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

گیلدا پارسامنش [۱†](M.Sc)، مریم مهری [۱†] (M.Sc)، مصطفی شیخ‌زاده [۲](M.D)، سید حسین موسوی انیجدان [۳و۴](Ph.D)، امرالله مصطفی‌زاده [۵*](Ph.D)

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

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

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

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

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

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

† دو نویسنده به یک اندازه مشارکت داشته‌اند

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

چکیده

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

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

یافته‌ها: میزان بقاء سلول‌های ایمنی پس از ۷۲ ساعت کشت در محیط فاقد سرم نسبت به گروه کنترل ۸۲/۱٪ بود. هم‌چنین پس از ۲۴ ساعت، آلوژنیسیته‌ی این سلول‌ها نسبت به سلول‌های کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۱$). این کاهش در نقاط زمانی ۴۸و ۷۲ ساعت بارزتر شد ($P<۰/۰۰۰۱$)؛ به میزانی که پاسخ لنفوسیت‌های موش Balb/C به سلول‌های استرس یافته کم‌تر از سلول‌هایی بوده است که هیچ‌گونه محرکی دریافت نکرده‌اند ($P<۰/۰۰۰۱$). یافته‌های مورفولوژی به وضوح این کاهش را تائید می‌کنند.

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

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

مقدمه

پیوند مغز استخوان یکی از شیوه‌های درمانی رایج برای برخی از سرطان‌ها و ناهنجاری‌های خون‌شناسی و ایمنی‌شناسی می‌باشد. هم‌چنین در سال‌های اخیر انتقال سلول‌های ایمنی مهندسی شده، ازجمله لنفوسیت‌های T با رسپتورهای کایمریک Chimeric Antigen Receptor (CAR)–T cells، در درمان سرطان‌های مرتبط با خون مانند انواع لوسمی لنفوبلاستیک و مولتیپل میلوما [۱]، امیدهای تازه‌ای در ایمونوتراپی سرطان ایجاد نموده است. با این حال، مهم‌ترین مانع در افزایش موفقیت پیوند بافت‌های حامل سلول‌های ایمنی، شناسایی و از بین بردن آن‌ها توسط سیستم ایمنی میزبان است. علاوه بر این، بیماران پیش از دریافت پیوند مغز استخوان جهت از بین بردن سلول‌های بنیادین خون ساز معیوب، تحت اشعه درمانی قرار می‌گیرند که این امر

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-24]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.124]

