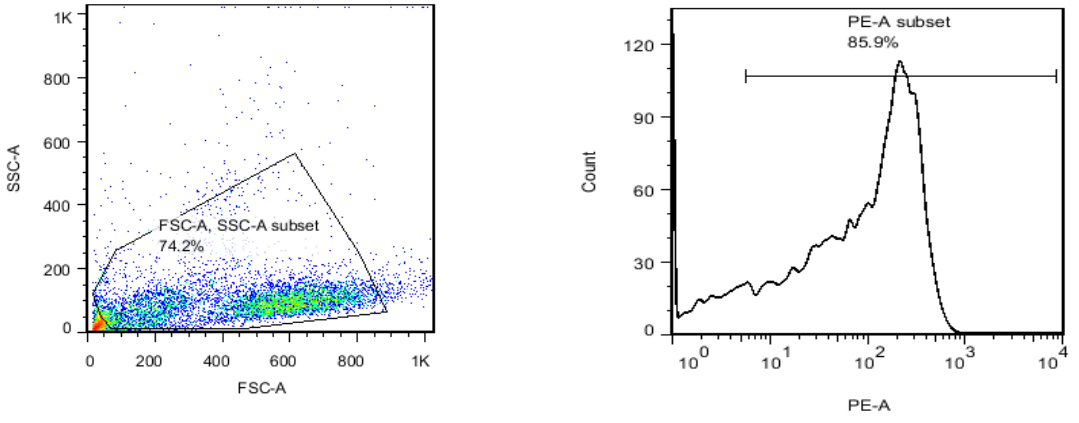
یافته‌ها

این تحقیق حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون با کد اخلاق **IR.TMU.REC. ۱۳۹۴ .۶۶** می‌باشد که در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد و در تاریخ ۱۳۹۵/۴/۹ به ثبت رسید.

در ابتدا پلاسماسل‌ها از مغز استخوان ۳ بیمار مبتلا به مالتیپل میلوما با استفاده از تکنیک MACS جدا شد، پس از جداسازی برای تأیید این که سلول‌های جدا شده پلاسما سل هستند از تکنیک فلوسایتومتری در روز صفر استفاده شد که این مرحله فقط برای نمونهٔ بیمار اول و دوم انجام گرفت برای اینکه نشان دهیم فرایند جداسازی پلاسماسل به صورت دقیق انجام می‌شود که نتایج آن به شرح زیر می‌باشد.



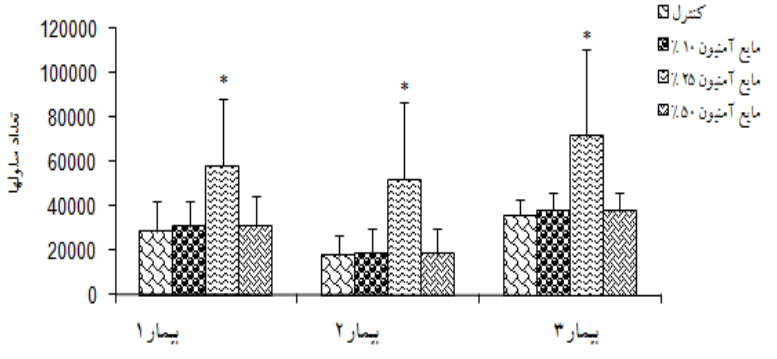
نمودار ۱) نتایج فلوسایتومتری مربوط به نمونه بیمار اول



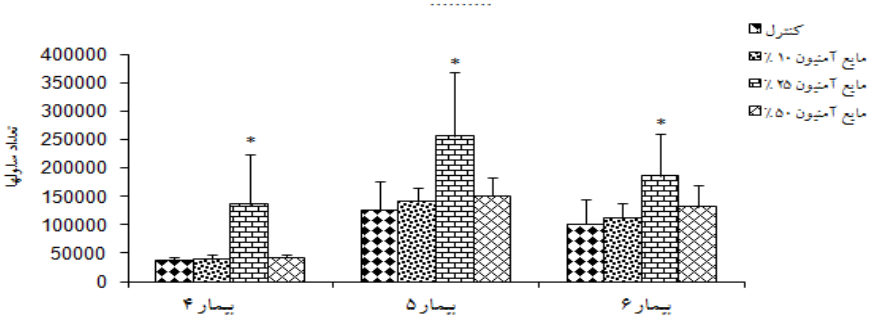
نمودار۲) نتایج فلوسایتومتری مربوط به نمونه بیمار دوم

