

The Effects of Increased Heat Shock Proteins Expression in MDA-MB468 Adeno-Carcinoma Cells on Expansion and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells from Human Umbilical Cord Blood

J. Hajati, Ph.D.^{1‡}, M. Ebrahimi, M.Sc.^{2,3‡}, Z. Mohammad Hassan, Ph.D.³,
S. Kazemi Ashtiani, Ph.D.², Z. Gheflati, B.Sc.¹

1. Immunology Department, Tehran University of Medical Sciences

2. Stem Cells Department, Royan Institute

3. Immunology Department, Tarbiat Modarres University

‡ *Corresponding Address: P.O.Box: 14155-6447, Immunology Department, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
Email: hajatij@sina.tums.ac.ir

‡ *Corresponding Address: P.O.Box: 19395-4644, Stem Cells Department, Royan Institute, Tehran, Iran*
Email: marzieh_ebrahimi@gmail.com

Abstract

Received: 7/Feb/2007, Accepted: 19/Jun/2007

Introduction: The present study examines the effects of increased heat shock proteins expression in MDA-MB468 adeno-carcinoma cells on expansion and differentiation of hematopoietic stem cells from human umbilical cord blood.

Materials and Methods: Highly purified human CD34+ cells (Magnetic bead isolation) derived from umbilical cord blood were cultured, under three conditions, in the presence of FLt3L, SCF, GMCSF, IL-3, TPO and MDA-MB 468 Carcinoma lysate (MDA); heat treated MDA-MB468 lysate (MDA-HSP) or without tumor lysate as control group. Flow cytometry and direct scoring of solid cultures were done to evaluate the proliferation, and colony forming ability and surface markers of CD34+ Cells on days 0, 7 and 14 of culture.

Results: Long term culture of CD34+ Cells in the presence of tumor lysates caused their differentiation with decrease in cell expansion and colony forming unit potency. Phenotype of cultured cells was changed toward myeloid or lymphoid lineages. Comparison of the three groups showed that, MDA caused the lowest proliferation and CFC followed MDA-HSP. Among the groups, MDA and MDA-HSP, Stimulated the differentiation toward lymphoid cells Specially B Cells (CD19+), NK cells (CD56+) and myeloid progenitor cells (CD14+). However, CD14+ increased in control group.

Conclusion: Tumor cells contain substances regulating development and decreasing proliferation and colony forming potential of HSCs. Heat treated tumor cells contain HSPs and other substances preserving some expansion and colony forming properties of hematopoietic stem cells. It could be argued that these substances may cause differentiation of HSCs into immune cells such as NK and myeloid cells that induce strong anti tumor immune responses.

Keywords: Hematopoietic Stem Cells, Umbilical Cord Blood, Heat Shock Proteins, Adenoma Carcinoma Tumor Cell Line

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 2, Summer 2007, Pages: 91-102

تأثیر افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی در سلول‌های توموری رده آدنوکارسینومای MDA-MB468 بر رشد و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز مشتق از خون بندناف انسان

جمشید حاجتی^۱ Ph.D.، مرضیه ابراهیمی^۲ M.Sc.، زهیر محمدحسن^۳ Ph.D.

سعید کاظمی آشتیانی^۱ Ph.D.، زهرا غفلی^۱ B.Sc.

۱. دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

۲. پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

۳. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۶۴۴۷-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

پست الکترونیک: [Email: hjatij@sina.tums.ac.ir](mailto:hajatij@sina.tums.ac.ir)

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

پست الکترونیک: [Email: marzieh.ebrahimi@gmail.com](mailto:marzieh.ebrahimi@gmail.com)

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۱۱/۱۸، پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۲۹

*** هدف:** بررسی اثر افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی در سلول‌های توموری رده MDA-MB468 بر رشد و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز مشتق از خون بندناف انسان

*** مواد و روش‌ها:** سلول‌های CD34⁺ از خون بندناف انسانی به روش بید مغناطیسی تخلیص و به مدت ۱۴ روز در ۳ گروه مختلف در حضور عصاره سلول‌های توموری (MDA)، عصاره سلول‌های حرارت دیده (MDA-HSP)، و در حضور سیتوکاین‌های TPO، GM-CSF، IL-3، SCF، FLT3L (گروه کنترل) کشت شدند. نتایج با شمارش سلول‌های تکثیر شده، توانایی تشکیل کلونی و تعیین ایمونوفنوتیپ سلول‌ها توسط آنتی‌بادی‌های اختصاصی طی روزهای ۰، ۷ و ۱۴ بررسی شد.

*** یافته‌ها:** کشت طولانی مدت سلول‌های بنیادی خون‌ساز سبب کاهش توانایی تکثیر سلولی و تمایز آنها به سمت رده‌های میلویدی و یا لنفوییدی می‌شود. مقایسه سه گروه نشان داد میزان تکثیر و توانایی تشکیل کلونی در گروه MDA بسیار کمتر از دو گروه دیگر است. بررسی فنوتیپ سلول‌ها در گروه‌های مختلف نشان داد که سلول‌های شاخص CD19⁺ (سلول B) در گروه MDA افزایش یافته است. این در حالی است که در گروه MDA-HSP درصد سلول‌های شاخص CD56⁺ (سلول NK) و با شاخص CD14⁺ (پیش‌ساز گرانولوسیتی/میلویدی) و در گروه کنترل تنها درصد سلول‌های CD14⁺ افزایش یافت.

*** نتیجه‌گیری:** سلول‌های توموری واجد ترکیباتی هستند که بر تکوین سلول‌های بنیادی خون‌ساز اثر می‌گذارند و سبب کاهش تکثیر و توانایی تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌شوند. در عوض سلول‌های توموری حرارت دیده حاوی HSP و ترکیباتی هستند که سبب حفظ برخی از خصوصیات سلول‌های بنیادی خون‌ساز همچون قدرت تشکیل کلونی و تکثیر سلولی می‌شوند. به نظر می‌رسد روند تمایز سلول‌های خون‌ساز در حضور این ترکیبات درون سلولی به سمت تولید سلول‌های موثر سیستم ایمنی همچون سلول‌های NK و میلویدی باشد که در پاسخ‌های ضد توموری موثرند. هرچند که برای حصول یک نتیجه قطعی به مطالعات بیشتری نیاز است.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی خون‌ساز، خون بندناف، پروتئین‌های شوک حرارتی، رده توموری آدنوکارسینومای MDA-MB 468

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۲، تابستان ۸۶، صفحات: ۹۱-۱۰۲

مقدمه

۳. (Short Term Hematopoietic Stem Cell: ST-HSC)

۴. پیش‌سازهای چندقوه (Multi Potent Precursor Cell: MPP) که ظاهراً قدرت خودتجدید شوندگی ندارند (۳).

مطالعات گسترده بر روی مغز استخوان و خون بندناف که از منابع غنی پروژنیاتورها (Hematopoietic Precursor Cell: HPC) سلول‌های بنیادی خون‌ساز هستند (۴)، نشان داده‌اند که حضور فاکتورهای رشد متفاوت، سایتوکاین‌ها و ریزمحیط موجود در کشت سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های CD34 اثرات متفاوتی را بر

سلول‌های بنیادی خون‌ساز (HSC: Hematopoietic Stem Cell) انسان توسط بیان آنتی‌ژن سطحی CD34 و فقدان بیان CD38 شناخته می‌شوند (۱). این سلول‌ها از دو ویژگی خود تجدیدشوندگی (Self Renewal) و توانایی تمایز به حداقل ۸ دودمان مشخص خونی برخوردارند (۲) و به سه دسته تقسیم می‌شوند:

۱. سلول‌های خون‌ساز با قدرت خود تجدیدشوندگی طولانی مدت (Long Term Hematopoietic Stem Cell: LT-HSC)

۲. سلول‌های خون‌ساز با قدرت خود تجدیدشوندگی کوتاه مدت

تعداد ۱۰ خون‌هیپارینه از بندناف نوزاد مادران سالم (HIV⁻, HBS⁻, HCV⁻) با دوره حاملگی ۹ ماه کامل جمع‌آوری و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد. به منظور جداسازی سلول‌های اریترئوید خون بندناف از هیدروکسی اتیل استارچ (HAES 10%, Free flex, SM 711202) هر نمونه به طور جداگانه به نسبت ۱:۵ (۱ میلی‌لیتر از ۱۰ درصد HAES با ۵ میلی‌لیتر از خون) مخلوط و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. محلول رویی که غنی از لکوسیت‌ها است در فواصل ۳۰ دقیقه‌ای جمع‌آوری و با PBS شستشو داده شد. برای هر نمونه سلول‌های تک هسته‌ای (MNC) توسط سانتریفیوژ (۶۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه) بر روی لئوفاکس با گرادیان ۲ گرم بر سانتی‌متر (InnoTrain, H9L6114, Germany) جدا شد. از کیت جداسازی سلول‌های CD34⁺ شرکت (Milteny Biotech, 70100, Germany: MACS) برای خالص‌سازی سلول‌های CD34 خون بندناف استفاده شد. به طور خلاصه تعداد ۱۰^۶×۲۰۰-۵۰ سلول در PBS حاوی ۰/۰۵ درصد سرم آلبومین انسانی (HAS 20%, Bayer, 683-20, USA) از هر نمونه با ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر (بر اساس تعداد سلول‌های تک هسته دانه‌های مغناطیسی (میکروبیدها) متصل به آنتی بادی مخلوط و به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و به طور مرتب و در فواصل ۵ دقیقه‌ای مخلوط شد. پس از دو بار شستشو توسط PBS حاوی EDTA (۰/۰۲ میلی‌مولار)، سلول‌ها در ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول PBS رقیق شد و به روی ستون منتقل شد. پس از شستشوی ستون با PBS حاوی EDTA (۰/۰۲ میلی‌مولار)، سلول‌های CD34 با جداسازی ستون از آهن‌ریا به دست آمدند. شمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار و محاسبه درصد سلول‌های زنده با استفاده از تریپان‌بلو صورت گرفت. خلوص سلولی توسط فلوسیتومتری و با استفاده از آنتی بادی ضد CD34 کونژوگه با (MACS, 130-081-001, Milteny Biotech, Germany) FITC بررسی شد.