خود سبب ایجاد التهاب در آنان می‌گردد. این التهاب زمینه را برای رد پیوند مغز ا ستخوان آلوژنیک مهیا می سازد. از سوی دیگر فقدان سلول‌های کارآمد ایمنی در میزبان، فرد در یافت‌کننده پیوند را در معرض واکنش پیوند علیه میزبان (Graft versus host disease, GVHD)قرار می‌دهد [۲]. بنابراین جستجوی راه‌کارهایی که بتوان با استفاده از آن‌ها آلوژنیسیته‌ی سلول‌های پیوندی را کاهش داده و التهاب را تعدیل نمود، می‌تواند در پیوند مغز ا ستخوان امید آفرین با شد. اخیراً استفاده از پاسخ یکپارچه سلول به استرس (Integrated Stress Response, ISR) در در مان برخی از بی ماری های پیچیده مورد توجه محققین قرار گرفته است [۴،۳]. در حال حا ضر ا ستفاده از ا سترس نا شی از تابش ا شعه ماورابنفش به لوکوسیت های بیمار به منظور تعدیل سیستم ایمنی در دریافت‌کنندگان پیوند مغز استخوان امر رایجی می‌باشد [۵]. به‌طور طبیعی نیز مشخص شده است که ساکنین مناطق با تابش طبیعی بالا دارای تغییراتی در سیستم ایمنی خود هستند؛ از جمله تعداد سلول‌های T سیتوتوکسیک و سلول‌های کشنده طبیعی فعال (Natural Killer Cells, NK cells) در این افراد کاهش می‌یابند [۷،۶]. از دیگر استرس‌های سلولی با دسترسی آ سان، کشت سلول در محیط فاقد سرم می‌با شد. در این نوع شرایط کشت، به‌ا ستثنای سرم، دیگر فاکتورها و مواد مغذی مانند گلوکز و ا سیدهای آمینه ضروری که سلول برای ر شد خود به آن‌ها وابسته ا ست در محیط موجود ا ست. کشت در محیط فاقد سرم از جمله تکنیک‌هایی است که در بیولوژی سلولی برای اهداف گوناگون مانند افزایش فاکتور رشد فیبروبلا ستی (Fibroblast Growth Factor,FGF) [۸]، القای آپاپتوز و اتوفاژی [۱۰،۹]، توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G0/G1 [۱۱]، انتقال هسته‌ی سلول سوماتیک [۱۲] و بررسی رفتار سلول‌های سرطانی در شرایط فقدان سرم [۱۴،۱۳] مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مطالعات گذشته که بر روی سلول‌های فیبروبلا ست انسانی صورت گرفت، نشان داده شده ا ست که مایع رویی کشت فاقد سرم این سلول‌ها سبب افزایش تکثیر و مهاجرت این سلول‌ها و افزایش توانایی آن‌ها در تسریع ترمیم زخم می گردد .[Patent: H01G:A61B-2014]هم‌چنین در مطالعه‌ی دیگر که بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی(Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) انسان صورت گرفت، کشت فاقد سرم سبب کاهش معنی‌دار سطح آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی اصلی کلاس یک (Major HistocompatibiltyComplex, MHC)، کاهش قدرت تحریک آلوژنیک این سلول‌ها، افزایش سلول‌های لنفوسیت تنظیمی (Regulatory T cells, Treg) و هم‌چنین افزایش میزان فاکتور رشد تغییردهنده-بتا۱ (Transforming Growth Factor-β1, TGF-β1) در مایع رویی کشت این سلول‌ها گردید [۱۶،۱۵]. بنابراین یافته‌های این گروه نشان‌دهنده‌ی پتانسیل این تکنیک در تنظیم سیستم ایمنی می‌با شد. جالب ا ست بدانیم که بدن ما نیز روزه‌داری را به عنوان یک ا سترس در نظر می‌گیرد و در مقابه با آن از طریق م سیری تحت عنوان مدیریت خود تنظیمی استرس باعث کاهش سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌گردد [۱۷].

در مطالعه‌ی حاضر رفتار لنفوسیت‌های تهیه شده از طحال موش در برابر ا سترس نا شی از کشت در محیط فاقد سرم بر میزان تحریک‌کنندگی آلولنفوسیت‌ها در مدل آزمایشگاهی بررسی گردید. نتیجه این تحقیق نشان داد که این تکنیک می‌تواند در کاهش واکنش‌های نامطلوب در پیوند سلول‌های ایمنی موثر باشد.

مواد و روش‌ها

حیوان آزمایشگاهی

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

جداسازی لکوسیت‌های تک هسته‌ای طحال

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

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-24]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.124]

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

کشت سلول در محیط فاقد سرم

تعداد ۳×۱۰^{۵} از سلول های لکوسیت طحال موش C57bl/6 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای در محیط کشت کامل شامل RPMI-1640 (Biosera, France)، سرم گوساله ۱۰٪ [Fetal bovine serum (FBS), Gibco, USA]، پنی سیلین/ استرپتومایسین ۱٪ [Penicillin/Streptomycin (PS), Gibco, USA] و همین تعداد سلول در محیط کشت فاقد سرم گوساله [RPMI-1640 + PS ۱٪] به صورت سه بار تکرار برای هر نقطه‌ی زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، در شرایط استاندارد کشت سلول پستانداران (دمای $۳۷^{\circ}C$ و ۹۵٪ هوا و ۵٪ دی اکسیدکربن) کشت داده شدند. جهت انجام پروتکل کشت در محیط فاقد سرم به مدت ۷۲ ساعت، روز اول (روز کاشتن سلول‌ها) سلول‌های سه چاهک پلیت در محیط کشت دارای سرم به عنوان کنترل و سلول‌های سه چاهک دیگر در محیط کشت فاقد سرم انکوبه شدند. در روز دوم کشت، به عنوان آغاز پروتکل ۴۸ ساعت کشت فاقد سرم، سلول‌ها از شش چاهک جمع‌آوری شدند و سلول‌های هر چاهک به یک میکروتیوب خاص خود منتقل و سانتریفوژ شدند. سپس به سلول‌های سه میکروتیوب، محیط کشت دارای سرم و به سلول‌های میکروتیوب‌های دیگر، محیط کشت فاقد سرم اضافه گردید؛ سپس سلول‌ها به چاهک‌های اولیه خود اضافه شدند. برای نقطه زمانی ۲۴ ساعت نیز در روز سوم کشت این عمل تکرار گردید.