در نمودارهای ۱ و ۲ مشاهده می‌شود که جمعیت بیشتری از سلول‌ها پلاسماسل می‌باشد. بعد از تأیید پلاسماسل‌ها کشت سلول‌ها در ۳ گروه مختلف محیطی که شامل غلظت‌های مختلف مایع آمنیون Active (۱۰، ۲۵ و ۵۰ درصد) به همراه RPMI و FBSActive ۱۰ درصد در کنار یک محیط پایه که حاوی RPMI و FBS ۱۰ درصد می‌باشد به مدت ۲ هفته متوالی مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه حاصل از این مطالعه نشان داد که رشد و تکثیر سلول‌ها در هفته اول روند رو به افزایش داشته و بیشترین تعداد سلول‌ها را در محیط مایع آمنیون ۲۵ درصد داریم و می‌توان گفت غلظت مؤثر استفاده از مایع آمنیون غلظت ۲۵ درصد می‌باشد. و در هفته دوم به شدت از تعداد سلول‌ها کاسته شده و شاهد یک روند روبه کاهش در هفته دوم هستیم. همچنین مشاهده شد که در هفته دوم سلول‌ها درون محیط کشت لیز شده و متلاشی می‌شوند که به دلیل حضور عوامل کمپلمان و دیگر فاکتورهای مهاجم این پدیده رخ می‌دهد. به منظور رفع این مشکل تصمیم گرفته شد مایع آمنیون و FBS مورد استفاده در پروژه In active شود. در واقع با این کار می‌توان عوامل کمپلمان و دیگر فاکتورهای مهاجم را حذف کرده و شرایط را برای رشد پلاسماسل‌ها مساعد نمود. سپس رشد و تکثیر پلاسماسل‌های جدا شده از مغز استخوان ۳ بیمار دیگر مبتلا به مالتیپل میلوما با استفاده از تکنیک MACS در۳ گروه مختلف محیطی که شامل غلظت‌های مختلف مایع آمنیون Inactive (۱۰، ۲۵، ۵۰ درصد) به همراه RPMI و ۱۰ درصد FBS Inactive در کنار یک محیط پایه که حاوی RPMI و ۱۰ درصد FBS می‌باشد به مدت ۲ هفته متوالی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعات نشان داد که پلاسماسل‌ها می‌توانند به صورت افزایشی در گروه‌های حاوی مایع آمنیون Inactive به مدت ۲ هفته متوالی رشد و تکثیر کنند. البته در این مطالعه هم بیشترین تکثیر در محیط مایع آمنیون ۲۵ درصد بوده که نشان می‌دهد غلظت مؤثر استفاده از مایع آمنیون ۲۵ درصد می‌باشد. در محیط پایه که فاقد مایع آمنیون بوده و فقط حاوی RPMI و ۱۰ درصد FBS Inactive می‌باشد در کمتر از ۵ روز سلول‌ها روند افزایشی را داشته و مابقی روزها

تعداد سلول‌ها رو به کاهش بوده که نشان می‌دهد نمی‌توان از محیط RPMI برای حفظ طولانی مدت پلاسماسل‌ها استفاده کرد. همچنین استفاده از غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ درصد مایع آمنیون نشان داد که سلول‌ها روند رو به افزایش آهسته و تدریجی را دارند و تعداد سلول‌ها در این دو محیط افزایش شدید پیدا نمی‌کند و در نهایت نیز بیان ژن‌های مرتبط با تکثیر (BCL-2)، لانه گزینی (CXCR4) و توقف چرخه سلولی (P21-P27) در روزهای مختلف یعنی روز صفر و روز چهارم مورد بررسی گرفت: مطالعه بیان ژن‌ها در روز صفر یعنی دقیقاً بعد از جداسازی سلول‌ها با استفاده از تکنیک MACS نشان داد که هر ۴ ژن مربوطه بیان داشته و مطالعات قبلی نیز بیان این ژن‌ها را نشان داده‌اند و اما مطالعه بیان ژن‌ها در روز چهارم که از سلول‌های محیط کشت کنترل و محیط کشت مایع آمنیون ۲۵ درصد استفاده شده نشان می‌دهد که ژن‌های مرتبط با توقف چرخه سلولی یعنی (p21-p27) خاموش شده است. از طرفی ژن‌های مرتبط با تکثیر (BCL-2) و لانه‌گزینی (CXCR4) بیان داشته که نشان دهنده این است که سلول‌ها درون محیط کشت تکثیر داشته‌اند و بقای خود را حفظ کرده‌اند.



نمودار ۳) نمودار نتایج حاصل از میزان تکثیر پلاسماسل ۳ بیمار مختلف در محیط‌های با غلظت‌های مختلف مایع آمنیون Active. داده‌ها به صورت میانگین ± SD در شش روز نشان داده شده است P<۰/۰۵* در مقایسه با نتایج کنترلی