کشت سلول‌های CD34 خون بندناف

میزان ۱۰^۵×۷-۵ سلول CD34 در یک میلی‌لیتر محیط کشت سلول‌های بنیادی خون‌ساز یا Stemline (Hematopoietic Stem Cell Expansion Media, Sigma, S0189, Germany) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، (FCS, Gibco, 16141-09) (Germany) ۲ میلی‌مولار ال‌گلوتامین (Gibco, 250c-024) و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Gibco, 15070-063, Germany) در پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای و در محیط حاوی ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از سیتوکاین‌های FLT3L (R&D, 308-FK) و GM-CSF (R&D, 215-GM) و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و IL-3 (R&D, 203-IL) و ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر (R&D, 288-TP) کشت شد. کشت در ۳ گروه مختلف صورت گرفت. گروه MDA حاوی ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره

اساس نوع و غلظت فاکتورهای رشد اضافه شده و سلول‌های استرومایی موجود اعمال می‌کند و در تعیین سرنوشت سلول‌ها و تمایز آنها موثرند (۵، ۶). مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های توموری با ترشح فاکتورهای متفاوت از جمله TGFβ، فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF)، IL-10 و پروستاگلاندین E2 (۷) سبب تغییر مسیر تمایز، بلوغ و عملکرد سلول‌های خون‌ساز (۸، ۹) و در نهایت تضعیف سیستم ایمنی میزبان می‌شوند. از سوی دیگر به نظر می‌رسد سلول‌های CD34 جدا شده از ناحیه تومور که تحت تأثیر فاکتورهای مهاری محلول سلول‌های توموری قرار گرفته‌اند، حتی پس از انتقال به محیط کشت جدید دچار نقص‌اند و به سلول‌های دندریتیکی تمایز می‌یابند که سبب مهار سیستم ایمنی می‌شوند (۸).

پروتئین‌های شوک گرمایی (Heat Shock Protein: HSPs) از جمله پروتئین‌های استرسی هستند که در شرایطی چون استرس‌های گرمایی، کمبود اکسیژن، کمبود مواد غذایی، حضور رادیکال‌های اکسیژن، سموم، عفونت‌های ویروسی، فاگوسیتوز و ترانسفورماسیون افزایش می‌یابند (۱۰). این مولکول‌ها به عنوان عوامل موثر در شکل‌گیری ساختار فضایی، جابجایی پروتئین‌ها و انتقال سیگنال عمل می‌کنند (۱۱) و نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی ضد تومور به عهده دارند. به نظر می‌رسد HSP60، HSP70، HSP90 نقش مهمی در ایمنی‌زایی تومور داشته باشند و به عنوان پیام‌های خطر (۱۲، ۱۳) برای مراقبت ایمنی عمل کنند. همچنین برداشت مجموعه‌های پپتید HSP- توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن سبب برانگیختن ایمنی سلولی میزبان می‌شود (۱۰). امروزه از HSP‌های خالص و یا به همراه مجموعه پپتید به منظور ایمنوتراپی سرطان استفاده می‌شود (۱۴). مطالعات متعدد نیز حضور ریسپتورهای سطحی از جمله ریسپتورهای (Toll Like Receptor: TLR) را برای HSP‌ها بر سطح منوسیت، ماکروفاژ و سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن (Antigen Presenting Cell: APC) (۱۳، ۱۵) نشان داده‌اند.

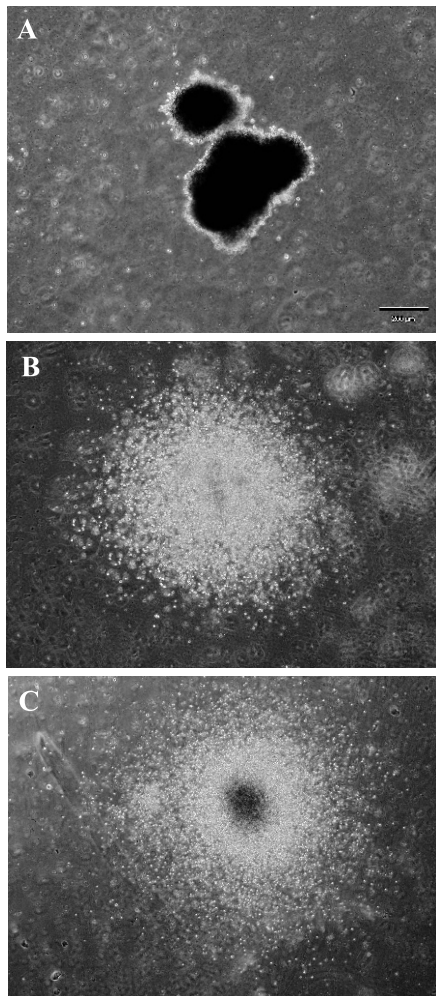
از آنجا که سلول‌های توموری و ترکیبات مترشحه از آنها در حالت طبیعی و یا هنگام آسیب (نکروز و آپوپتوز) می‌توانند بر تکثیر سلول‌های خون‌ساز و تمایز آنها اثر بگذارند و نیز با توجه به اینکه پروتئین‌های شوک گرمایی به دنبال استرس در موجود زنده و یا محیط کشت افزایش بیان می‌یابند و نیز در ناحیه توموری و یا به هنگام درمان سرطان‌ها به مقادیر زیاد القا می‌شوند، لذا در این مطالعه به بررسی اثر این ترکیبات در محیط کشت سلول‌های بنیادی بندناف پرداخته‌ایم. به این ترتیب که عصاره حاصل از سلول‌های توموری و نیز سلول‌های توموری که پروتئین‌های شوک حرارتی آنها افزایش یافته بود، بر کشت سلول‌های CD34 خون بندناف اثر داده شد و نتایج با بررسی توان تشکیل کلونی، میزان تکثیر سلول‌ها و بررسی فنوتیپ سلول‌های کشت شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های CD34⁺ خون بندناف انسان

روش فلوسایتومتری با استفاده از آنتی‌بادی‌های CD14-PE, Clone TUK4 (R0864, Dako), CD34-FITC (130-081-001, MACS), CD38-FITC, Clone AT13/5 (F7101, Dako), CD45-FITC, Clone P4.8 (CBL124F, Chemicon), CD19-FITC, Clone HIB19 (11-0199-71, ebioscience), CD56-PE, Clone MEM188 (12-0569-71, ebioscience)

استفاده شد.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست سنجش کلونی دودمان‌های خون‌ساز: میزان 10^3 سلول بر میلی‌لیتر از سلول‌های CD34 در محیط IMDM حاوی ۱/۳ درصد متیل سلولز، ۱ درصد سرم آلبومین گاوی، ۳۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS)، IL-3 (۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)، SCF (۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر)، GM-CSF (۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و FLT3L (۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) در پلیت‌های ۳۵ میلی‌متری (در دو تکرار) به مدت ۱۴ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 کشت شدند. (A) سلول‌های هموگلوبین‌دار که یک توده متراکم را تشکیل می‌دهند (۱۰X). (B) CFU-GM - کلونی‌های پراکنده سلولی واجد سلول‌های گرانولوسیت/ماکروفاژ (۴X). (C) CFU-Mix - کلونی که حاوی یک توده متراکم داخلی از سلول‌های اریتروییدی و انواع سلول‌های ماکاریوسیتی/ماکروفاژی/گرانولوسیتی حاشیه‌ای است (۴X).

سلول‌های آدنوکارسینوما MDA-MB468، گروه MDA-HSP، حاوی ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره سلول‌های توموری MDA-MB468 حرارت دیده و غنی از پروتئین‌های شوک حرارتی و گروه کنترل بدون عصاره توموری و تنها حاوی سیتوکاین‌های موثر در کشت سلول‌های CD34⁺ بود. کشت به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۵ درصد CO_2 انجام گرفت. محیط کشت هر هفته یک بار تعویض شد. به طوری که نیمی از محیط تخلیه و به آن محیط جدید اضافه شد. شمارش سلولی، سنجش کلونی و فنوتیپ سلول‌ها در روز ۷، ۱۴ و ۲۰ انجام گرفت.