بررسی بقاء سلولی (Viability)

۳۰۰ هزار سلول لکوسیت طحال موش C57bl/6 در پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به صورت سه بار تکرار در محیط کشت دارای سرم (گروه کنترل) و فاقد سرم، به شیوه‌ی فوق‌الذکر کشت داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول -2, 5 (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Sigma-Aldrich, USA] به غلظت ۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه گردید. پس از پایان انکوباسیون به هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر (DMSO) Dimethy sulfoxide که حلال رنگ MTT است اضافه و به خوبی پیپت گردید. جذب نوری پلیت‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و نتایج بر اساس در صد جذب نور Optical Density (OD) بررسی و گزارش گردید.

کشت مختلط لنفوسیتی یک طرفه Mixed (MLR) Lymphocyte Reaction

ابتدا سه موش نر دهنده‌ی سلول‌های تحریک‌کننده به روش اخلاقی قربانی شدند. سپس از طحال آن‌ها به روش ذکر شده در بالا لکوسیت‌های تک هسته‌ای جدا گردید. جهت انجام این تست ابتدا طبق پروتکل ذکر شده، تعداد ۳۰۰ هزار سلول از هر موش به عنوان تحریک‌کننده (Responder) در محیط کشت دارا و فاقد سرم به صورت سه تایی در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. هم‌چنین، همین تعداد سلول جهت بررسی و تایید عملکرد مهاری اشعه بر تکثیر سلول‌ها به دو گروه سه تایی از چاهک‌ها اضافه شدند. سپس پلیت حاوی سلول‌ها تحت تابش ۳۰۰۰ راد (با انرژی ۶Mv) با دستگاه شتاب‌دهنده‌ی خطی مدل Primus ساخت شرکت زیمنس آلمان قرار گرفتند. سپس سه موش Balb/C نر به روش اخلاقی کشته شده و طبق روشی که قبلاً توضیح داده شد از طحال آن‌ها لکوسیت‌های تک هسته‌ای به عنوان سلول‌های پاسخ‌دهنده (Responder) جدا گردید. ۱۵۰ هزار سلول پاسخ دهنده به نسبت ۱:۲ با سلول‌های تحریک‌کننده (به ترتیب لکوسیت‌های طحال موش C57bl/6: لکوسیت‌های طحال موش Balb/C) در حجم ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت کامل [RPMI-1640, ۱۰٪, PS۱٪ FBS] کشت یافتند. هم‌چنین به عنوان کنترل مثبت ۱۵۰ هزار سلول لکوسیت طحال موش Balb/C نیز به صورت سه بار تکرار با سه میکرولیتر میتوژن [Phytohemagglutinin A (PHA), Sigma-Aldrich, USA] تحریک شدند. به عنوان کنترل تقسیم خودبه‌خودی (Background) تعداد برابر سلول‌های طحال موش Balb/C بدون هیچ‌گونه محرکی در سه چاهک دیگر همین پلیت کاشته شدند. هم‌چنین به سلول‌های سه چاهک از گروه کنترل اشعه، سه میکرولیتر PHA اضافه گردید؛ در حالی‌که به سه چاهک دیگر تنها سه میکرولیتر محیط کشت اضافه شد و به عنوان کنترل تقسیم سلولی خودبه‌خودی برای سلول‌های اشعه دیده در نظر گرفته شدند.