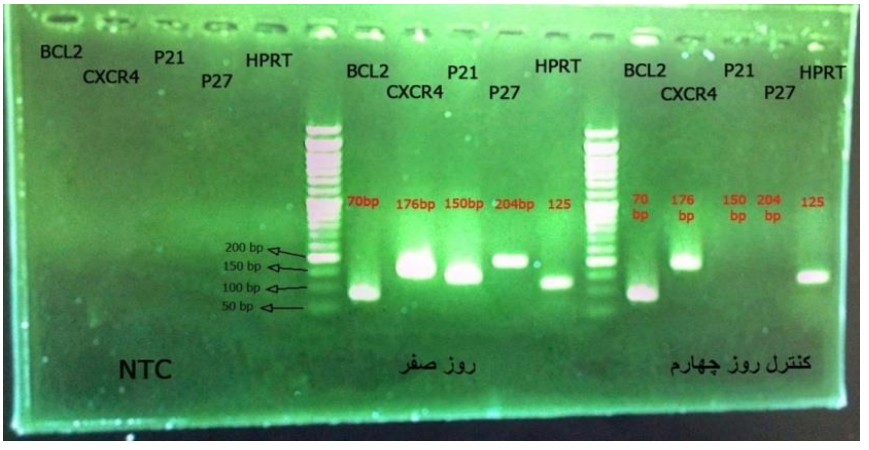


نمودار ۴) نمودار نتایج حاصل از میزان تکثیر پلاسماسل ۳ بیمار مختلف در محیط‌های با غلظت‌های مختلف مایع آمنیون Inactive. داده‌ها به صورت میانگین ± SD در شش روز نشان داده شده است. P<۰/۰۵* در مقایسه با نتایج کنترلی

نتایج بیان ژن‌ها در سلول‌های پلاسماسل ۳ گروه مطالعاتی در شرایط Inactive مشابه بود که نتایج بیان این ژن‌ها به صورت زیر می‌باشد:

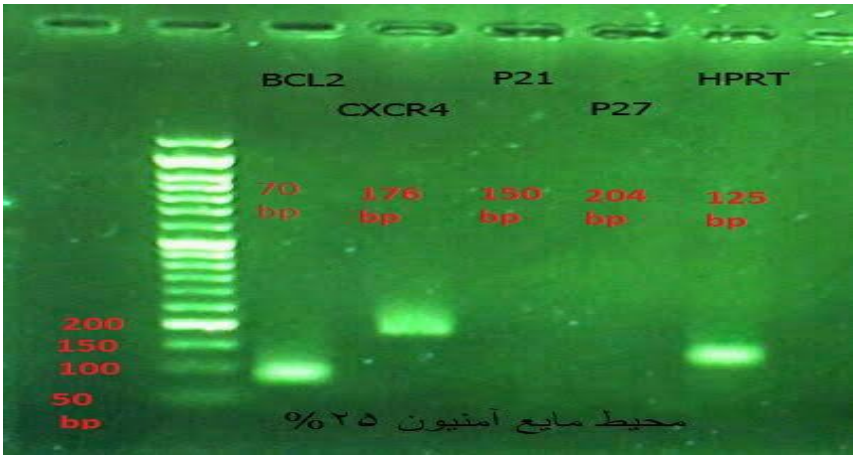
در روز صفر، ژن‌های BCL2، CXCR4، P21 و P27، HPRT بیان داشتند.

در روز چهارم، سلول‌های گروه کنترل، ژن‌های BCL2CXCR4 و HPRT را بیان نمودند اما ژن‌های P21 و P27 بیان نداشتند. همچنین سلول‌های محیط مایع آمنیون ۲۵ درصد inactive همراه با RPMI و FBSinactive ۱۰٪ درصد ژن‌های BCL2CXCR4 و HPRT را بیان نمودند و ژن‌های P21 و P27 بیان نداشتند.



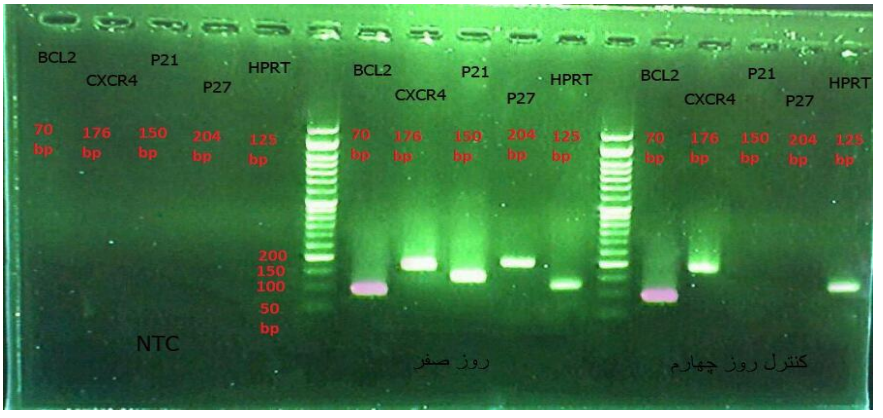
شکل ۱) نتایج بیان ژن‌ها در سلول‌های پلاسماسل بیمار چهارم در روز صفر بعد از جداسازی از سلول‌های محیط کشت پایه

Fig 1) The results of gene expression in the plasma cells of the fourth patient on day zero after separation from the cell culture medium