سنجش کلونی‌های خون‌ساز

سلول‌ها در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۰ به منظور بررسی توانایی تشکیل کلونی (Colony Forming Unit-Granulocyte Monocyte Erythrocyte: CFU-E, Colony Forming-Erythrocyte: CFU-GM, Colony Forming Unit-Granulocyte Monocyte: CFU-Mix)

مورد بررسی قرار گرفتند. میزان 10^4 سلول از هر گروه فوق در محیط IMDM (sigma, 1-2510, Germany) حاوی ۱/۳ درصد متیل سلولز (R&D, 1090507) ۱ درصد سرم آلبومین گاوی (BSA, Sigma, A7906, Germany)، ۳۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS)، ۰/۱ میلی‌مولار ۲- مکرکاپتواتانول (2-ME, Sigma, Germany)، و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۲ میلی‌مولار آل‌گلوتامین، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر اینترلوکین ۳ (IL-3) ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر SCF، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر GM-CSF و ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر FLT3L در پلیت‌های ۳۵ میلی‌متری (FALCON, Germany) (در دو تکرار) کشت شدند. کشت‌ها به مدت ۱۴ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 قرار داده شدند. کلونی‌ها بر اساس روش شناسایی کلونی‌های انسانی شرکت Stem Cell شمارش شد (۱۶). به این ترتیب که طبق رفرانس، کلونی‌های قرمز رنگ حاوی بیش از ۵۰ سلول هموگلوبین‌دار که به صورت یک مجموعه و یا چند مجموعه متراکم قرار گرفته‌اند نشان دهنده تکثیر رده اریتروییدی بوده و در دسته CFU-E قرار می‌گیرند، کلونی‌های پراکنده که نشان دهنده تکثیر و تمایز رده میلویدی هستند در دسته CFU-GM قرار می‌گیرند که طبق رفرانس این دسته حاوی سلول‌های منوسیتی/گرانولوسیتی‌اند و کلونی‌هایی با یک توده مرکزی از سلول‌های اریتروییدی که توسط سلول‌های منفرد بزرگ که متعلق به دودمان‌های مگاکاریوسیت/ماکروفاژ/گرانولوسیت هستند، احاطه شده‌اند در دسته CFU-Mix قرار گرفتند (شکل ۱).

بررسی شاخص‌های سطحی و میزان بیان پروتئین‌های شوک حرارتی به روش فلوسایتومتری

به منظور بررسی شاخص‌های سطحی سلول‌های کشت شده، از

و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (حداکثر ۱ ماه).

تعیین حداکثر دوز موثر و غیرسمی عصاره توموری بر سلول‌های CD34

به منظور تعیین غلظت موثر از ماده که بتواند حداقل ۵۰ درصد از سلول‌های محیط کشت سلول‌های CD34⁺ خون بندناف را زنده نگهدارد، میزان ۱۰^۶×۱/۵ سلول در میلی‌لیتر از سلول‌های CD34⁺ با ۱۰۰ درصد سلول زنده به محیط کشت اضافه شد و کشت در حضور غلظت‌های متفاوت از عصاره سلول‌های توموری MDA-MB468 (۱۰۰-۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) انجام گرفت. شمارش سلول‌های زنده پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد توسط تریان‌بلو انجام شد و بیشترین غلظتی از ماده که سبب حداقل ۵۰ درصد کاهش درصد سلول‌های زنده گردید دوز موثر منظور شد.

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری، پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها توسط تست Kolmogorov Smirnov، از آزمون آماری ANOVA با روش Post Hoc Test (Tukey HSD) برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌ها و آزمون Paired t Test و آزمون T-Test برای مقایسه نتایج روزهای مختلف کشت استفاده و تفاوت‌های با $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ویژگی سلول‌های جدا شده

میانگین حجم نمونه‌های خون جداشده از بندناف (N=۱۰) 60.87 ± 16.53 (۳۵-۸۸) میلی‌لیتر بود که از این مقدار به طور متوسط تعداد $1.0 \times 10^6 \pm 2.21 \times 10^6$ سلول تک هسته ($1.0 \times 10^6 \times 6/46-0.87$) با درصد زنده بودن 91.75 ± 16.33 درصد (۱۰۰-۵۲/۲) درصد به دست آمد. بدین ترتیب هر میلی‌لیتر خون بندناف به طور متوسط حاوی 5.6×10^6 سلول تک هسته بود. از این میزان سلول تک هسته، تعداد $2.4 \pm 0.89 \times 10^6$ (۰/۵۸-۳/۸۵×۱۰^۶) سلول CD34⁺ با درصد حیات $7.42 \pm 7.85/83$ درصد و با خلوص 79.34 ± 7.53 درصد (۸۷/۶-۶۴/۳) حاصل شد. بدین ترتیب سلول‌های CD34⁺ 0.70 ± 0.40 درصد از سلول‌های تک هسته خون بندناف را تشکیل داده‌اند.

اثر لیزات توموری بر بقای سلول‌های CD34⁺

به منظور بررسی اثر سمی عصاره سلول‌های توموری و نیز محاسبه غلظت مناسب از عصاره سلول توموری برای کشت سلول‌های CD34⁺، مقادیر متفاوتی از عصاره سلول‌های توموری (۱۰۰-۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به 1.0×10^6 میلی‌لیتر سلول CD34⁺ با درصد زنده بودن ۱۰۰ اضافه و تعداد و درصد زنده بودن سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت محاسبه شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب کاهش شدید سلول‌های زنده می‌شود ($0.4-0.8 \times 10^6$). در

به این ترتیب که ابتدا سلول‌های کشت شده در روزهای ۷ و ۱۴ شمارش و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (1.0×10^6 سلول در میلی‌لیتر) در داخل لوله‌های مخصوص ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه با سرم ۳ درصد موش مجاور شد و پس از یک مرحله شستشو میزان ۱۰-۷ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های کونژوگه به سلول‌ها اضافه و در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. زمان لازم برای انکوباسیون آنتی‌بادی‌ها طبق توصیه شرکت سازنده تعیین شده بود. در انتها سلول‌ها با پارافرمالدهید ۱ درصد فیکس و توسط دستگاه فلوئوسیتومتری برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌های شوک حرارتی درون سلولی نیز از آنتی‌بادی‌های

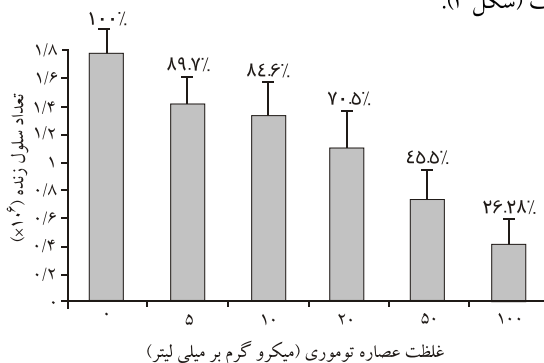
HSP60, Clone LK-2 (SPA-807, Stressgene), HSP70, Clone C92F3A-5 (SPA-810, Stressgene), (HSP90, Clone 16F1 (SPA-835, Stressgene)

استفاده شد. ابتدا سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲ ساعت فیکس شدند و سپس توسط محلول ۰/۱ درصد تریتن X1۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نفوذپذیر شدند. از سرم ۳ درصد موش به مدت ۱۵ دقیقه به منظور کاهش واکنش‌های متقاطع استفاده شد. میزان ۷-۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های کونژوگه ضد پروتئین‌های شوک حرارتی به سلول‌ها اضافه و در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در پایان سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ۱ درصد فیکس و توسط دستگاه فلوئوسیتومتر آنالیز شدند. برای هر نمونه از کنترل ایزوتیپ مناسب (IgG1-FITC, X0927- Dako و IgG1-PE, X0928- Dako) و IgG2a-FITC, X0933-Dako استفاده شد.

