مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۳: از ۵۳-۶۱
پاییز ۱۳۸۹

نقش سلول مایلومایی بر تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز خون بند ناف به استئوکلاست در شرایط آزمایشگاهی

نجم‌الدین ساکی[۱]، سعید آبرون[۲*]، مسعود سلیمانی[۲]، سعید کاویانی[۲]، بهاره صادقی[۱]، نجمه واقف[۱]

۱- کارشناس ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۱۲/۱۰ پذیرش مقاله: ۸۹/۰۳/۲۲

چکیده

هدف: جمعیت کشورهای صنعتی به سمت پیر شدن در حال است و درصد ابتلا به بیماری‌های مرتبط با سالخوردگی و پیری نیز مانند مالتیپل مایلوما به دلیل افزایش سن، رو به افزایش است. این بیماری هم علایم و عارضه‌های مشترک با سایر بیماری‌ها و نیز علایم منحصر به فردی دارد. از عارضه‌های منحصر به فرد آن، تخریب و تحلیل بافت استخوانی وسیع در این بیماران است. نگاهی نو به ساختار کنام مغز استخوان و آثار تمایزی حاصل از همجواری سلول‌های مایلومایی بر سلول‌های بنیادی خون‌ساز مستقر در آن ضروری به‌نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه با انجام هم‌کشتی سلول‌های رده مایلومایی و سلول‌های بنیادی خون‌ساز حاصل از بند ناف اثر تمایزی هدفمند القا شده توسط سلول‌های مایلومایی بررسی شد. علاوه بر این، در این تحقیق سلول‌های مایلومایی با یک رده سلول منوبلاستی (U937) نیز کشت داده شد تا تأثیر سلول‌های مایلومایی بر تمایز سلول‌های منوبلاستی ارزیابی شود.

نتایج: افزایش بیان نشانگرهای میلوییدی و منوییدی در هم‌کشتی سلول‌های مایلومایی و سلول‌های بنیادی خون‌ساز مشاهده شد. علاوه بر این؛ به دنبال هم‌کشتی سلول‌های مایلومایی و سلول‌های منوبلاستی شاهد، سلول‌های شبه استئوکلاستی TRAP مثبت نیز یافت شد.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که حضور سلول‌های مایلومایی در مغز استخوان احتمالاً در تمایز HSCها به رده منوسیتی (استئوکلاستی) نقش دارد.

کلیدواژگان: کنام، مالتیپل مایلوما، سلول بنیادی خون‌ساز، تمایز استئوکلاست

۱- مقدمه

بیماری مالتیپل مایلوما (Multiple Myeloma) یک ناهنجاری پلاسماسل است که تقریباً ۱۰ درصد سرطان‌های خونی را شامل می‌شود [۱]. سن متوسط بیماران در هنگام تشخیص ۶۸ سال بود و در حدود ۹۹ درصد آن‌ها سن بالای ۴۰ سال داشتند [۲]. در این بیماران جابه‌جایی‌هایی در زنجیره سنگین ایمونوگلوبین و ناهنجاریهای کروموزومی مشاهده می‌شود [۳، ٤]. علایم و عارضه‌های این بیماری عبارتند از درد استخوان و ضایعات لیتیک استخوانی (۸۰ درصد)، عفونت مکرر، هایپرپروتنمیا (Hyperproteinemia)، آمیلوییدوز (Amiloidosis)، آنمی (Anemia)، افزایش سطح کلسیم یونیزه (هایپرکلسمی: Hypercalcemia)، کاهش آلکالن فسفاتاز (Alkalin Phosphatase) و استئوکلسین (Osteocalcin) [۳، ۵، ٦]. از بین

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦
Email: abroun@modares.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-06]

موارد اشاره شده، ضایعات استخوانی ایجاد شده مهم‌ترین عارضه این بیماری است [۷]. هرچند عمل ترمیم و تحلیل استخوانی به‌طور طبیعی به‌ترتیب توسط استئوبلاست‌ها (Osteoblasts) و استئوکلاست‌ها (Osteoclasts) صورت می‌پذیرد [۸]. از آن‌جایی که محیط مغز استخوان مملو از سلول‌های بنیادی و غیربنیادی با منشأ و عملکردهای متفاوت است [۹]، سلول‌های مغز استخوان هرکدام به روشی (با ترشح فاکتورها، سیتوکین‌های (Cytokines) مختلف یا بر هم‌کنش سلول- سلول) در این عارضه دخیل است [٦، ۹-۱۳]؛ اما به دلیل این‌که به‌طور فیزیولوژیک عمل تحلیل استخوانی منسوب به استئوکلاست است [٦] بیشترین مطالعات روی مسیرهای فعال‌سازی و فاکتورهای محتمل در فعال شدن آن‌ها یا متمایز شدن متمرکز شده است [٦، ۱۰، ١٤-۱۷]. استئوکلاست از سلول‌های بنیادی خون‌ساز تحت تأثیر فاکتورهای متعدد، ابتدا وارد رده میلوییدی (Myeloid Lineage) شده و سپس به رده منوییدی (Monoid Lineage) تبدیل می‌شود و در نهایت استئوکلاست می‌شود [۸، ۱۸]. اغلب مطالعاتی که بر تمایز استئوکلاست‌ها انجام شده، بر تسریع و افزایش پیش‌سازهای استئوکلاستی به استئوکلاست صورت گرفته است [۵، ۱۵، ۱۹]. به دلیل افزایش پلاسماسل‌های مایلومایی (Myeloma Plasma Cells) در مغز استخوان و تماس نزدیک آن‌ها با سلول‌های مغز استخوان به‌خصوص سلول‌های بنیادی موجود و پیشتازهای سلولی و به‌ویژه بر هم‌کنش بین سلولی و تأثیرات صورت گرفته، محققان در بررسی حاضر احتمال اثر تمایزی سلول‌های مایلومایی را بر هدفمند کردن تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز را به استئوکلاست ارزیابی نمودند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سلول‌ها