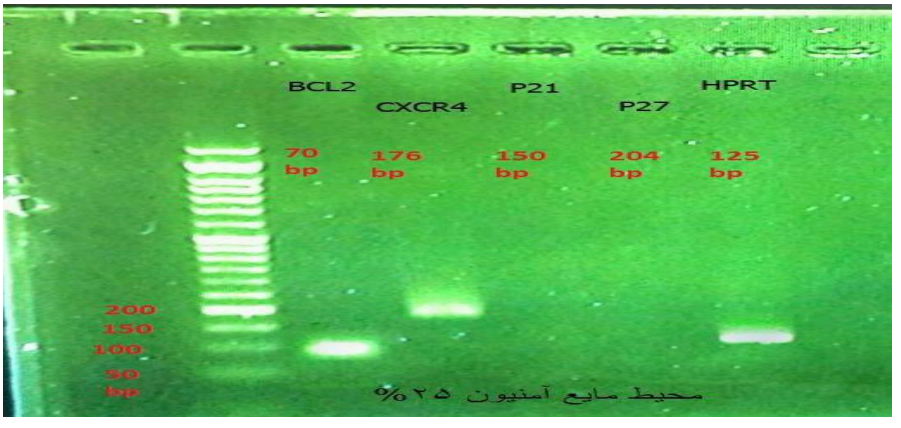
شکل ۲) نتایج بیان ژن‌ها در سلول‌های پلاسماسل بیمار چهارم در روز چهارم کشت سلول، محیط مایع آمنیون ۲۵ درصد Inactive

Fig 2) Results of gene expression in Plasma Cell Cells on the fourth day of cell culture, amniotic fluid medium 25% inactive



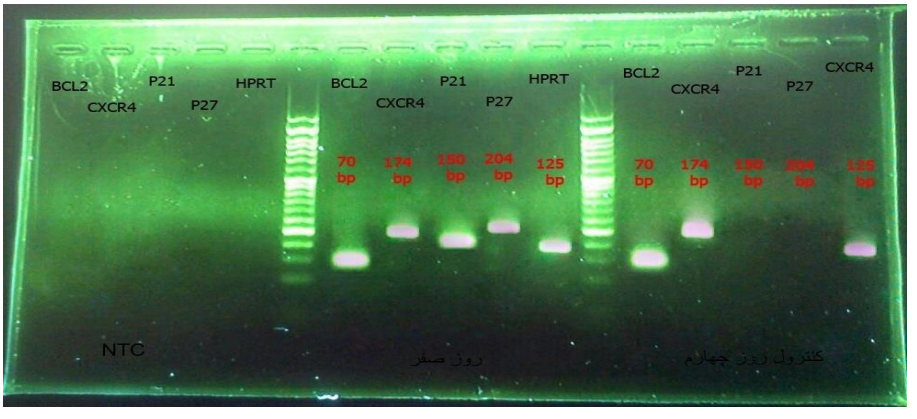
شکل ۳) نتایج بیان ژن‌ها در سلول‌های پلاسماسل بیمار پنجم در روز صفر بعد از جداسازی از سلول‌های محیط کشت پایه

Fig 3) The results of gene expression in the patient's cellular plasmacle cells on day zero after isolation from cell culture medium



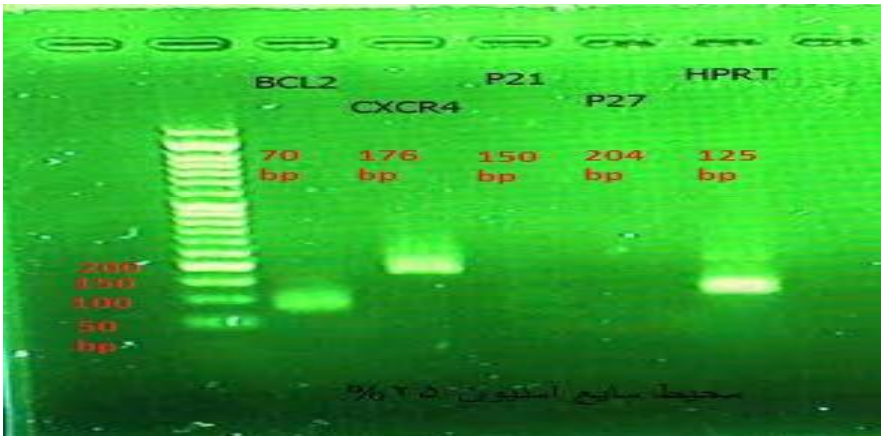
شکل ۴) نتایج بیان ژن‌ها در سلول‌های پلاسماسل بیمار پنجم در روز چهارم کشت سلول، محیط مایع آمنیون ۲۵ درصد Inactive

Fig 4) Results of gene expression in patient cell-free plasma cells on cell culture day 4, amniotic fluid medium 25% inactive



شکل ۵) نتایج بیان ژن‌ها در سلول‌های پلاسماسل بیمار ششم در روز صفر بعد از جداسازی از سلول‌های محیط کشت پایه

Fig 5) shows the results of the expression of the plasma cells in the plasma on the zero day after separation from the cell culture medium



شکل ۶) نتایج بیان ژن‌ها در سلول‌های پلاسماسل بیمار ششم در روز چهارم کشت سلولی از محیط مایع آمنیون ۲۵ درصد Inactiv

Fig 6) The results of gene expression in the Plasma Cell Cell on its fourth day of cell culture from an Amniotic fluid medium of 25% Inactiv