تهیه عصاره سلول‌های توموری

سلول‌های آدنوکارسینوما MDA-MB468 (آدنوکارسینوما متاستاتیک پستان) از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت کامل RPMI ۱۶۴۰ (Gibco, REI 21815-034, Germany) کشت شدند و پس از رسیدن به انباشتگی مناسب به منظور القای پروتئین‌های شوک حرارتی تحت تیمار دمایی ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه قرار گرفتند. پس از حرارت دهی، سلول‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و سلول‌ها در فواصل زمانی ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴ ساعت از انکوباتور خارج، شمارش و درصد سلول‌های زنده محاسبه شد. سپس سلول‌ها شستشو شدند و توسط سانتریفیوژ (۶۰۰ دور، ۵ دقیقه) ته‌نشین سلولی تهیه و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به عنوان گروه کنترل از سلول‌های کشت شده بدون القاء شوک حرارتی استفاده شد. برای تهیه عصاره سلولی از ۷ چرخه متوالی فریز در نیتروژن مایع و ذوب در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد (هر چرخه ۵ دقیقه) استفاده شد. سپس سلول‌ها توسط سانتریفیوژ (۶۰۰ دور، ۵ دقیقه) ته‌نشین شدند و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. غلظت پروتئینی در هر گروه به روش برادفورد تعیین شد. عصاره تهیه شده به روش فوق در حجم‌های ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر تقسیم

غلظت‌های پایین‌تر از ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، اختلاف معنی‌داری میان تعداد سلول‌ها نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد ($10^6 \times 1/4 - 1/2$ در برابر $10^6 \times 1/4$) ($P > 0.05$) (شکل ۲). لذا در این مطالعه غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره توموری به عنوان بالاترین غلظت با کمترین اثر سمی بر سلول‌های $CD34^+$ مورد استفاده قرار گرفت.

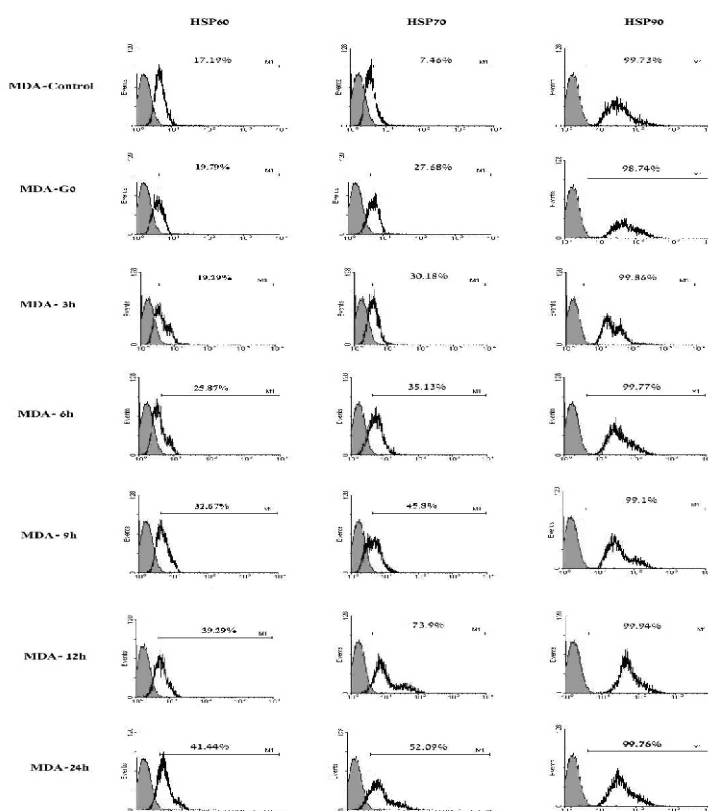


شکل ۲: اثر عصاره سلول توموری بر بقای سلول‌های $CD34$ خون بندناف ($1/5 \times 10^6$ میلی‌لیتر) از سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در حضور غلظت‌های متفاوت عصاره سلول توموری کشت شدند. با استفاده از تریپان‌بلو درصد سلول‌های زنده محاسبه شد. ستون‌ها نشان دهنده میانگین تعداد سلول‌های زنده \pm اختلاف واریانس (Mean \pm SD) ۴ آزمایش است. اعداد هر ستون بیانگر درصد زنده ماندن سلول‌ها در آن گروه است.

تغییر بیان $HSP70$ و $HSP60$ پس از شوک حرارتی در این مطالعه حرارت ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه سبب القای بیان پروتئین‌های شوک گرمایی در سلول‌های توموری MDA-MB468 شد. بررسی درصد زنده بودن سلول‌ها در این زمان و طی این مدت هیچ گونه کاهش نشان نداد (درصد زنده بودن سلول‌ها $97/8 \pm 2/0$ بود که نشان دهنده قابل تحمل بودن این دما و زمان محاسبه شده برای سلول است). بررسی بیان $HSP60$ ، 70 ، 90 توسط سلول‌های توموری پس از حرارت‌دهی با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی و به روش فلوسایتمتری نشان داد ۱۲ ساعت پس از اتمام شوک گرمایی (۴۵ درجه به مدت ۴۵ دقیقه)، $73/9$ درصد از سلول‌های توموری، پروتئین 70 HSP را بیان کردند و بیان این پروتئین‌ها پس از ۱۲ ساعت، کاهش یافت. بیان پروتئین $HSP60$ ($41/44$ درصد) ۲۴ ساعت پس از اتمام شوک گرمایی افزایش یافت. در حالی که سلول‌های توموری

تغییر بیان $HSP70$ و $HSP60$ پس از شوک حرارتی

شکل ۳: بررسی بیان پروتئین‌های شوک گرمایی ($HSP60$ ، $HSP70$ ، $HSP90$) به دنبال تیمار حرارتی در سلول‌های توموری MDA-MB468 توسط فلوسایتمتری. سلول‌های توموری MDA-MB468 به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و پس از انتقال به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در فواصل زمانی ۲۴ (MDA-24h)، ۱۲ (MDA-12h)، ۹ (MDA-9h)، ۶ (MDA-6h)، ۳ (MDA-3h)، ۰ (MDA-G0) و بدون حرارت دهی (MDA-Control) جمع‌آوری شدند و بیان HSP‌ها توسط آنتی‌بادی‌های کوئزوگه و به روش فلوسایتمتری بررسی شد.



شکل ۳: بررسی بیان پروتئین‌های شوک گرمایی ($HSP60$ ، $HSP70$ ، $HSP90$) به دنبال تیمار حرارتی در سلول‌های توموری MDA-MB468 توسط فلوسایتمتری. سلول‌های توموری MDA-MB468 به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و پس از انتقال به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در فواصل زمانی ۲۴ (MDA-24h)، ۱۲ (MDA-12h)، ۹ (MDA-9h)، ۶ (MDA-6h)، ۳ (MDA-3h)، ۰ (MDA-G0) و بدون حرارت دهی (MDA-Control) جمع‌آوری شدند و بیان HSP‌ها توسط آنتی‌بادی‌های کوئزوگه و به روش فلوسایتمتری بررسی شد.

آزمایش ۵-۳ بار تکرار شد. در تمام گروه‌ها حداکثر افزایش تعداد سلول‌ها در روز ۷ دیده شد و با افزایش زمان کشت تعداد سلول‌ها کاهش یافت. گروه MDA از بیشترین کاهش تعداد سلولی پس از ۷ و ۱۴ روز برخوردار بود (۰/۹۲±۰/۳۶ در مقایسه با ۲/۹۳±۰/۸۳ گروه دوم و ۶/۰۱±۲/۳۷ گروه سوم) (p<۰/۰۵). افزایش سلول‌ها پس از ۱۴ روز کشت به ترتیب ۹/۷±۴/۷ برابر در گروه اول، ۵۹/۷±۳۹ برابر در گروه دوم و ۲۲۵/۲±۱۳۱ برابر در گروه سوم بود (جدول ۲).

اثر عصاره سلول‌های توموری حرارت دیده و حرارت ندیده بر کشت سلول‌های CD34⁺

سلول‌های CD34⁺ با خلوص اولیه ۷۹/۳۴±۷/۵۳ درصد طی ۱۴ روز در ۳ گروه مختلف MDA (حاوی ترکیبات ساینوکائینی موثر در تکثیر سلول‌های CD34⁺ و عصاره سلول‌های توموری)، MDA-HSP (حاوی ترکیبات ساینوکائینی موثر در تکثیر سلول‌های CD34⁺ و عصاره سلول‌های توموری حرارت دیده) و گروه کنترل (تنها حاوی ترکیبات ساینوکائینی موثر در تکثیر سلول‌های CD34⁺ کشت شدند (هر

جدول ۱: مشخصات آنتی بادی‌های مورد استفاده در تشخیص فنوتیپ سلول‌های CD43⁺ کشت شده و سلول‌های توموری حرارت دیده

نام آنتی بادی	کلون	شماره کاتالوگ	شرکت	ایزوتیپ
CD14-PE	TUK4	R0864	Dako	IgG2a
CD34-FITC	-	130-081-001	MACS	IgG2a
CD38-FITC	AT13/5	F7101	Dako	IgG1
CD45-FITC	P4.8	CBL124F	Chemicon	IgG2a
CD19-FITC	HIB19	11-0199-71	Ebioscience	IgG1
CD56-PE	MEM188	12-0569-71	Ebioscience	IgG2a
HSP60	Lk-2	SPA-807	Stressgene	IgG1
HSP70	C92F3A-5	SPA-810	Stressgene	IgG1
HSP90	16F1	SPA-835	Stressgene	IgG2a
IgG1-PE(Neg. Co)	-	X0928	Dako	-
IgG1-FITC(Neg. Co)	-	X0927	Dako	-
IgG2a-FITC(Neg. Co)	-	X0933	Dako	-

جدول ۲: تعداد سلول‌های CD43⁺ در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ از کشت. اعداد میانگین ۵-۳-آزمایش در هر گروه ± انحراف معیار (Mean±SD) است.