۲-۱-۱- سلول‌های رده مایلوما

در این تحقیق از دو رده سلولی مایلومایی U266 (NCBI Code: C151) و RPMI8866 (NCBI Code: C210) تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران و یک رده منوییدی به‌نام U937 استفاده شد. به دنبال انجام فلوسایتومتری (Flow Cytometry) برای تأیید نشانگرهای (Markers) مایلومایی رده‌های سلولی خریداری شده، مشخص شد که تنها رده U266 نشانگرهای مایلومایی را بیان می‌کند و سلول‌های رده RPMI8866 پلاسمابلاست (Plasmablast) هستند، با این وجود در این مطالعه از این سلول غیرمایلومایی به‌عنوان کنترل منفی در هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی خون‌ساز استفاده شد. سلول‌ها در محیط RPMI-1640 (شرکت Sigma) حاوی FBS (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد غیرفعال شده در دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد، ۲ میلی‌مولار ال- گلوتامین (L-glutamine) و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (Streptomycin) و پنی‌سلین (Penicillin) در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد CO_2 در پلیت‌های ٢٤ خانه‌ای کشت داده شد. به دنبال این کشت‌ها زمان دو برابر شدن سلول‌ها تعیین شد و منحنی‌های رشد هرکدام از رده‌های سلولی در محیط RPMI-1460 حاوی میزان FBS (Sigma) ۱۰ درصد، ۲ درصد و فاقد سرم ارزیابی شد تا شرایط بهینه کشت با حداقل میزان FBS برای جلوگیری از تداخل فاکتورهای ناشناخته موجود در FBS به‌دست آید.

۲-۲- جداسازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز CD_{34}^+

منبع مورد استفاده در تهیه سلول‌های بنیادی خون‌ساز، خون بند ناف بود که فرآیند تهیه و استفاده از این منبع سلولی در شورای اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس مطرح و تصویب شد.

جداسازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز CD_{34}^+ خون بند ناف به‌وسیله از ستون MACS و با استفاده از آنتی‌بادی CD_{133} (شرکت Miltenyi Biotec) صورت پذیرفت. سلول‌های تهیه شده برای تعیین میزان بیان نشانگر CD_{34} در محیط کشت Stemline (Sigma) در پلیت ٦ خانه‌ای حاوی فاکتورهای SCF (Stem Cell Factors) (Invitrogen) و

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-06]

ترمبوپوئیتین (Thrombopoietin: TPO) (Invitrogen) و فاقد FBS به‌مدت یک هفته کشت داده شدند. در نهایت سلول‌ها با شمارش اولیه و به نسبت‌های مختلف در محیط کشت استفاده شدند.

۲-۳- رنگ‌آمیزی تارتارات (Tartarat Resistance Acid Phosphates: TRAP)

TRAP رنگ‌آمیزی اختصاصی استئوکلاست بوده و سلول‌های مورد مطالعه از نظر تارتارات مقاوم به اسید فسفاتاز بررسی شدند.

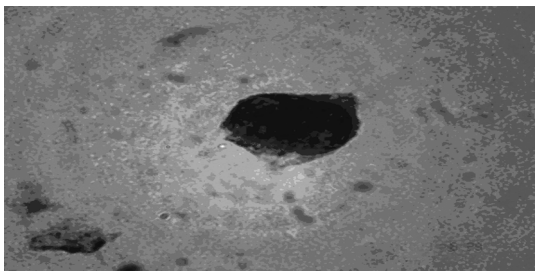
۲-٤- ارزیابی نشانگرها سطح سلول

برای بررسی نشانگرهای سطح سلول، ابتدا سلول‌ها با آنتی‌بادی اختصاصی 130-050-801 MACS Microbead- 133/1 و CD_{34}-FITC (Dako F7081)، CD_{14}-FITC (Dako F0844)، CD_{33}-FITC (Dako F0832) و CD_{64}-FITC (Dako) براساس دستورالعمل کارخانه سازنده آنتی‌بادی رنگ‌آمیزی و با دستگاه فلوسایتومتری BD FACS Calibure (BD Biosciences, San Jose, CA. USA) واقع در مرکز تحقیقات رویان ارزیابی شد.