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

آنالیز آماری

داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندار میانگین بیان شده‌اند. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Prism-version 8.0.1) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آزمون

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-24]

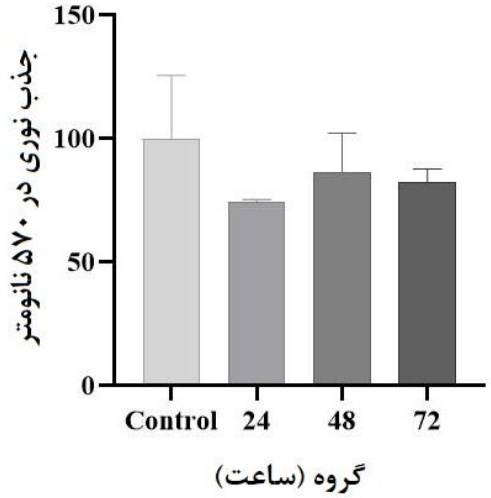
[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.124]

Kolmorgrov-Smirnov برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده گردید. از آزمون T-test برای مقایسه‌ی میانگین‌ها بین دو گروه استفاده شد. نمودارها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism (version 8.0.1) رسم گردید. $P<0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

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

غالباً در مطالعات تجربی پیوند مغز استخوان از موش‌های C57bl/6 به‌عنوان دهنده‌ی سلول‌های بنیادی مغز استخوان استفاده می‌شود. در این مطالعه اثر استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم بر بقای لکوسیت‌های طحال این موش مورد بررسی قرار گرفت تا برآوردی از میزان سلول‌های زنده باقی مانده پس از اتمام این نوع استرس انجام گردد. به این منظور از آزمایش MTT استفاده گردید. نتایج این تست نشان داد که میزان بقاء این سلول‌ها در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت در محیط فاقد سرم نسبت به کنترل، به ترتیب ۷۴٪، ۸۶٪ و ۸۲٪/۱ می‌باشد که از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($P>0/05$) (شکل ۱). به عبارت دیگر در صد قابل توجهی از لکوسیت‌های طحال این موش نسبت به استرس ناشی از فقدان سرم مقاوم بوده‌اند. بنابراین سلول‌های کشت یافته در شرایط استرس فاقد سرم، قابلیت استفاده در مطالعات تعدیل ایمنی و یا پیوند مغزاستخوان را دارا می‌باشند.



شکل ۱. نتایج تست MTT برای بررسی تفاوت در بقاء و متابولیسم سلول‌های کشت یافته در محیط فاقد سرم و دارای سرم. در مقایسه با سلول‌های کنترل درصد زنده بودن (viability) در سلول‌های تک هسته‌ای طحال موش Balb/C که استرس کشت در محیط فاقد سرم را به مدت ۲۴،۴۸ و ۷۲ ساعت تجربه کرده‌اند به ترتیب ۷۴٪، ۸۶٪ و ۸۲٪/۱ می‌باشد که از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است ($P>0/05$).

کشت در محیط فاقد سرم سبب کاهش معنی‌دار سطح آلوژنیسیته‌ی سلول‌های ایمنی موش می‌گردد.