گروهها	No. Cells (x10 ⁶)			
	روز ۰	روز ۷	روز ۱۴	جمع
MDA	۰/۷۰±۰/۳۵ (Range: ۰/۳۵-۱/۶)	۳/۵۲±۱/۷۷ (Range: ۱/۵-۸/۰)	۰/۹۲±۰/۳۶ (Range: ۰/۴۵-۱/۶)	۳/۱۳±۱/۶۶ (Range: ۰/۷۵-۴/۵۲)
MDA-HSP	۰/۷۵±۰/۳۹ (Range: ۰/۴-۱/۷)	۶/۲۸±۲/۰۷ (Range: ۱/۰-۳/۰)	۲/۹۳±۰/۸۳ (Range: ۱/۶-۴/۲)	۱۹/۰۵±۹/۱۹ (Range: ۴/۸-۳۵/۷)
کنترل	۰/۶۱±۰/۱۶ (Range: ۰/۴۵-۰/۹)	۱۰/۵۹±۲/۷۷ (Range: ۶/۷۷-۱۵/۵)	۶/۰۱±۲/۳۷ (Range: ۳/۳-۱۰/۹)	۷۱/۰۷±۳۵/۳۴ (Range: ۲۲/۱۱-۱۶۴/۴۹)

جدول ۳: درصد تشکیل انواع کلونی توسط سلول‌های CD34⁺ کشت شده در حضور ترکیبات متفاوت توموری و ساینوکائینی. CFU-E: کلونی اریتروبیدی، CFU-GM: کلونی گرانولوسیتی/ماکروفاژی، CFU-Mix: کلونی گرانولوسیتی/ماکروفاژی/مکاکاریوسیتی. اعداد میانگین ۳-آزمایش (به صورت دوتکرار) در هر گروه ± انحراف معیار (Mean±SD) است.

گروهها	روز ۰				روز ۷				روز ۱۴			
	CFU-E	CFU-GM	CFU-MIX	CFC	CFU-E	CFU-GM	CFU-MIX	CFC	CFU-E	CFU-GM	CFU-MIX	CFC
گروه اول (MDA)	۱۸/۱±۶/۱	۶/۰±۲/۶	۶/۹±۲/۵	۳۱/۱±۷/۳۷ (جمع)	۵/۰±۲/۹	۷/۰±۲/۹	۱/۷±۰/۵	۱۳/۸±۳/۳ (جمع)	۱/۴±۱/۱	۹/۱±۵/۰	۰/۴±۰/۵	۱۱±۵/۱۱
گروه دوم (MDA-HSP)	۲۰/۴±۷/۶	۷/۱±۴/۰	۵/۲±۴/۵	۳۲/۸±۱۲/۳	۱۱/۸±۴/۱	۱۴/۰±۵/۰	۸/۰±۱/۸	۳۳/۹±۵/۲	۸/۶±۴/۰	۲۳/۰±۵/۵	۲/۲±۱/۷	۳۳/۹±۶/۸۶
گروه سوم (کنترل)	۱۹/۸±۵/۳	۸/۴±۳/۲	۶/۳±۲/۴۷	۳۴/۷±۸/۹	۲۵/۷±۶/۵	۱۸/۷±۱/۲	۸/۰±۲/۲	۵۲/۵±۷/۴	۱۳/۸±۲/۶۱	۲۴/۸±۷/۶	۵/۶±۱/۸	۴۴/۳±۸/۸

بررسی توانایی تشکیل کلونی

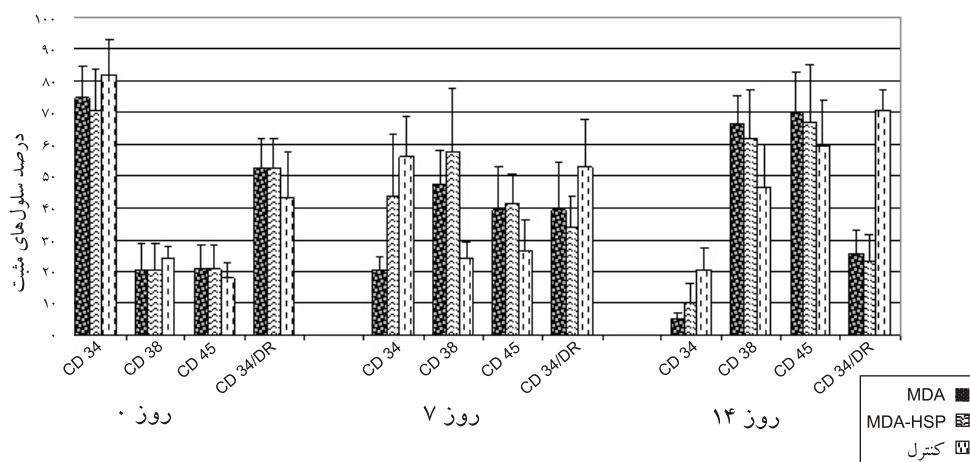
از جمله خصوصیات سلول‌های بنیادی و پیش‌سازهای خونی تشکیل انواع کلونی‌های خونی (CFU-E, CFU-GM, CFU-Mix) است. نتایج شمارش و تعیین نوع کلونی در کشت سلول‌های CD34⁺ در جدول ۳ نشان داده شده است. شمارش کلونی‌های تشکیل شده (CFC) در ۳ گروه در جدول ۳ نشان داده شده است. توانایی تشکیل کلونی در گروه MDA پس از ۷ روز کشت، کاهش شدیدی یافت ($p < 0.05$) و سپس تغییر عمده‌ای نکرد ($p > 0.03$). در گروه MDA-HSP این توانایی طی ۱۴ روز کشت ثابت ماند ($p > 0.04$) و تنها در نوع کلونی‌ها تغییر ایجاد شد و در گروه کنترل افزایش نسبی در توانایی تشکیل کلونی طی ۷ روز اول مشاهده شد ($p < 0.05$) که در ۷ روز دوم کاهش یافت ($p > 0.05$).

بررسی تشکیل انواع کلونی‌ها در هر گروه و طی روزهای متفاوت کشت نشان داد که در گروه اول طی ۷ روز ابتدایی کشت تعداد کلونی‌های اریترئوئیدی (CFU-E) و مختلط سلولی (CFU-Mix) نسبت به روز اول کاهش یافت و سپس تا هفت روز بعدی ثابت ماند. این در حالی بود که تعداد کلونی‌های گرانولوسیتی / منوسیتی

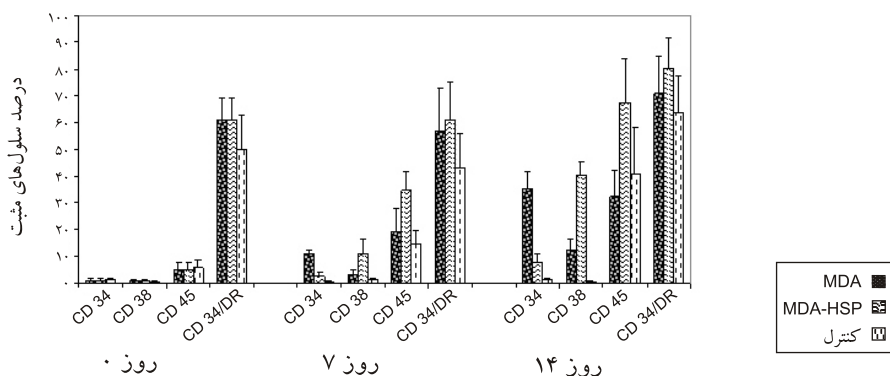
(CFU-GM) طی ۱۴ روز تغییر معنی‌داری نکرد ($p > 0.05$). در گروه دوم در ۷ روز ابتدایی کشت، کاهش معنی‌دار CFU-E و افزایش معنی‌داری در CFU-GM مشاهده شد در حالی که درصد کلونی‌های CFU-Mix تغییری نیافت ($p > 0.05$). افزایش مدت زمان کشت در این گروه سبب کاهش درصد CFU-Mix و CFU-E و افزایش درصد CFU-GM شد ($p < 0.05$). در گروه سوم، افزایش درصد کلونی‌های گرانولوسیتی / منوسیتی دیده شد ($p < 0.05$) و تغییر معنی‌داری در درصد سایر کلونی‌ها حتی در کشت‌های طولانی مدت مشاهده نشد ($p > 0.05$) (جدول ۳).

بررسی فنوتیپ سلول‌های CD34⁺ کشت شده در حضور ترکیبات سیتوکینینی متفاوت و در زمان‌های متفاوت کشت

به منظور ردیابی بررسی بیان شاخص‌های سطحی سلول‌های CD34⁺ در گروه‌های مختلف، از تکنیک فلوسیتومتری و آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد شاخص‌های سطحی CD14, CD38, CD34, CD56, CD19, CD156 و HLA-DR کونژوگه با FITC و یا PE استفاده شد (جدول ۱). نتایج در شکل ۴A و ۴B نشان داده شده است.