۳- نتایج

۳-۱- هم‌کشتی سلول‌های U266 و U937

هدف از انجام این دو رده سلولی ارزیابی اثر سلول‌های مایلومایی (U266) بر تمایز سلول‌های رده منوبلاستی (U937) بود. سلول‌های رده منوبلاستی با تأثیر فاکتورهایی (مثلاً ویتامین D) به سمت منوسیت (ماکروفاژ) تمایز می‌دهند. محققان حاضر این فرضیه را دنبال کردند که حضور سلول‌های مایلومایی در مجاورت پیش‌سازهای منوییدی در مغز استخوان، سرعت تمایز آن‌ها و تبدیل شدن به منوسیت و در نهایت استئوکلاست‌های تحلیل کننده مغز استخوان را افزایش می‌دهند. غلظت‌های متفاوتی از سلول‌های مورد نظر در هم‌کشتی استفاده شد. به دلیل این‌که اثر تمایزی روی سلول‌های منوبلاستی مورد نظر بود، تعداد سلول‌های U937 ثابت در نظر گرفته شد (۲۰۰۰۰ عدد) و سلول‌های مایلومایی به نسبت یک برابر، پنج برابر و ده برابر در هم‌کشتی استفاده شدند. محیط مورد استفاده در این هم‌کشتی RPMI-1640 با FBS ۱۰ درصد بود. در ابتدا با رنگ‌آمیزی رایت گیمسا (Wright Giemsa) سلول‌های رده منوبلاستی رنگ‌آمیزی شد تا در صورت تغییر ریخت‌شناختی (Morphologic) بتوان با نمونه اولیه مقایسه نمود (شکل ۱). زمان هم‌کشتی، ١٤ روز انتخاب شد و در نهایت از سلول‌ها گسترشی تهیه و با رنگ‌آمیزی TRAP (رنگ‌آمیزی اختصاصی استئوکلاست) سلول‌های به‌دست آمده از نظر تارتارات مقاوم به اسید فسفاتاز ارزیابی شد (شکل ۲). یک نمونه از سلول‌ها نیز برای ارزیابی فلوسایتومتریک از نظر نشانگرهای CD_{14} و CD_{64} تهیه شد.

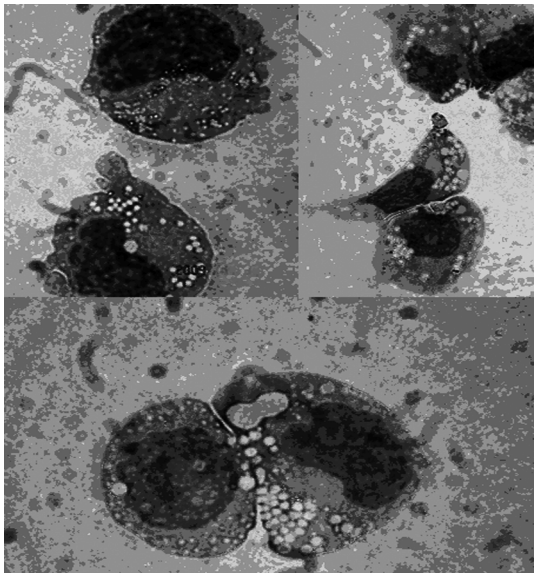


شکل ۱ یک سلول رده منوبلاستی U937؛ رنگ‌آمیزی رایت گیمسا (بزرگنمایی: × ۱۰۰)

به دنبال هم‌کشتی دو رده سلولی، ماکروفاژهایی با واکوئل‌های مشخص در گسترش‌های تهیه شده و برخی ماکروفاژها در حال فاگوسیتوز نیز مشاهده شد (شکل ۲). اما با رنگ‌آمیزی TRAP می‌بایست چند نقطه قرمز رنگ مشاهده می‌شد تا بتوان گفت که این سلول‌ها استئوکلاست هستند. مرحله بعد ارزیابی فلوسایتومتریک این سلول‌ها از نظر نشانگرهای منوییدی بود. نشانگرهای مورد نظر در بررسی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-06]

حاضر CD_{14} و CD_{64} بود که در روز ١٤ ارزیابی شد. سلول‌های مورد نظر از هردو نشانگر منفی گزارش شد.



شکل ۲ رنگ‌آمیزی TRAP سلول‌های حاصل از هم‌کشتی U266 و U937؛ وجود واکوئول‌های متعدد در سیتوپلاسم سلول‌ها و نقاط قرمز که نتیجه مثبت بودن رنگ آمیزی TRAP در آن‌ها است. (بزرگنمایی: × ۱۰۰)