بحث

پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر مایع آمنیون بر روی رشد و تکثیر سلول‌های میلوما در محیط آزمایشگاه انجام می‌شود. از آنجائیکه بیشتر کارهای تحقیقاتی در زمینه بیماری مالتیپل میلوما بر روی Cell lineها انجام می‌شود و مسلماً نتیجه کار رضایت بخش نیست سعی بر آن است تا محیط کشتی برای رشد پلاسما سل‌های بدخیم جدا شده از بیماران (Primery cell) در محیط آزماشگاه فراهم شود تا بتوانیم پلاسماسل‌های جدا شده از بیماران مالتیپل میلوما را در این محیط نگهداری کنیم و تمامی کارهای تحقیقاتی در زمینه این بیماری را بر روی پلاسماسل‌های حاصل از مغز استخوان خود بیماران انجام دهیم تا نتیجه بهتری بگیریم. همان‌طور که می‌دانید این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه عمر چندانی نداشته و نگهداری و تکثیر این سلول‌ها در Invitro با مشکل مواجه است با توجه به اینکه تاکنون هیچگونه محیط کشتی جهت رشد و تکثیر سلول‌های میلومایی موفق نبوده است و نمی‌توان اثر داروهای شیمی درمانی را بر روی سلول‌های میلومایی گرفته شده از بیمار (primery cell) مورد سنجش قرار داد. امید است که بتوان محیطی را فراهم کرد که از نظر شرایط فیزیولوژیکی مشابه با شرایط بدن باشد و در این محیط پلاسماسل بتواند رشد و تکثیر و بقا خود را حفظ کند. محیط کشت مورد استفاده باید دارای خصوصیاتی باشد که در این مقاله چندین مورد از آن را بیان نموده ایم.

محیط‌های کشت مصنوعی با افزودن مواد مغذی (هر دو آلی و غیرآلی)، ویتامین‌ها، نمک، فاز O_2 و گازCO_2، پروتئین‌های سرم، کربوهیدرات‌ها، کافاکتورها برای یک یا چند مورد از اهداف ذیل طراحی شده است: ۱) بقای کوتاه مدت (یک محلول نمک متعادل با pH خاص و فشار اسمزی خاص). ۲) بقای طولانی مدت (یک محلول نمکی متعادل با ترکیبات مختلف ترکیبات آلی و سرم جنین گاوی شایع‌ترین مکمل در محیط کشت سلول‌های حیوانی است و این یک مکمل کم هزینه برای ارائه یک محیط کشت مطلوب می‌باشد.) حضور سرم در رسانه‌ها دارای اشکالات فراوانی است و می‌تواند به اشتباهات جدی در مطالعات ایمونولوژی منجر شود (۱۶ و ۱۷).

محیط کشت، RPMI-1640 بدون نیاز به پروتئین و پروتئین مکمل در صورت لزوم ارائه می‌شود که این محیط کشت شامل مخلوطی از اسیدهای آمینه، گلوکز، نمک، ویتامین‌ها و مواد مغذی دیگر است و به صورت پودری یا به صورت مایع از شرکت‌های تجاری عرضه می‌شود (۱۸ و ۱۹). تنظیم pH برای شرایط کشت مطلوب حیاتی است و به طور کلی توسط یکی از دو سیستم بافر به دست می‌آید:

سیستم بافری طبیعی

در یک سیستم بافر طبیعی، CO_2 با محتوای HCO_3/CO_3 در محیط کشت ذخیره می‌شود. کشت با یک سیستم بافر طبیعی بایستی در محیط هوای تا ۱۰ درصد CO_2 نگهداری شود که معمولاً توسط یک انکوباتور CO_2 نگهداری می‌شود. سیستم بافر طبیعی هزینه کمی دارد و غیر سمی است (۲۰ و ۲۱).

سیستم بافری شیمیایی با استفاده از zwitterion

HEPES دارای ظرفیت بافری در محدوده pH ۷/۲–۷/۴ است و نیازی به گازهای کنترل شده ندارد و برای برخی از انواع سلول‌ها نسبتاً گران و سمی است. همچنین HEPES حساسیت محیط‌ها به اثرات فوتوتوکسیک ناشی از قرار گرفتن در معرض نور فلورسنت را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد (۲۲). فنول قرمز به عنوان یک شاخص pH، مانیتورینگ ثابت pH را ارائه می‌نماید (۲۳). اسید آمینه‌های ضروری باید در محیط کشت قرار بگیرند، زیرا سلول‌ها نمی‌توانند آن را سنتزکنند. همچنین کربوهیدرات‌ها به شکل قندها منبع اصلی انرژی هستند. بسیاری از ویتامین‌ها برای رشد و تکثیر سلول‌ها ضروری هستند. عناصری مانند مس، روی، سلنیوم، عناصر شیمیایی هستند که در مقادیر مناسب برای رشد سلول مورد نیاز هستند، این مواد مغذی برای بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک برای مثال حفظ عملکرد آنزیم‌ها ضروری می‌باشند (۲۴) آنتی‌بیوتیک‌ها اگر چه برای رشد سلول لازم نیستند اما اغلب برای کنترل رشد آلاینده‌های باکتری و قارچی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۵).