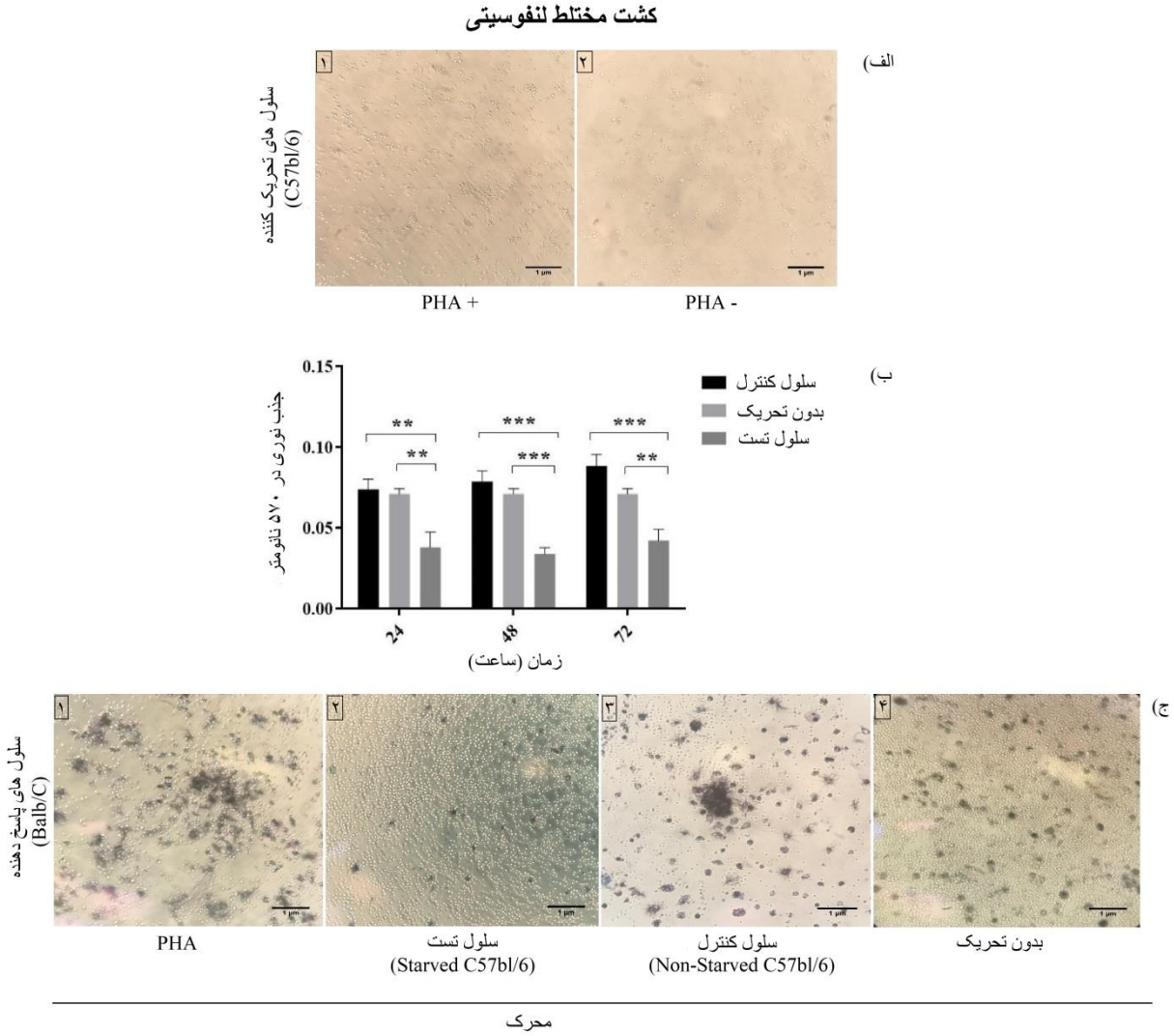
به منظور بررسی نقش استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم به عنوان یک ابزار تعدیل‌گر ایمنی از آزمایش MLR یک طرفه که یک مدل آزمایشگاهی پیوند می‌باشد؛ استفاده شد. در این مدل میزان تکثیر سلول‌های ایمنی پاسخ‌دهنده‌ی موش Balb/C در مجاورت سلول‌های ایمنی تک هسته‌ای موش C57bl/6 که در اثر تابش اشعه، قدرت تکثیر خود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