۳-۲- هم‌کشتی سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های مایلومایی

برای هم‌کشتی دو رده سلولی متفاوت تهیه یک محیط کشت مناسب برای هر دو رده سلولی مشکل است. همان‌طور که مطرح شد محیط مناسب برای سلول‌های مایلومایی، RPMI-1640 است؛ اما سلول‌های بنیادی خون‌ساز را در محیط Stemline کشت می‌دهند. چون هدف بررسی حاضر تمایز سلول‌های خون بند ناف به ماکروفاژ (استئوکلاست) بود و این سلول‌ها، سلول‌هایی چسبنده هستند، گزینه دیگری مطرح شد و آن محیط کشت DMEM بود. محققان حاضر برای کسب محیط مناسب برای هر دو رده سلولی یک محیط انتخابی ساختند. این محیط حاوی ۳۰ درصد RPMI-1640 و ۷۰ درصد DMEM بود. در این قسمت نیز نسبت‌های مختلفی از هر دو سلول با هم کشت داده شد: تعداد سلول HSC (Hematopoietic Stem Cell) ۱۰۰۰۰ سلول بود و هم‌کشتی با سلول‌های U266 و RPMI8866 (به‌عنوان کنترل) به‌ترتیب به نسبت یک به ٤ و ۸ بود. به فاصله هر دو روز محیط رویی پلیت‌ها با محیط تازه تعویض شد. ارزیابی بعد از ١٦ روز به‌وسیله رنگ‌آمیزی رایت (Wright Giemsa) و رایت گیمسا انجام گرفت. سلول‌های حاصل از هم‌کشتی HSC و U266 به‌صورت زیر بود: توجه کنید که سلول‌هایی واکوئول‌دار در تصویر مشاهده می‌شوند، همانند آن‌چه در هم‌کشتی سلول‌های U266 و رده U937 منوبلاستی مشاهده شد (شکل۳). سلول‌های حاصل از هم‌کشتی سلول‌های RPMI8866 و سلول‌های بنیادی خون‌ساز، سلول‌هایی بدون واکوئول و با اندومیتوز (Endomitosis) فراوان بودند (شکل ٤).

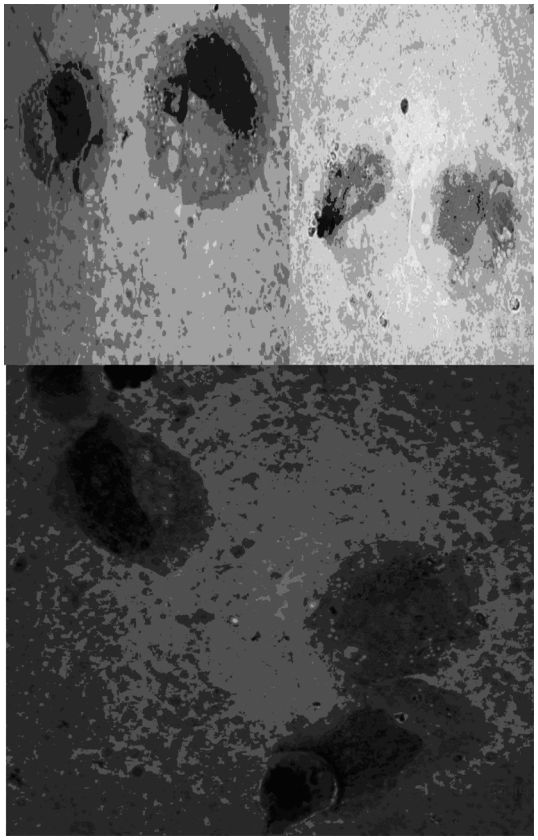
به دنبال مشاهده واکوئول‌های سیتوپلاسمی در سلول‌های حاصل از هم‌کشتی سلول‌های U266+HSC و در مقابل تنها مشاهده سلول‌های با اندومیتوز فراوان در سلول‌های حاصل از هم‌کشتی HSC+RPMI8866، در مرحله بعد سلول‌های حاصل از هم‌کشتی با فلوسایتومتری ارزیابی شد. البته باید گفت که تفاوت تعداد سلول‌ها در هم‌کشتی تغییر خاصی در نتیجه حاصل نداشت.

۳-۳- ارزیابی فلوسایتومتریک سلول‌های موجود در هم‌کشتی

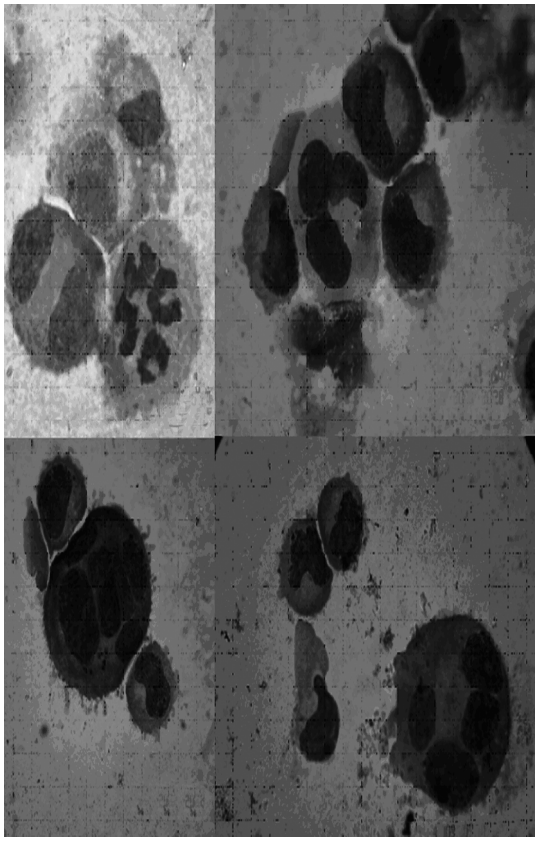
به دلیل این‌که محیط تهیه شده در بررسی حاضر محیطی دست‌ساز و از ترکیب دو محیط متفاوت تشکیل شده بود، برای ارزیابی دقیق‌تر رده‌های سلولی حاصل، هم‌کشتی رده سلولی U266 با سلول‌های بنیادی خون‌ساز در محیط Stemline فاقد فاکتور، با غلظت FBS ۱۰ درصد انجام شد. درصد بیان نشانگرهای مورد نظر (CD_{14} و CD_{64}) به‌وسیله فلوسایتومتری طی یک ماه از اولین روز هم‌کشتی و هر ۳ روز یک‌بار انجام شد. البته طی این ارزیابی از نشانگرهای CD_{33} و CD_{45} نیز