با توجه به اینکه مایع آمنیون اثرات تغذیه‌ای فراوان داشته و حاوی تمامی فاکتورهای رشد مورد نیاز برای رشد پلاسماسل می‌باشد، می‌تواند باعث نگهداری، رشد و تکثیر این سلول در محیط Invitro شود. از طرفی این محیط شرایطی مشابه با شرایط فیزیولوژیک بدن برای نگهداری پلاسماسل ایفا می‌کند. استفاده از مایع آمنیون می‌تواند در شرایط Invitro باعث زنده ماندن پلاسماسل‌ها به مدت ۲ هفته متوالی شود چرا که حاوی تمامی این عوامل و فاکتورهاست.در مطالعات گذشته نیز اثر مایع آمنیوتیک بر روی سلول‌های اندوتلیال بافت قرنیه انجام شده که مایع آمنیون به دلیل دارا بودن فاکتورهای رشد متعدد و مواد مغذی غنی از جمله فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، عامل رشد فیبروبلاست عمومی (FGF)، فاکتور رشد عصبی (NGF) سلولی به عنوان یک تحریک کننده مؤثر توسعه سلول اجدادی شبکیه از شبکیه اپیتلیوم رنگدانه به کار می‌رود. مایع آمنیون تقریباً PH طبیعی دارد (۷/۲) و فشار اسموتیک آن در محدوده فیزیولوژیک است بنابراین یک محیط مناسب برای تکثیر سلول‌ها فراهم می‌کند. جهت مشخص کردن محتوای مایع آمنیون مطالعات مختلفی صورت گرفته‌اند. چو (Cho) و همکاران، مقادیر فراوان پروتئین را در مایع آمنیوتیک در ۱۸–۱۶ هفته حاملگی شناسایی کردند که شامل: آلبومین، فیبرونکتین، سروترانسفرین، کمپلمان C3، سرولوپلاسمین و TGF بتا می‌باشد. کمپلمان C3 عاملی در مایع آمنیون است که مسئول بازسازی بافت آسیب دیده می‌باشد. پلاسمینوژن

در تکثیر سلولی و بهبود زخم مؤثر است. سایر پروتئین‌های موجود در مایع آمنیون شامل: سرولوپلاسمین، سروترانسفرین، آپولیپوپروتئین A و آلبومین برای هموستاز و انتقال سلولی ضروری می‌باشد. نتایج این مطالعه دال بر این است که غلظت‌های بالاتر این مایع تکثیر سلول‌ها را مهار می‌کند. شاید اثر عوامل مهاری نسبت به عوامل رشد در غلظت‌های بالاتر بیشتر باشد. تنها کار مشابه با این تحقیق کشت سلول های اندوتلیال قرنیه در محیط مایع آمنیون می باشد که یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که مایع آمنیون ۲۰ درصد باعث افزایش توانای تکثیر و حفظ مورفولوژی سلول‌های اندوتلیال قرنیه می‌شود (۲۶). کشت پلاسما سل‌ها با اهداف مختلفی چون بررسی بدخیمی پلاسما سل، بیماری‌های خود ایمنی، تعیین پاسخ آنتی‌بادی نسبت به آنتی ژن خاص و در نهایت تهیه آنتی بادی درمانی انسانی انجام شد (۲۷).

نتیجه‌گیری

اولین یافته‌ای که از پژوهش حاضر به‌دست آمد این بود که رشد و تکثیر پلاسماسل‌های جدا شده از مغز استخوان ۳ بیمار مبتلا به مالتیپل میلوما با استفاده از تکنیک MACS در ۴ گروه مختلف محیطی که شامل غلظت‌های مختلف مایع آمنیون Active (۱۰، ۲۵، ۵۰ درصد) به همراه RPMI و ۱۰ درصد FBS Active در کنار یک محیط کنترل که حاوی RPMI و ۱۰ درصد FBS می‌باشد به مدت ۲ هفته متوالی مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه حاصل از این مطالعه نشان داد که رشد و تکثیر سلول‌ها در هفته اول روند رو به افزایش داشته و بیشترین تعداد سلول‌ها را در محیط مایع آمنیون ۲۵ درصد داریم و می‌توان گفت غلظت مؤثر استفاده از مایع آمنیون غلظت ۲۵ درصد می‌باشد. و در هفته دوم به شدت از تعداد سلول‌ها کاسته شده و شاهد یک روند روبه کاهش در هفته دوم هستیم. همچنین مشاهده شد که در هفته دوم سلول‌ها درون محیط کشت لیز شده و متلاشی می‌شوند که به دلیل حضور عوامل کمپلمان و دیگر فاکتورهای مهاجم این پدیده رخ می‌دهد. به منظور رفع این مشکل تصمیم گرفته شد مایع آمنیون و FBS مورد استفاده در پروژه In active شود. در واقع با این کار می‌توانیم عوامل کمپلمان و دیگر فاکتورهای مهاجم را حذف کرده و شرایط را برای رشد پلاسماسل‌ها مساعد نماییم.