شکل ۴A: بررسی شاخص‌های CD34⁺ سلول‌های CD34/DR و CD34, CD38, CD45 کشت شده در گروه‌های متفاوت توسط فلوسیتومتری. اعداد میانگین ۳ بار تکرار در هر گروه بوده و خطوط بالای هر ستون نشان دهنده انحراف معیار است.



شکل ۴B: بررسی شاخص‌های رده‌ای (CD14, CD56, CD19, HLA-DR) در سلول‌های CD34⁺ کشت شده در گروه‌های متفاوت توسط فلوسیتومتری. اعداد میانگین ۳ بار تکرار در هر گروه بود و خطوط بالای هر ستون نشان دهنده انحراف معیار است.

نقص این سلول‌ها نمی‌شود (۸). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که عوامل موجود در ریز محیط سلول‌های بنیادی خون‌ساز نقش موثری در حفظ پتانسیل خود تجدیدشوندگی و یا تمایز این سلول‌ها و پیش‌سازهای خون‌ساز دارند و امروزه اکثر مطالعات با هدف دستیابی به ترکیباتی انجام می‌گیرد که سبب حفظ و نگهداری توانایی خود تجدیدشوندگی این سلول‌ها بدون بروز تمایز شوند (۲۱).

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر عصاره سلول‌های توموری و نیز سلول‌های توموری که محتوای HSP درون سلولی آنها توسط حرارت افزایش یافته است، بر کشت سلول‌های CD34⁺ خون بندناف انجام گرفت. از آنجا که سلول‌های پیش‌ساز خونی به یک سیتوکاین منفرد پاسخ نمی‌دهند، معمولاً کاربرد چند سیتوکاین به طور هم‌زمان در محیط کشت به منظور افزایش تکثیر سلول‌ها پیشنهاد می‌شود (۲۲)، لذا این مطالعه در حضور غلظت‌های مشخص از سیتوکاین‌های SCF, FLT3L, GM-CSF, TPO و IL-۳ در سه گروه متفاوت انجام گرفت. به این صورت که به ترکیبات سیتوکاینی فوق میزان ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره سلول‌های توموری MDA-MB468 (گروه MDA) و یا عصاره سلول‌های توموری MDA-MB468 که میزان پروتئین‌های شوک حرارتی آن توسط دما افزایش یافته بود (MDA-HSP) اضافه شد. گروه کنترل تنها سیتوکاین‌های مورد نیاز کشت را دریافت داشت. مطالعات نشان داده‌اند که رسپتور تیروزین کیناز FLT3L هم‌سو با لیگاند C-Kit (SCF) و فاکتور تحریک‌کننده کلونی گرانولوستی-مونوسیتی (GM-CSF) سبب تکثیر پیش‌سازهای متعدد اولیه می‌شود (۲۳) و ترکیب سه سیتوکاین SCF, FLT3L و IL-۳ نیز مسئول کشت کوتاه مدت سلول‌های CD34⁺ بدون القای روند تمایز هستند (۲۴). TPO نیز در تکثیر و تمایز مگاکاریوسیت‌ها موثر است (۲۵). لذا ترکیب سیتوکاینی انتخاب شده توانایی حفظ خواص خودتجدیدشوندگی را در سلول‌ها دارا است که البته قدرت تکثیر و توانایی تشکیل کلونی در گروه کنترل این مطلب را اثبات می‌کند. در این گروه بیشترین تکثیر سلولی (۱۵۵/۰ ± ۲۵۵/۲) برابر نسبت به جمعیت اولیه مشاهده شد. این سلول‌ها تا روز ۱۴ خاصیت تکثیری خود را همچنان حفظ کرده‌اند. علاوه بر آن که قدرت تشکیل کلونی (CFC) در این گروه طی ۷ روز اول ۱/۵ برابر افزایش یافت و در روز ۱۴ کاهش جزئی یافت (p>۰/۰۵). این مطالعه نشان داد که این ترکیب سیتوکاینی سبب افزایش کلونی‌های اریترویدی و نیز گرانولوسیتی با افزایش زمان می‌شود در حالی که در تشکیل کلونی‌های مختلط (CFU-Mix) اثری اعمال نمی‌کند (p>۰/۰۵). از آنجا که کلونی‌های مختلط غنی از سلول‌های بنیادی‌اند به نظر می‌رسد این ترکیب سیتوکاینی سبب حفظ خواص بنیادی در سلول‌های خون‌ساز شده باشد.

افزایش ترکیبات محلول سلول‌های توموری آدنوکارسینوما MDA-MB468 در گروه MDA و یا ترکیبات محلول سلول‌های توموری MDA-MB468 حرارت دیده در گروه MDA-HSP به این محیط سیتوکاینی سبب تغییر روند تکثیر و توانایی تشکیل کلونی در سلول‌های CD34⁺ شد. به این ترتیب در گروهی که ترکیبات

شکل ۴A به بررسی شاخص‌های مربوط به سلول‌های بنیادی خون‌ساز و پروژنیوتورها پرداخته است. در همه گروه‌ها افزایش زمان سبب کاهش درصد سلول‌های CD34⁺ و افزایش درصد سلول‌های CD38⁺ و CD45⁺ شد. کاهش درصد سلول‌های CD34⁺ در گروه اول بیشتر از دو گروه دیگر بود (۵/۳±۱/۸ درصد در مقایسه با ۶/۲±۱۰/۱ درصد در گروه دوم و ۷/۰±۲/۰ درصد در گروه سوم در روز ۱۴ کشت). همچنین درصد سلول‌های CD38⁺ (شاخص تمایز سلول‌های خون‌ساز به سمت رده میلویدی) و CD45⁺ (شاخص لکوسیتها) با افزایش زمان افزایش یافت. به طوری که گروه اول و دوم از نظر تعداد این سلول‌ها نسبت به گروه سوم اختلاف معنی‌داری نشان دادند (p<۰/۰۵) اما نسبت به یکدیگر اختلافی نداشتند (p>۰/۰۵). در این مطالعه درصد سلول‌های CD34⁺/HLA-DR⁺ با افزایش مدت زمان کشت به ترتیب در گروه اول و دوم کاهش و در گروه سوم افزایش یافت (شکل ۴A). شکل ۴B نتایج بررسی درصد سلول‌های بیان‌کننده CD19 (سلول B)، CD56 (سلول NK) و CD14 (سلول منوسیت و ماکروفاژ) را در سه گروه مورد آزمایش نشان می‌دهد. در گروه اول و دوم با افزایش زمان کشت درصد سلول‌های CD19⁺ و CD56⁺ افزایش یافت. به طوری که پس از ۱۴ روز کشت درصد سلول‌های CD19⁺ نسبت به گروه دوم افزایش معنی‌دار نشان داد (۶/۷±۱۲/۷ درصد در گروه اول و ۲/۴±۵/۹ درصد در گروه دوم). در حالی که در گروه دوم درصد سلول‌های CD56 نسبت به گروه اول افزایش نشان داد (۷/۰±۳/۷ درصد در گروه دوم و ۳/۷±۴/۸ درصد در گروه اول). گروه سوم از نظر این نوع شاخص‌ها تفاوتی طی کشت نشان نداد. درصد سلول‌های CD14⁺ در هر سه گروه با افزایش زمان افزایش یافت که البته این افزایش در گروه دوم بیشتر از دو گروه دیگر بود (شکل ۴B). شاخص HLA-DR نیز با افزایش زمان در هر سه گروه افزایش یافت که البته این افزایش در بین گروه‌ها معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵) (شکل ۴B).

بحث

مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های توموری با ترشح عوامل متفاوت از جمله TGFβ، عامل رشد اندوتلیال رگی (VEGF)، IL-۱۰ و پروستاگلاندین E2 (۷) سبب تغییر مسیر تمایز، بلوغ و عملکرد سلول‌های خونی (۸، ۹) و در نهایت سبب تضعیف سیستم ایمنی میزبان می‌شوند. بررسی بیماران واجد کارسینوما سلول‌های پوششی سر و گردن که نقص عمده‌ای در دفاع ایمنی دارند نشان داده است (۸، ۱۷، ۱۸) نقص ایجاد شده به واسطه القای سلول‌های سرکوب‌گر ایمنی مشتق از سلول‌های پیش‌ساز خونی CD34⁺ است (۱۹). در این بیماران سلول‌های توموری به ترشح GM-CSF پرداخته که سبب فراخوانی سلول‌های CD34⁺ مغز استخوان به موضع تومور می‌گردند و سرانجام سلول‌های CD34⁺ مهاجر در حضور ریز محیط سلول‌های توموری به سلول‌های سرکوب‌گر سیستم ایمنی تمایز می‌یابند (۱۹، ۲۰) و حتی انتقال این سلول‌ها به محیط کشت مناسب و تمایز هدف دار آنها به سمت سلول‌های مطلوب، سبب رفع