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-06]

استفاده شد. فرضیه اول محققان حاضر تمایز هدفمند سلول‌های HSC به سمت استئوکلاست بود و تبدیل شدن سلول‌های بنیادی CD_{34}^{+} به استئوکلاست نیازمند این بود که HSCها ابتدا وارد رده میلوییدی و سپس منوییدی شوند. به همین دلیل نشانگرهای هر دو رده ارزیابی شد. اولین ارزیابی سلول‌های حاصل از هم‌کشتی، ۳ روز بعد از آغاز هم‌کشتی انجام گرفت. هدف ارزیابی میزان بیان نشانگرهای مورد نظر در ابتدای کار بود. درصد سلول‌های CD_{14} مثبت در نوبت اول ۱/۳۱ (Rn2) بود. در ارزیابی فلوسایتومتریک درصد سلول‌ها از نظر شاخص CD_{64} (RN2)، ۳/۴۳ درصد بود. ارزیابی از نظر نشانگر CD_{33} سلول‌های بررسی حاضر در نوبت اول معادل ۰/۵۷ درصد بود (نشان داده نشده). به‌مدت یک ماه سلول‌های حاصل از هم‌کشتی ارزیابی شد. در آخرین فلوسایتومتری سلول‌های مورد نظر (یک ماه بعد)، نشانگرهای بیان شده به این صورت بود؛ بیان نشانگرهای CD_{14} و CD_{45} در شکل ۵ قابل مشاهده است (شکل ۵). در این ارزیابی، بیان CD_{14} به میزان ۱۰/۲٤ درصد (RN2) و CD_{45} به میزان ۱٤/٤٤ درصد (RN1) تعیین شد. ارزیابی نشانگر CD_{64} نیز صورت گرفت (شکل ٦) که این شاخص به میزان ۹/٥٤ درصد (RN2) تعیین شد. بیان CD_{33} نیز به میزان ۱٤/۹۱ درصد تعیین شد (شکل ۷).

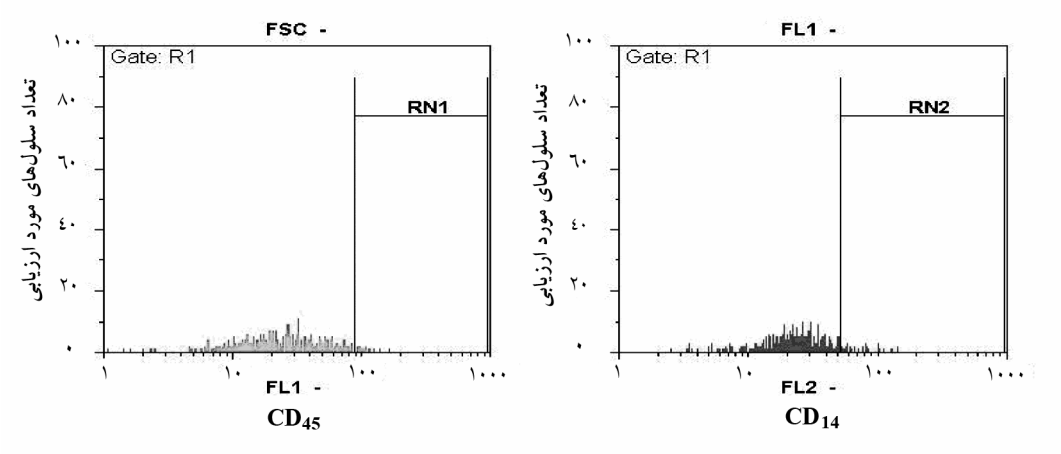


شکل ۳ سلول‌های حاصل از هم‌کشتی رده مایلومایی U266 و سلول‌های بنیادی خون‌ساز؛ فاگوسیتوز نیز در سلول‌ها مشاهده می‌شود. (بزرگنمایی: ×۱۰۰)