در مطالعه بعدی رشد و تکثیر پلاسماسل‌های جدا شده از مغز استخوان ۳ بیمار مبتلا به مالتیپل میلوما با استفاده از تکنیک MACS در ۴ گروه مختلف محیطی که شامل غلظت‌های مختلف مایع آمنیون Inactive (۱۰، ۲۵، ۵۰ درصد) به همراه RPMI و ۱۰ درصد FBS Inactive در کنار یک محیط کنترل که حاوی RPMI و ۱۰ درصد FBS می‌باشد به مدت ۲ هفته متوالی مورد بررسی قرار گرفت. که نتایج حاصل از این مطالعات نشان داد که پلاسماسل‌ها می‌توانند به صورت افزایشی در گروه‌های حاوی مایع آمنیون Inactive به مدت ۲ هفته متوالی رشد و تکثیر کنند. البته در این مطالعه هم بیشترین تکثیر در محیط مایع آمنیون ۲۵ درصد بوده که نشان می‌دهد غلظت مؤثر استفاده از مایع آمنیون ۲۵ درصد می‌باشد. در محیط کنترل که فاقد مایع آمنیون بوده و فقط حاوی RPMI و ۱۰ درصد FBS Inactive می‌باشد در کمتر از ۵ روز سلول‌ها روند افزایشی را داشته و مابقی روزها تعداد سلول‌ها رو به کاهش بوده که نشان می‌دهد، نمی‌توان از محیط RPMI برای حفظ طولانی مدت پلاسماسل‌ها استفاده کرد. همچنین استفاده از غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ درصد مایع آمنیون نشان داد که سلول‌ها روند رو به افزایش آهسته و تدریجی را دارند و تعداد سلول‌ها

در این دو محیط افزایش شدید پیدا نمی‌کند.

در مطالعه آخر نیز بیان ژن‌های مرتبط با تکثیر (BCL-2)، لانه گزینی (CXCR4) و توقف چرخه سلولی (P21-P27) در روزهای مختلف یعنی روز صفر و روز چهارم مورد بررسی گرفت:

مطالعه بیان ژن‌ها در روز صفر یعنی دقیقاً بعد از جداسازی سلول‌ها با استفاده از تکنیک MACS نشان داد که هر ۴ ژن مربوطه بیان داشته و مطالعات قبلی نیز بیان این ژن‌ها را نشان داده‌اند. و اما مطالعه بیان ژن‌ها در روز چهارم که از سلول‌های محیط کشت کنترل و محیط کشت مایع آمنیون ۲۵ درصد استفاده شده نشان می‌دهد که ژن‌های مرتبط با توقف چرخه سلولی یعنی Cell cycle(p21-p27) arrest خاموش شده که می‌توان نتیجه گرفت مایع آمنیون باعث تکثیر پلاسماسل‌ها شده و تأییدی بر این فرضیه می‌باشد. از طرفی ژن‌های مرتبط با تکثیر (BCL-2) و لانه گزینی (CXCR4) بیان داشته اند. با بررسی بیان ژن‌ها نیز ثابت شد که استفاده از این محیط برای نگهداری پلاسماسل‌ها کارآمد بوده و می‌توان به مدت ۲ هفته این سلول‌ها را در شرایط آزمایشگاهی نگهداری کرد.

این تحقیق که حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم مرضیه بختیاری است با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده در رشته خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون می‌باشد.

سپاس و قدردانی

از زحمات جناب آقای دکتر صفایی رئیس بخش خون بیمارستان امام خمینی واقع در تهران که ما را در تهیه نمونه های مغز استخوان یاری فرمودند.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Tohami T, Drucker L, Shapiro H, et al. Overexpression of tetraspanins affects multiple myeloma cell survival and invasive potential. The FASEB Journal 2007; 21(3): 691-9.
2.Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma A Workshop Report. Cancer research 2004; 64(4): 1546-58.
3.Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, et al. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. Blood 2004; 104(3): 607-18.
4.Hideshima T, Podar K, Chauhan D, et al. Cytokines and signal transduction. Best Practice & Research Clinical Haematology 2005; 18(4): 509-24.
5.Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. Immunity 1999; 10(1): 105-15.
6.Kawano M, Hirano T, Matsuda T, et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. 1988; 332: 83-5.
7.Urashima M, Ogata A, Chauhan D, et al. Interleukin-6 promotes multiple myeloma cell growth via phosphorylation of retinoblastoma protein. Blood 1996; 88(6): 2219-27.
8.Vaghef N, Abroun S, Kaviani S, Alimoghadam K, Rostami S, Sadeghi B, et al. The role of leptin in pathophysiology of myeloma cells. Yakhteh 2010; 12(3):319-28.
9.Otsuki T, Yata K, Sakaguchi H, Wada H, Sugihara T, Ueki A. Cell biological roles of IL-10 in myeloma cells. Journal of Clinical and Experimental Hematopathology 2002;42(1):1-9.
10.Brenne A-T, Ro TB, Waage A, Sundan A, Borset M, Hjorth-Hansen H. Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells. Blood 2002;99(10):3756-62.

11.Holt RU, Fagerli U-M, Baykov V, RøTB, Hov H, Waage A, et al. Hepatocyte growth factor promotes migration of human myeloma cells. haematologica 2008;93(4):619-22.

12.Uehara H, Izumi K, Effect of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR1) on growth of human prostate cancer cells in the bone of nude mice. CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS; 2007: SPRINGER VAN 2007; 24(4): 286

13.Giuliani N, Colla S, Lazzaretti M, et al. Proangiogenic properties ofhuman myeloma cells: production of angiopoietin-1 and its potential relationship to myeloma-induced angiogenesis. Blood 2003; 102(2): 638-45.