در مطالعه‌ی حاضر تابش اشعه به طور موثری توانسته است مانع تکثیر سلولی شود. زیرا که سلول‌های تحریک‌کننده در حضور میتوژن PHA نتوانستند رنگ MTT را احیا کنند. میانگین ± انحراف جذب نوری سلول‌های تحریک‌کننده که تحت تابش قرار گرفته‌اند و توسط PHA تحریک شدند برابر با ۰/۰۰±۰/۰۴۸ بوده است. این مقدار برای سلول کنترل ۰/۰۰۴±۰/۰۴۶ بوده که از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ($P>0/05$). تفاوتی از لحاظ مورفولوژی بین سلول های تحریک‌کننده (C57bl/6) چه در حضور PHA و چه در غیاب این میتوژن وجود ندارد (شکل ۲-الف). بنابراین در کشت مختلط لنفو سیتی تکثیر مشاهده شده تنها توسط سلول‌های پاسخ‌دهنده واسطه‌گری می‌شود. همان‌طور که در شکل ۲-ب می‌توان مشاهده کرد، در تمام نقاط زمانی مورد تحقیق این مطالعه، پاسخ سلول‌های ایمنی موش Balb/C به سلول‌های آلوژنی که در شرایط محیط فاقد سرم کشت یافته‌اند ضعیف‌تر از لنفو سیت‌هایی بوده است که با سلول‌های آلوژنی تحریک شدند که از قبل در مدت مشابه در محیط دارای سرم کشت یافته بودند. این اختلاف در نقاط زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت ($P<0/0001$) بارزتر از نقطه زمانی ۲۴ ساعت ($P<0/01$) بوده است. جالب است بدانیم که در مقایسه با سلول‌های ایمنی پاسخ‌دهنده که هیچ‌گونه تحریک‌کننده‌ای (PHA و یا لنفوسیت های آلوژن) دریافت نکرده‌اند (Background)، سلول‌های تحریک شده با لنفو سیت‌های آلوژنی که از قبل به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم را تحمل کردند به طور معنی‌داری جذب کم‌تری در طول موج ۵۷۰ نانومتر داشته‌اند. به ترتیب ($P<0/01$، $P<0/0001$، $P<0/0001$). به عبارت دیگر این سلول‌های استرس یافته آلوژنیک قادر بودند سلول‌های ایمنی پاسخ دهنده‌ی موش Balb/C را مهار کنند (شکل ۲ – ب). یافته‌های مورفولوژی سلول‌های تحریک شده نیز به وضوح تاییدکننده‌ی نتایج کمی حاصل از آنالیز تست MTT در کشت مختلط

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-24]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.124]

لنفوسیتی است. در حالی‌که لنفوسیت‌های پاسخ‌دهنده به سلول‌های آلوژنی که در محیط کشت دارای سرم کشت یافته‌اند (سلول‌های کنترل)، مانند سلول تحریک شده با میتوژن PHA، آگرگاسیون سلولی تشکیل داده‌اند و کریستال‌های فورمازان به صورت فراوان در آن‌ها تشکیل شده است. لنفوسیت‌های تحریک شده با سلول‌های آلوژنی که در محیط کشت فاقد سرم کشت یافته‌اند (سلول‌های تست) فاقد این کریستال‌ها بوده و حتی شدت احیا رنگ MTT در آن‌ها ضعیف‌تر از سلول‌هایی بوده است که بدون هیچ‌گونه محرکی برای مدت مشابه‌ای با سلول‌های تست و کنترل کشت یافتند (Background) (شکل ۲– ج).



شکل ۲. نتایج کشت مختلط لنفوسیتی. الف) سلول‌های لکوسیت موش C57bl/6 به عنوان تحریک کننده پس از تابش اشعه به میزان ۳۰۰۰ راد، عدم توانایی تکثیر را در حضور محرک PHA (الف-۱) و عدم حضور آن (الف-۲) نشان دادند. ب) نتایج جذب نوری کشت مختلط لنفوسیتی یک طرفه در ۵۷۰ نانومتر نشان دهنده‌ی کاهش معنادار قدرت تحریک کنندگی سلول‌های کشت یافته در شرایط استرس فقدان سرم (تست) در مقابل سلول‌های کشت یافته در محیط دارای سرم (کنترل) در تمامی نقاط زمانی می‌باشد. این کاهش معنی‌دار در مقایسه با سلول‌های پاسخ دهنده بدون هیچگونه تحریک، جالب توجه می‌باشد. ج) نتایج مورفولوژیک سلول‌های کشت یافته در محیط فاقد سرم نیز کاهش تولید کریستال‌های فورمازان را در مقایسه با دیگر گروه‌های کنترل، بدون تحریک و همراه با محرک PHA نشان می‌دهد. (n=9) و مقادیر (P>۰/۰۵) معنی‌دار در نظر گرفته شد و به صورت ۰/۰۵>(*) ۰/۰۱>(**) ۰/۰۰۱>(***) نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

هدف اصلی این مطالعه بررسی اثر استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم بر عملکرد سلول‌های ایمنی موش در کشت یک طرفه‌ی لنفوسیتی بوده است تا بتوانیم در رابطه با کاربرد عملی این تکنیک در تنظیم واکنش‌های ایمنی قضاوت صحیحی‌تری داشته باشیم. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داده است که در مقایسه با سلول‌های کنترل، آلوژنسیته‌ی سلول‌های ایمنی جدا شده از طحال موش در ۲۴ ساعت اول

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-24]
[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.124]