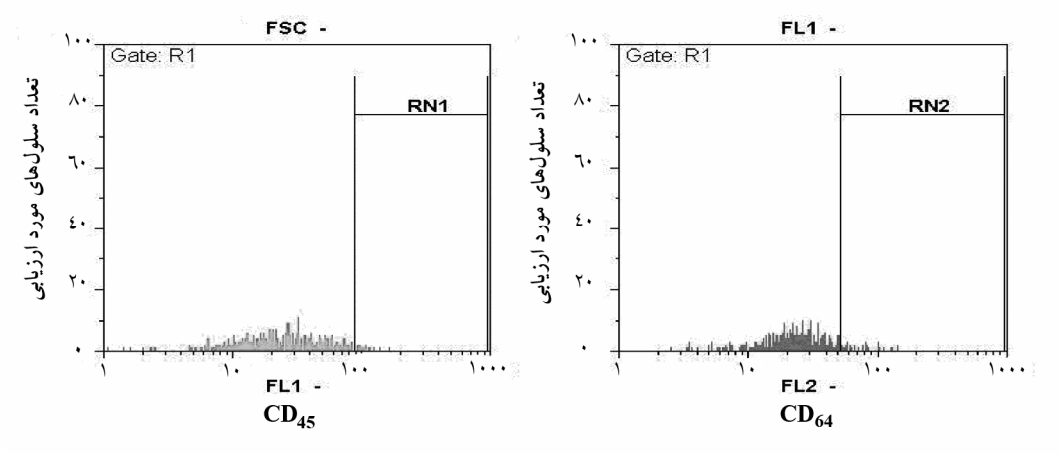


شکل ٤ سلول‌های حاصل از هم‌کشتی سلول‌های RPMI8866 و سلول‌های بنیادی خون‌ساز و عدم حضور واکوئول‌های سیتوپلاسمی در سلول‌ها (بزرگنمایی: ×۱۰۰)

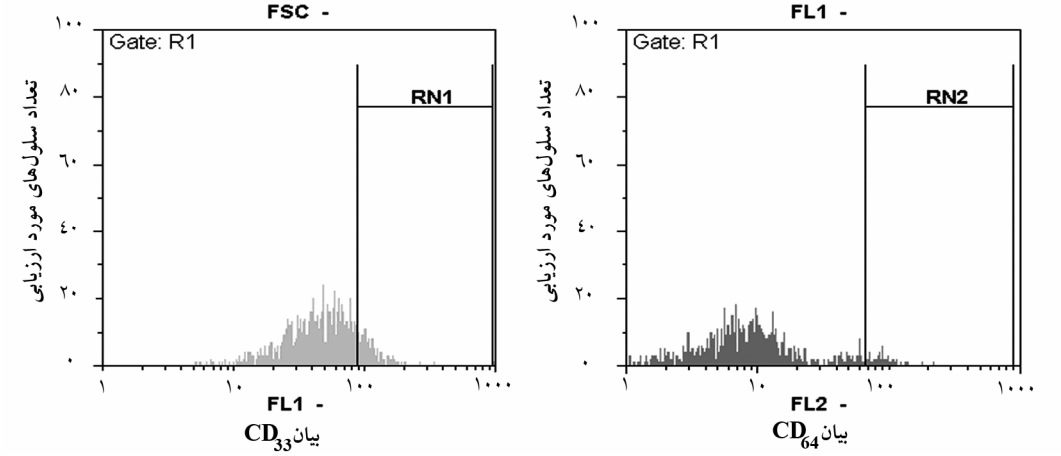
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-06]



شکل ۵ ارزیابی سلول‌های حاصل از هم‌کشتی U266 و HSC از نظر نشانگرهای CD_{14} (RN2) و CD_{45} (RN1)



شکل ٦ ارزیابی سلول‌های حاصل از هم‌کشتی U266 و HSC از نظر نشانگر اختصاصی منوسیتی CD_{64} (RN2) و CD_{45} (RN1)



شکل ۷ ارزیابی نشانگر CD_{33} (RN1)، CD_{64} (RN2)؛ سلول‌های حاصل از هم‌کشتی سلول‌های U266 و HSC

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-06]

٤- بحث

با توجه به این‌که استئوکلاست از سلول‌های رده منوییدی بوده و این رده از سلول‌های بنیادی خون‌ساز منشأ می‌گیرند، این سؤال مطرح می‌شود که آیا برهم‌کنش‌های مستقیم سلول-سلول میان پلاسماسل‌های مایلومایی و سلول‌های بنیادی خون‌ساز موجود در مغز استخوان در سرنوشت و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز به رده منوییدی (مثلاً استئوکلاست) نقش دارد؟

احتمالاً به دلیل سکنی گزیدن پلاسماسل‌های ناهنجار در مغز استخوان و مجاورت نزدیک آن‌ها با سلول‌های خون‌ساز، ترشح فاکتورها و همچنین برهم‌کنش‌های سلولی میان این دو منجر به سوق سلول‌های خون‌ساز به متمایز شدن به رده‌های ماکروفاژی (استئوکلاست) می‌شود و این دلیل افزایش سلول‌های استئوکلاست در مغز استخوان این بیماران و ناهنجاری‌های حاصل (از قبیل تخریب پیشرفته استخوانی) است. در صورت اثبات این فرضیه می‌توان این عوامل را در درمان بیماران مورد توجه قرار داد تا از افزایش استئوکلاست‌ها در مغز استخوان ممانعت شود.