14.Bazrafshan A, Owji M, Yazdani M, et al. Activation of mitosis and angiogenesis in diabetes-impaired wound healing by processed human amniotic fluid. Journal of Surgical Research 2014;188(2): 545-52.

15..Cho C-KJ, Shan SJ, Winsor EJ, et al. Proteomics analysis of human amniotic fluid. Molecular & Cellular Proteomics 2007; 6(8): 1406-15.

16.Kerbel R, Blakeslee D. Rapid adsorption of a foetal calf serum component by mammalian cells in culture. A potential source of artifacts in studies of antisera to cell-specific antigens. Immunology. 1976; 31(6): 881-91.

17.Sula K, Draber P, Nouza K. Addition of serum to the medium used for preparation of cell suspensions as a possible source of artifacts in cell-mediated reactions studied by means of the popliteal lymph node test. J Immunogenet 1980; 7(6): 483-9.

18.Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 5th ed. New York: Wiley, 2005, 1-696.

19.Heby O, Emanuelsson H. Role of the polyamines in germ cell differentiation and in early embryonic development. Med Biol. 1981; 59(5-6): 417-22.

20.Howorth PJ. The physiological assessment of acid-base balance. Br J Dis Chest 1975; 69: 75-102.

21.Rothblat GH, Cristofalo VJ. Growth, nutrition, and metabolism of cells in culture. New York: Academic Press, 1972, 1-1464.

22.Zigler J, Lepe-Zuniga J, Vistica B, et al. Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. In Vitro Cell Dev Biol 1985; 21(5): 282-7.

23.Reznikov BF. Incubation of Brucella on solid nutrient media with a phenol red indicator. Veterinariia 1972; 7: 109-10.

24.Sternberg J, Benoit J, Mercier A, et al. ROLE OF SOME TRACE ELEMENTS (ZINC AND COBALT) IN THE GROWTH OF B.C.G. Rev Can Biol 1964; 23: 353-65.

25.Perlman D. Use of antibiotics in cell culture media. Methods Enzymol 1979;58:110-6.

26.Feizi S, Soheili Z, Bagheri A, et al. Effect of Amniotic Fluid on the Invitro Culture of Human Corneal Endothelial Cells. Experimental Eye Research 2014; 122: 132-40

27.Lane BP, Miller SL. Preparation of large numbers of uniform tracheal organ cultures for long term studies. In Vitro. 1976; 12(2): 147-54.

Iran South Med J 2018; 21(4): 304-318

Original Article

Amniotic Fluid that Supports the Growth of Plasma Cells

M. Bakhtiari (MSc)[1*], S. Kaviani (PhD)[1**], S. Abroon (PhD)[1], M. Moallemi (MSc)[1], H. Jalaei Kho (PhD)[1]

[1] Department of Hematology and Blood Banking, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

(Received 30 Aug, 2016 Accepted 14 Feb, 2018)

Abstract

Background: Multiple myeloma is a type of plasma cell carcinoma, whose development depends on the interaction between malignant plasma cells and the microenvironment that is regulated by the receptors. Although the initial adhesion of the cells, resistance to apoptosis, and increased secretion of cytokines and growth factors contribute to the survival, growth and proliferation of myeloma cells, maintaining lung cells in the laboratory is not easy and faces certain challenges. Since conducting research on myeloma requires optimizing and maintaining their culture conditions in vitro, it appears that amniotic fluid can promote the culture of these cells in vitro.

Materials and Methods: Myeloma cells were isolated from six patients by MACS technique. Cells were cultured in media containing RPMI with 10% FBS (active and inactive) and 10%, 25%, 50% amniotic fluid (active and passive) for 2 weeks. Cell survival was measured every other day using trypan blue staining during these two weeks. Next, the expression of proliferation genes (BCL-2), implantation genes (CXCR4) and cell cycle stop genes (P21, P27) were studied using qualitative PCR technique.

Results: The results showed that the medium containing 25% passive amniotic fluid and 10% inactive FBS significantly increased the proliferation of myeloma cells, and on day zero (on the day of isolation) all of these genes were expressed. Furthermore, on the fourth day of cultivation, in all groups, BCL-2 and CXCR4 genes were expressed, while P21 and P27 genes were not. This difference could indicate the effect of amniotic fluid on the growth and proliferation of the myeloma cells.

Conclusion: According to the results, the use of a medium containing 25% inactive amniotic fluid plus a base medium that contains active RPMI and FBS 10% is recommended for the culture of myeloma cells.

Key words: Amniotic fluid, Multiple myeloma, Plasma cell, Proliferation

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Bakhtiari M, Kaviani S, Abroon S, Moallemi M, Jalaei Kho H. Amniotic Fluid that Supports the Growth of Plasma Cells. Iran South Med J 2018; 21(4): 304-318

Copyright © 2018 Bakhtiari, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

* *Address for correspondence:* Department of Hematology and Blood Banking, School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran. E.mail: kavianis@modares.ac.ir
*ORCID: 0000-0002-6370-916X
**ORCID:0000-0003-8142-2213