کشت در محیط فاقد سرم به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد ($P<۰/۰۱$). این کاهش با پیشرفت زمان ادامه پیدا می‌کند و حتی این اختلاف بعد از ۴۸ ساعت کشت، معنی‌دارتر می شود ($P<۰/۰۰۰۱$) و پس از ۷۲ ساعت نیز این سطح از اختلاف معنی‌دار، حفظ می‌گردد ($P<۰/۰۰۰۱$). در این راستا، یافته‌ی جالب توجه این است که نه تنها پاسخ لنفوسیت‌های آلوری اکتیو به سلول‌های کشت یافته در محیط فاقد سرم (سلول تست) نسبت به لنفوسیت‌های آلوری اکتیو که با سلول‌های کنترل تحریک شده‌اند کاهش یافته است، بلکه این پاسخ حتی کم‌تر از حالتی بوده است که این لنفوسیت‌ها با هیچ‌گونه محرکی تحریک نشده‌اند ($P<۰/۰۰۰۱$). یافته‌های مورفولوژیک نیز بر بررسی‌های کمی فوق صحه می‌گذارند. این در حالی است که لنفوسیت‌های پاسخ‌دهنده‌ای که با سلول‌های کنترل کشت یافته‌اند، همانند سلول‌های تحریک شده با میتوژن PHA، تشکیل آگرگاسیون سلولی دادند که بر طبق گزارش موجود نشان‌دهنده‌ی تقسیم این سلول‌ها می‌باشد [۱۸].

در تحلیل کلی این نتایج دو نکته منطقی به نظر می‌رسد: نکته اول این است که در اثر کشت در محیط فاقد سرم، آلوژنسیته‌ی سلول‌های کشته یافته کاهش می‌یابد. اما اگر فرض کنیم که آلوژنسیته‌ی این سلول‌ها حتی به صفر بر سد نباید نتایج ضعیف‌تری را در آزمایش کشت مختلط نسبت به سلول‌های پاسخ‌دهنده‌ای که با هیچ محرکی فعال نشده‌اند بروز دهند. بنابراین اجباراً نکته دوم به این صورت مطرح می‌شود که کشت یافتن در شرایط فاقد سرم سبب مهار رشد و متابولیسم و حتی شاید موجب مرگ سلول‌های پاسخ‌دهنده می‌شود. با توجه به این که آزمایش کشت مختلط لنفوسیتی یک طرفه به عنوان مدلی برای بررسی‌های تجربی مرتبط با ایمنی‌شناسی پیوند تعریف می‌شود [۱۹] و آنتی‌ژن اصلی دخیل در فعال سازی لنفوسیت‌های آلوری اکتیو نیز MHC می‌باشد، احتمالاً در پاسخ به استرس متابولیک نا شی از عدم حضور فاکتورهای رشد سطح بیان این آنتی‌ژن در لنفوسیت‌ها پائین می‌آید. اگر بپذیریم سلول‌های پستانداران در پاسخ به استرس‌های مختلف از قبیل عدم وجود اسید آمینه، گلوکز و یا فاکتورهای رشد نوعی از پاسخ سازشی را بروز می‌دهند که به نام پاسخ استرس یک‌پارچه معروف است و در طی آن تولید پروتئین‌ها به‌طور کلی کاهش می‌یابد [۴،۳]، فرض فوق منطقی به نظر می‌رسد. ما در تحقیق گذشته نشان دادیم که سلول‌های ایمنی جدا شده از خون انسان در شرایط استرس نا شی از کشت در محیط فاقد سرم سطح پایین‌تری از بیان مولکول‌های MHC را نشان می‌دهند که مانند مطالعه‌ی حاضر سبب کاهش تکثیر لنفوسیت‌های آلوری اکتیو شده است [۱۵]. در ارتباط با مهار و یا مرگ لنفوسیت‌های آلوری اکتیو باید گفت که نقاط وارسی (check points) مختلفی با نقش تنظیم‌کنندگی منفی سیستم ایمنی وجود دارند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها نقطه‌ی وارسی [Programmed Death -1(PD1)/Programmed Death Ligand -1(PDL1)] می‌باشد [۲۰]. طبق دانش ما تاکنون این نقطه‌ی وارسی در لنفوسیت‌هایی که در شرایط استرس ناشی از فقدان سرم کشت یافته‌اند بررسی نشده است؛ اما شواهدی وجود دارد که احتمال فعال شدن این مسیر در شرایط ذکر شده را تقویت می‌کند. امروزه از کشت سلول تحت استرس ناشی از کمبود مواد غذایی به عنوان حالتی یاد می‌شود که در محیط تومور می‌تواند به‌وجود آید [۲۱]. در این شرایط بیان PD1/PDL1 در سطح لنفوسیت‌ها افزایش می‌یابد [۲۲]. تحقیقات بیش‌تری لازم است که هر دو فرضیه‌ی فوق را مورد آزمون قرار دهیم. از سوی دیگر در مطالعه‌ی حاضر بیش از دو سوم لنفوسیت‌ها در محیط فاقد سرم زنده مانده‌اند. به عبارت دیگر پس از کشت در محیط فاقد سرم، تعداد کافی سلول جهت تزریق به حیوان آزمایشگاهی برای بررسی‌های بیش‌تر در اختیار خواهیم داشت.