داده‌اند که بیان CD38 و کاهش بیان CD34 از اولین مراحل تمایز سلول‌های خون‌ساز به سمت رده میلوئیدی محسوب می‌شوند (۲۶) و بیان DR بر سطح این سلول‌ها نیز از اولین وقایع تمایز در سلول‌های بنیادی و پیش‌سازهای خونی است. امروزه برخی مطالعات نشان داده‌اند که سلول $HSC-DR^+$ قدرت تمایز به انواع سلول‌ها و دودمان‌های خونی را دارد و بنابراین هنوز یک سلول بنیادی واقعی در نظر گرفته می‌شود. بر اساس مطالعه سرور و همکاران مشخص شد سلول‌های $CD34^+/DR^+$ مغز استخوان به پیش‌سازهای با قدرت کلونی‌زایی بالا تمایز می‌یابند (۲۷). همچنین شیان هونگ و همکارانش نیز گزارش کرده‌اند که سلول‌های $CD34^+CD38-DR^+$ سلول‌های با قدرت خودتجدیدشوندگی هستند و اکثر سلول‌های پیش‌ساز اولیه سلول‌های بنیادی لنفوییدی و میلوئیدی در این گروه قرار دارند (۲۸). آنتی‌ژن ۲۲۰-۱۸۰ کیلودالتونی CD45 نیز بر سطح اکثر لکوسیت‌ها شامل لنفوسیت/مونوسیت/گرانولوسیت/ائوزینوفیل و بازوفیل بیان شده و در انتقال پیام موثر است. این شاخص به طور ضعیفی بر سطح سلول‌های بنیادی خون‌ساز بیان می‌شود (۲۹). تمام شواهد فوق حاکی از آن است که ترکیبات سلول توموری (MDA, MDA-HSP) بر تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز اثر می‌گذارند. مطالعات مشابهی در زمینه اثر عصاره سلول‌های توموری و یا اثر مستقیم سلول‌های توموری بر سلول‌های بنیادی $CD34^+$ انجام نشده است و اکثر مطالعات در زمینه پروتئین‌های شوک حرارتی نیز به بررسی اثرات این ماده در افزایش فعالیت سیستم ایمنی و یا خواص ضد تومور آن پرداخته بودند. به این ترتیب با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان چنین استنتاج کرد که در گروه‌های اول و دوم که با کاهش شدید سلول‌های $CD34^+$ و $CD34^+/DR^+$ و نیز افزایش بیان CD45 و CD38 همراه است، به مسیر تمایز وارد شده‌اند. در این گروه‌ها و خصوصاً گروه اول تکثیر به منظور خود تجدید شونده‌گی کاهش یافته و تکثیر مشاهده شده تنها به منظور افزایش پیش‌سازهای متعدد ترمیلوئیدی و لنفوییدی است که نتایج حاصل از شمارش سلولی و کاهش توانایی تشکیل کلونی خصوصاً کلونی‌های مختلط (CFU-Mix) و نیز بیان شاخص‌های رده‌ای (CD19, CD56, CD14) تاییدی بر این مطلب است. بیان شاخص‌های CD19 و CD56 نشانه‌ای از حرکت به سمت مسیر تمایز لنفوییدی و تولید سلول‌های NK و B است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که سلول‌های $CD34^+$ در محیط‌های کشت قدرت تمایز به رده‌های میلوئیدی را دارند و تمایز به سمت رده‌های لنفوییدی همچون تولید سلول‌های B و یا NK در حضور سلول‌های تغذیه‌کننده استرومایی موش و یا کشت‌های طولانی مدت امکان‌پذیر است (۳۰). با این وجود در این مطالعه تمایز به سمت رده‌های لنفوییدی در محیطی عاری از سلول‌های تغذیه‌کننده و در حضور عصاره سلول‌های توموری طی ۱۴ روز کشت امکان‌پذیر شد (شکل ۴B). در گروه دوم که سلول‌های توموری حرارت دیده بودند پتانسیل تکثیر و تشکیل کلونی نسبت به گروه اول بالاتر بود و سلول‌ها نیز در جهت تشکیل سلول‌های NK و CD14 تغییر تمایز یافته بودند. با بررسی این گروه می‌توان

سلول‌های توموری حرارت دیده را دریافت داشته بودند نسبت به گروهی که تنها عصاره توموری دریافت کرده بودند تکثیر سلول‌ها در ۷ روز اول افزایش چشم‌گیر و از کاهش کمتری در روز ۱۴ برخوردار بود (جدول ۲). تکثیر سلولی و نیز توانایی تشکیل کلونی (طی ۷ روز اول) در این دو گروه نسبت به گروه سوم از کاهش معنی‌داری ($p < 0.05$) برخوردار بود (جدول ۲ و ۳). این کاهش در گروه دریافت‌دارنده عصاره توموری بسیار شدیدتر از گروه دوم بود و تمام انواع کلونی‌ها را در بر می‌گرفت. در حالی که در گروهی که عصاره توموری حرارت دیده دریافت کرده بودند، بیشترین کاهش در کلونی‌های اریتروییدی (CFU-E) و کلونی‌های مختلط (CFU-Mix) مشاهده شد (جدول ۳). به این ترتیب مشخص شد که ترکیبات سلول توموری مورد آزمایش سبب کاهش تکثیر سلولی شده‌اند. این کاهش می‌تواند ناشی از سمیت سلول توموری، از دست رفتن پتانسیل خودتجدیدشوندگی و یا همانندسازی به دنبال تمایز و یا القای مرگ سلولی باشد. از آنجا که در این مطالعه غلظتی انتخاب شد که حداقل سمیت را برای سلول کشت شده دارا باشد، لذا کاهش جمعیت، ناشی از سمیت عصاره نیست. از آنجا که در این مطالعه بررسی آپوپتوز سلول‌ها به دنبال تیمار با عصاره سلول توموری صورت نگرفت اما با توجه به کاهش توانایی تشکیل کلونی خصوصاً CFU-Mix در گروه‌های دریافت‌دارنده عصاره توموری (MDA, MDA-HSP) و CFU-GM در گروه دریافت‌کننده عصاره سلول توموری حرارت ندیده (MDA) چنین به نظر می‌رسد که سلول‌ها در این دو گروه وارد مسیر تمایزی شده باشند. ورود به مسیر تمایز سبب کاهش تکثیر می‌شود.

بررسی فنوتیپ سلولی با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی در این ۳ گروه نشان داد که درصد سلول‌های $CD34^+$ در هر سه گروه با افزایش زمان کشت کاهش می‌یابد. کاهش درصد سلول‌های $CD34^+$ در گروه دریافت‌دارنده عصاره MDA ($5/3 \pm 1/8$) بیش از گروه دریافت‌کننده عصاره MDA+Hsp ($10/1 \pm 6/2$) و گروه کنترل ($20/5 \pm 7/0$) است. درصد سلول‌های $CD38^+$ و $CD45^+$ نیز با افزایش زمان به ترتیب در هر سه گروه افزایش یافت که افزایش این شاخص‌ها در هر گروه در راستای کاهش سلول‌های $CD34^+$ بود (شکل ۴A). درصد سلول‌های $CD34^+/Hla-DR^+$ نیز در گروه سوم با افزایش زمان کشت، افزایش و در گروه اول و دوم کاهش یافت. بررسی شاخص‌های اختصاصی رده‌های خونی نیز نشان داد که در دو گروه دریافت‌کننده عصاره توموری (گروه اول و دوم) شاخص‌های CD19، CD56 و CD14 افزایش می‌یابد. به این صورت که در گروه اول درصد سلول‌های $CD19^+$ و $CD56^+$ به ترتیب از $1 \pm 0/5$ درصد و $0/9 \pm 0/4$ درصد در روز صفر آزمایش به $6/5 \pm 12/7$ درصد و $4/8 \pm 3/5$ درصد در روز چهاردهم افزایش یافت. در گروه دوم نیز پس از چهارده روز کشت درصد سلول‌های $CD19^+$ و $CD56^+$ به ترتیب از $1 \pm 0/5$ درصد و $0/9 \pm 0/4$ درصد به $5/9 \pm 2/4$ درصد و $20/3 \pm 7/3$ درصد تغییر یافت. این دو نوع شاخص رده‌ای در گروه سوم نسبت به روز اول اختلاف معنی‌داری نشان ندادند ($p > 0.05$) (شکل ۴B). مطالعات نشان

(چپرون) مولکولی در چین خوردگی، جابه‌جایی پروتئین‌ها و انتقال سیگنال دارند (۱۱، ۱۴)، دارای نقش مهمی نیز در تحریک سیستم ایمنی و پاسخ‌های ضدتومورها و پاتوژن‌ها هستند. به نظر می‌رسد به دلیل حضور رستپوره‌های سطحی بر سطح سلول‌های خونی، HSP60، HSP70، HSP90 نقش مهمی در ایمنی‌زایی تومور به عهده داشته باشند و به عنوان پیام‌های خطر (۱۲، ۱۳) برای مراقبت ایمنی عمل کنند. در هر صورت حضور سایر ترکیبات در محتوای این سلول‌های حرارت دیده را نیز باید مدنظر داشت.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد بخشی از اثرات سلول‌های توموری بر سیستم ایمنی و سرکوب آن در موجودات زنده خصوصاً در شرایط متاستاتیک سرطان، ناشی از اثر بر مسیر تمایزی سلول‌های خونی و سلول‌های سیستم ایمنی باشد و تحریک افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی می‌تواند در تغییر مسیر تمایزی موثر باشد که می‌تواند مسیری برای درمان‌های آینده سرطان‌های بدخیم که با درگیری سلول‌های CD34 همراه هستند پیش رو قرار دهد. همچنین با بررسی اثر پروتئین‌های شوک حرارتی خالص در کشت سلول‌های CD34⁺ می‌توان صحت نتایج این مطالعه را تایید کرد.