از آن‌جا که تحلیل استخوان به‌طور فیزیولوژیک عمل اصلی استئوکلاست‌ها است و استئوکلاست‌ها سلول‌هایی چند هسته‌ای با نیمه‌عمری کوتاه هستند [۱۱]؛ با وجود جمعیت کم این سلول‌ها در مغز استخوان، حتی در صورت تسریع تمایز به استئوکلاست‌ها از پیش‌سازهای استئوکلاستی، در بیماران مالتیپل مایلومایی احتمال چنین تخریب فزاینده و وسیع استخوان که طی چندین سال (٤٠ سال) ساخته و متراکم شده است، بعید به‌نظر می‌رسید و می‌بایست جمعیت ماکروفاژی (استئوکلاستی) از طرف یک جمعیت سلول بنیادی به‌طور مداوم بازسازی شود. محققان حاضر با مطالعه ساختار نیچ (Nich Structure) مغز استخوان احتمال می‌دهند که حضور و تجمع سلول‌های مایلومایی در مغز استخوان و ترشح فاکتورهای التهابی متعدد، منجر به القای برخی مسیرهای تمایزی در سلول‌های بنیادی خون‌ساز شود و عملاً نه تنها به دلیل سرعت تمایز از پیش‌سازهای استئوکلاستی بلکه از مرحله بسیار ابتدایی‌تری شاهد تمایز هدفمند سلول‌های بنیادی خون‌ساز مغز استخوان به این رده سلولی خواهیم بود.

در بررسی حاضر ابتدا اثر تمایزی سلول‌های مایلومایی U266 روی تمایز سلول U937 که منوبلاست است، به‌عنوان یک پیش‌ساز استئوکلاست ارزیابی شد. بعد از ١٦ روز سلول‌هایی واکوئل‌دار (شبه ماکروفاژ) که احتمالاً TRAP مثبت اما CD_{14} و CD_{64} منفی بودند، مشاهده شدند. در این جا دو سؤال مطرح می‌شود آیا سلول‌های مایلومایی اثری در تسریع تمایز پیش‌سازهای استئوکلاستی دارند؟ یا این‌که اصلاً سلول‌های استئوکلاست خود از پیش‌سازهای مجزا حاصل می‌شوند؟

در هم‌کشتی سلول مایلومایی U266 و HSCها، و هم‌کشتی سلول‌های RPMI8866 به‌عنوان لنفوبلاستویید (Lymphoblastoid) و HSCها، سلول‌های واکوئل‌دار فقط در سلول‌های حاصل از هم‌کشتی سلول مایلومایی و HSC مشاهده شد و در هم‌کشتی حاصل از HSCها و RPMI8866 سلول‌هایی چند هسته‌ای مشاهده شد که نسبت دادن آن‌ها به سلول‌های HSC بعید به‌نظر می‌رسید و می‌بایست این سلول‌ها اشکال حاصل از ادغام (Fuse) یا تقسیم هسته سلولی بدون تقسیم سیتوپلاسم (اندومیتوز) سلول‌های لنفوبلاست باشند. علاوه بر این سلول‌های چند هسته‌ای در سلول‌های هم‌کشتی U266 و HSCها مشاهده شدند.

در بررسی نشانگرهای بیان شده روی سلول‌های بنیادی خون‌ساز حاصل از بند ناف در هم‌کشتی با U266، بیان ۳ نشانگر از رده‌های میلوییدی و منوییدی (CD_{14}، CD_{64}، CD_{33}) ارزیابی شد، چرا که در صورتی که سلول‌ها به سمت منوییدی تمایز یابند، لازمه آن‌ها عبور از مرحله میلوییدی است. در اولین ارزیابی فلوسایتومتریک که ۳ روز بعد از هم‌کشتی صورت پذیرفت، بیان CD_{33} ۰/۵۷ درصد، CD_{14} ۱/۳۱ درصد و CD_{64} ۳/٤۳ درصد تعیین شد. اما به دنبال یک ماه هم‌کشتی بروز نشانگرها به این صورت تغییر کرد؛

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-06]