از محدویت‌های تحقیق حاضر می‌توان به عدم بررسی مولکول‌های MHC بر سطح لنفوسیت‌های تحریک‌کننده و عدم بررسی مرگ سلولی در لنفوسیت‌های پاسخ‌دهنده در کشت مختلط لنفوسیتی اشاره داشت که احتیاج به تحقیق بیش‌تر در این زمینه است.

روی هم رفته، یافته‌های این تحقیق نشان داده است که استفاده از استرس ناشی از کشت در محیط فاقد سرم می‌تواند ابزار مناسبی در تعدیل سیستم ایمنی جهت تنظیم واکنش‌های ناخواسته‌ی ایمنی باشد. تحقیقات بیش‌تری لازم است تا مکانیسم‌های پایه‌ای موثر در این تعدیل سیستم ایمنی از جمله نقش ISR در این زمینه را جستجو کنیم.

کشت در محیط فاقد سرم سلول‌های تک هسته‌ای طحال موش موجب کاهش قدرت تحریک‌کنندگی ایمنی این سلول‌ها در مدل آزمایشگاهی پیوند آلوژنیک می شود. بنابراین می‌توان گفت این روش دارای پتانسیل تعدیل سیستم ایمنی، از جمله کنترل واکنش‌های ناخواسته‌ی ایمنی، در پیوند سلول‌های ایمنی و مغز استخوان می‌باشد. در آینده استفاده ازمدل حیوانی موش می‌تواند کاربرد این تکنیک را در پیوند مغز استخوان روشن‌تر سازد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-24]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.124]

تشکر و قدردانی

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

منابع

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[11] Ni P, Xu H, Chen C, Wang J, Liu X, Hu Y, et al. Serum starvation induces DRAM expression in liver cancer cells via histone modifications within its promoter locus. PLoS One 2012; 7: e50502.

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

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

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

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

[16] Rahmani M, Mohammadnia-Afrouzi M, Nouri HR, Fattahi S, Akhavan-Niaki H, Mostafazadeh A. Human PBMCs fight or flight response to starvation stress: Increased T-reg, FOXP3, and TGF-β1 with decreased miR-21 and Constant miR-181c levels, Biomed. Pharmacother 2018; 108: 1404-1411.

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

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

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

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

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

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

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-24]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.124]

Volume 23, Issue 1 (Winter 2021), 124-130

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

Gilda Parsamanesh (M.Sc) [†1], Maryam Mehri (M.Sc) [†1], Mostafa sheikhzadeh (M.D)[2], Seyyed Hossein Mousavie Anijdan (Ph.D)[3,4], Amrollah Mostafazadeh (Ph.D)[*5]

1- Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
2- Laboratory of Animal Care Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
3- Depat. of Radiation Technology, School of Allied Medical Sciences, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
4- Radiotherapy Center, Shahid Rajayee Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
5- Cellular and Molecular Biology Research Center, Research Institutes of Health, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

* Corresponding author. +98 9111265105 amrolah65@yahoo.com
† Two authors contributed equally

Received: 26 Dec 2019; Accepted: 24 Jun 2020

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

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

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

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

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

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-24]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.124]