References

1. Ulloa-Montoya F, Verfaillie C, Hu W. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 2005; 100(1): 12-27
2. Joshi SS, Tarantolo SR, Kuszynski CA, Kessinger A. Antitumor therapeutic potential of activated human umbilical cord blood cells antigens leukemia and breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 4351-4358
3. Cabrita G, Ferreira B, da Silva C, Goncalves R, Almeida-Porada G, Cabral J. Hematopoietic stem cells: From the bone to the bioreactor *Trends Biotechnol* 2003; 21(5): 233-240
4. Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 1998; 16:153-165
5. Yao C, Chu I, Hsieh T, Hwang S. A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. *Exp Hematol* 2004; 32(8): 720-727
6. Arrighi JF, Zubler R, Hauser C, Irion O, Brouwers N, Chapuis B, Kindler V. Cd34(+) cord blood cells expressing cutaneous lymphocyte-associated antigen are enriched in granulocyte-macrophage progenitors and support extensive amplification of dendritic cell progenitors. *Exp Hematol* 2001; 29(8): 1029-1037

حدس زد که حرارت سبب تغییر برخی ترکیبات درون سلولی می‌شود که می‌توانند سبب کاهش اثر ممانعتی مشاهده شده عصاره سلول توموری شوند. در این مطالعه از دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه با زمان استراحتی معادل ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. این شرایط سبب افزایش بیان HSP70 (۷۳/۹ درصد) و افزایش نسبی HSP60 (۴۴/۴۱ درصد) در سلول‌های توموری MDA-MB468 شد. بررسی سلول‌های توموری حرارت ندیده نیز نشان داد که این سلول‌ها مقادیر زیادی از HSP90 (۹۹/۷۳ درصد) را به طور دائم بیان می‌کنند و بیان این پروتئین توسط حرارت تغییر نمی‌کند (شکل ۲). سایر مطالعات از دماهای متفاوت (۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه به منظور القای پروتئین‌های شوک حرارتی استفاده کرده‌اند. انتخاب دما و مدت زمان حرارت‌دهی و نیز فاصله زمانی مورد نیاز برای بیان حداکثر پروتئین‌های شوک حرارتی با توجه به نوع سلول و شرایط محیط کشت متفاوت است (۳۱، ۳۲). به این ترتیب حدس زده می‌شود که تغییر خصوصیات و عملکرد گروه MDA-HSP به دلیل حضور پروتئین‌های شوک حرارتی باشد. مطالعات بر روی پروتئین‌های شوک گرمایی (HSPs) که در شرایط کمبود اکسیژن، کمبود مواد غذایی، حضور رادیکال‌های اکسیژن، سموم، استرس‌های دمایی، عفونت‌های ویروسی، فاگوسیتوز و ترانسفورماسیون افزایش بیان می‌یابند (۱۱) نشان داده است که آنها علاوه بر نقشی که به عنوان محافظ

7. Rosenzweig M, Camus S, Guigon M, Gluckman J. The influence of interleukin (il)-4, il-13, and flt3 ligand on human dendritic cell differentiation from cord blood cd34+ progenitor cells. *Exp Hematol* 1998; 26(1): 63-72
8. Lathers D, Lubbers E, Beal N, Wright M, Young M. Cultures derived from peripheral blood cd34+ progenitor cells of head and neck cancer patients and from cord blood are functionally different. *Hum Immunol* 1999; 60(12): 1207-1215
9. Ralf H. Isolation of primary and immortalized cd34-hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells* 2000; 18: 1-9
10. Manjili M, Wang X, J. P, Macdonald I, Li Y, Van S, RC., Subjeck J. Cancer immunotherapy: Stress proteins and hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2002; 18(6): 506-520
11. Manjili M, Wang X, Park J, Facciponte J, Repasky E, Subjeck J. Immunotherapy of cancer using heat shock proteins. *Front Biosci* 2002; 7: d43-52
12. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 991-1045
13. Lipsker D, Ziylan U, Spehner D, Proamer F, Bausinger H, Jeannin P, Salamero J, Bohbot A, Cazenave J, Drillien R, Delneste Y, Hanau D. Heat

- shock proteins 70 and 60 share common receptors which are expressed on human monocyte-derived but not epidermal dendritic cells. *Eur J Immunol* 2002; 32(2): 322-332
14. Sato K, Torimoto Y, Shindo M, Shinzaki H, Hirai K, Kohgo Y. Immunotherapy using heat-shock proteins preparations of leukemia cells after syngenic bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 98: 1852-1857
15. Vabulas R, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning C, Issels R, Wagner H. Hsp70 as endogenous stimulus of the toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002; 277(17): 15107-15112
16. Clayman G, Young G, Taylor D, Savage H, Lavedan P, Schantz S. Detection of regulatory factors of lymphokine-activated killer cell activity in head and neck cancer patients treated with interleukin-2 and interferon alpha. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992; 120(4): 395-403
17. Hadden J, Endicott J, Baekey P, Skipper P, EM. H. Interleukins and contrasuppression induce immune regression of head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120(4): 395-403
18. Pak A, Wright M, Matthews J, Collins S, Petruzzelli G, MR. Y. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: Presence of cd34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 1995; 1(1): 95-103
19. Young M, Wright M. Myelopoiesis-associated immune suppressor cells in mice bearing metastatic lewis lung carcinoma tumors: Gamma interferon plus tumor necrosis factor alpha synergistically reduces immune suppressor and tumor growth-promoting activities of bone marrow cells and diminishes tumor recurrence and metastasis. *Cancer Res* 1992; 52(22): 6335-6340
20. Chivu M, Diaconu C, Brasoveanu L, Alexiu I, Bleotu C, Banceanu G, Miscalencu D, Cernescu C. Ex vivo differentiation of umbilical cord blood progenitor cells in the presence of placental conditioned medium. *J Cell Mol Med* 2002; 6(4): 609-620
21. Bernstein I, Andrews R, Zsebo K. Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by cd34+ and cd34+lin- cells, and the generation of colony-forming cell progeny from cd34+lin- cells cultured with interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1991; 77(11): 2316-2321
22. McKenna H, de Vries P, Brasel K, Lyman S, Williams D. Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human cd34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; 86(9): 3413-3420
23. Kogler G, Callejas J, Hakenberg P, Enczmann J, Adams O, Daubener W, Krempe C, Gobel U, Somville T, Wernet P. Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: Critical issues. *J Hematother* 1996; 5(2): 105-116
24. Wyrsh A, dalle Carbonare V, Jansen W, Chklovskaja E, Nissen C, Surbek D, Holzgreve W, Tichelli A, Wodnar-Filipowicz A. Umbilical cord blood from preterm human fetuses is rich in committed and primitive hematopoietic progenitors with high proliferative and self-renewal capacity. *Exp Hematol* 1999; 27(8): 1338-1345
25. Pranke P, Hendrikx J, Debnath G, Alespeiti G, Rubinstein P, Nardi N, Visser J. Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental/umbilical cord blood after culture. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(12): 1775-1789
26. Srouf E, Brandt J, Briddell R, Grigsby S, Leemhuis T, Hoffman R. Links long-term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells in vitro. *Blood* 1993; 81(3): 661-669
27. Huang YM, Yang JS, Xu LY, Link H, Xiao BG. Autoantigen-pulsed dendritic cells induce tolerance to experimental allergic encephalomyelitis (eae) in lewis rats. *Clin Exp Immunol* 2000; 122(3): 437-444
28. Lansdorp P, Dragowska W. Maintenance of hematopoiesis in serum-free bone marrow cultures involves sequential recruitment of quiescent progenitors. *Exp Hematol* 1993; 21(10): 1321-1327
29. Shiang H, Leon WMMT. Lymphoid and myeloid differentiation of single human cd34+, hla-dr+, cd38- hematopoietic stem cells *Blood* 1994; 83(6): 151155-151526
30. Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, Fukuma D, Uemura Y, Nishimura Y. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide along with trail or programmed death-1 ligand. *J Immunol* 2005; 174(4): 1888-1897
31. Henderika MJH, Harm HK, Ody C.M. S. Hsp70 protects mitotic cells against heat-induced centrosome damage and division abnormalities. *Molecular Biology of the Cell* 2005; 16: 3776-3785