۱۴/۹۱ درصد =CD_{33}، ۱۰/۲۴ درصد =CD_{14} و ۹/۵۴ درصد =CD_{64}. همان‌طور که ملاحظه می‌شود بیان CD_{33} به‌طور مشخص افزایش یافته است، اما دو نشانگر دیگر نیز افزایش نشان می‌دهند. این افزایش ۱۰ درصدی نشانگرهای منوییدی طی یک ماه قابل توجه است، چرا که بیماری مالتیپل مایلوما یک بیماری مزمن است و این افزایش طی یک ماه، تأمل برانگیز است. البته می‌بایست زمان هم‌کشتی این سلول‌ها افزایش یابد و از رده‌های سلولی خالص‌تری استفاده شود. حتی باید فعالیت سلول‌های شبه ماکروفاژی را نیز از نظر تحلیل استخوان ارزیابی نمود تا بتوان دقیقاً به این القای تمایز توسط سلول‌های میلومایی به سلول‌های بنیادی خون‌ساز استناد کرد. البته در بررسی حاضر به‌عنوان نمونه کنترل منفی سلول‌های بنیادی خون‌ساز با سلول‌های غیرمایلومایی RPMI8866 نیز کشت داده شد، اما اثر تمایزی مشاهده نشد. علاوه بر این؛ برای اطمینان از روند تمایز می‌بایست هر دو روز سلول‌های موجود در هم‌کشتی از نظر بیان نشانگرهای اختصاصی رده منوییدی و استئوکلاستی ارزیابی شوند که در این تحقیق به دلیل نبود امکانات تهیه آنتی‌بادی و فلوسایتومتری به‌طور محدودتری ارزیابی انجام شد. توصیه می‌شود که هنگام جداسازی سلول‌های بنیادی خون بند ناف از آنتی‌بادی CD_{34} استفاده شود (در این مطالعه از آنتی‌بادی CD_{133} استفاده شده بود) و سپس سلول‌های حاصل با استفاده از آنتی‌بادی CD_{34} از نظر خلوص ارزیابی شوند. در این مطالعه مشاهده شد که رشد سلول‌های مایلومایی در محیط انتخابی (RPMI1640 ۳۰ درصد و DMEM ۷۰ درصد) بیشتر و سریع‌تر از محیط صرفاً RPMI1640 است. احتمالاً این سرعت رشد می‌تواند در ارتباط با عناصر اضافی موجود در محیط کشت DMEM مانند کلسیم و آهن باشد. بنابراین به‌نظر می‌آید که مطالعات آینده بر محوریت اثر کلسیم و آهن بر رشد سلول‌های مایلومایی به شناخت بیشتر مکانیسم رشد سلول‌های مایلومایی کمک نماید.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی بوده و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. نویسندگان از سرکار خانم دکتر نیکوگفتار (سازمان انتقال خون) و جناب آقای احسان جان‌زمین (مؤسسه رویان) که همکاری صمیمانه‌ای در آنالیز فلوسایتومتری مبذول داشته‌اند قدردانی می‌نمایند.

٦- منابع

[1] Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. Blood 2008; 111(6): 2962-72.

[2] Cook R. Introduction: multiple myeloma. J Manag Care Pharm 2008; 14(7 Suppl): 4-6.

[3] Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. N Engl J Med 2004; 351(18):1860-73.

[4] Bommert K, Bargou RC, Stühmer T. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. Eur J Cancer 2006; 42(11): 1574-80.

[5] Terpos E, Dimopoulos MA. Myeloma bone disease: pathophysiology and management. Ann Oncol 2005; 16(8): 1223-31.

[6] Silvestris F, Ciavarella S, De Matteo M, Tucci M, Dammacco F. Bone-resorbing cells in multiple myeloma: osteoclasts, myeloma cell polykaryons, or both? Oncologist 2009; 14(3): 264-75.

[7] Dib IE, Gressier M, Salle V, Mentaverri R, Brazier M, Kamel S. Multiple myeloma cells directly stimulate bone resorption in vitro by down-regulating mature osteoclast apoptosis. Leuk Res 2008; 32(8): 1279-87.

[8] Basak GW, Srivastava AS, Malhotra R, Carrier

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-06]

E. Multiple myeloma bone marrow niche. Curr Pharm Biotechnol 2009; 10(3): 345-6.

[9] Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. J Clin Invest 2006; 116(5): 1195-201.

[10] Edwards CM, Zhuang J, Mundy GR. The pathogenesis of the bone disease of multiple myeloma. Bone 2008; 42(6): 1007-13.

[11] Corre J, Mahtouk K, Attal M, Gadelorge M, Huynh A, Fleury-Cappellesso S, Danho C, Laharrague P, Klein B, Rème T, Bourin P. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. Leukemia 2007; 21(5): 1079-88.

[12] Sezer O. Myeloma bone disease: recent advances in biology, diagnosis, and treatment. Oncologist 2009; 14(3): 276-83.

[13] Jakob C, Sterz J, Zavrski I, Heider U, Kleeberg L, Fleissner C, Kaiser M, Sezer O. Angiogenesis in multiple myeloma. Eur J Cancer 2006; 42(11): 1581-90.

[14] Stark Z, Savarirayan R. Osteopetrosis. Orphanet J Rare Dis. 2009; 4: 5.

[15] Aggarwal R, Ghobrial IM, Roodman GD. Chemokines in multiple myeloma. Exp Hematol 2006; 34(10): 1289-95.

[16] Oyajobi BO. Multiple myeloma/hypercalcemia. Arthritis Res Ther 2007; 9 (Suppl 1): S4.

[17] Qiang YW, Shaughnessy JD Jr, Yaccoby S. Wnt3a signaling within bone inhibits multiple myeloma bone disease and tumor growth. Blood 2008; 112(2): 374-82.

[18] Martin TJ. Paracrine regulation of osteoclast formation and activity: milestones in discovery. J Musculoskelet Neuronal Interact 2004; 4(3): 243-53.

[19] Soysa NS, Alles N. NF-kappaB functions in osteoclasts. Biochem Biophys Res Commun 2009; 378(1): 1-5.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-06]