ORIGINAL ARTICLE

Comparative Evaluation of Hydatid Cyst Fluid and Fetal Bovine Serum (FBS) in Culture Medium of Rat Fibroblast Cells

Mahdi Fakhar[1],
Mansoureh Mirzaei[2],
Alireza Rafiei[3],
Saber Armat[4],
Milad Mojtahedian[4]

[1] Department of Parasitology and Mycology, Molecular and Cellular Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Department of Pathology, Booali Hospital, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Department of Immunology and Bacteriology, Molecular and Cellular Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received July 3, 2011 ; Accepted September 17, 2011)

Abstract

Background and purpose: The most common serum used in culture media is fetal bovine serum (FBS). Given that FBS is costly, this study aimed at evaluating the hydatid cyst fluid (HCF) as a substitute for FBS in culture medium of fibroblast cells isolated from rat.

Materials and methods: In this experimental study, skin dermal area from inguinal and abdomen of rat were used for fibroblast preparation. Fibroblasts cells were isolated using trypsin enzyme and then were cultured in RPMI medium (including 20% FBS). After sufficient cell growth, they were isolated and cultured in 24-well microtiter plate in three successive concentrations as follows: pure RPMI and RPMI medium supplemented with 10% and 20% FBS as control groups, and RPMI medium supplemented with 10% and 20% HCF. Then survival rate and proliferation level were checked in three successive days using invert microscope (morphology evaluation) and trypan blue 0.4% as vital dye (quantitative evaluation), respectively.

Results: Proliferation and growth of fibroblast cells in RPMI medium supplemented with 10% and 20% FBS concentrations were normal during the three days with 95% survival rate. In contrast, fibroblast cells in RPMI medium supplemented with 10% and 20% HCF concentrations were converted from normal to spherical form over the three days and 80 % of them were alive.

Conclusion: The results indicated that we can apply HCF as an alternative for FBS up to 72h in RPMI medium. It can also be used as transport or short maintenance media for fibroblast cells.

Key words: Fibroblast cells, RPMI medium, hydatid cyst fluid (HCF), fetal bovine serum (FBS), rat

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(86): 213-221 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم شماره ۸۶ بهمن سال ۱۳۹۰ (۲۲۱-۲۱۳)

ارزیابی مقایسه‌ای مایع کیست هیداتیک با سرم جنین گاو در محیط کشت سلول فیبروبلاست موش صحرایی

مهدی فخار[۱]
منصوره میرزایی[۲]
علیرضا رفیعی[۳]
صابر آرمات[۴]
میلاد مجتهدیان[۴]

چکیده

سابقه و هدف : متداولترین سرم مصرفی برای رشد بهتر سلول‌ها در محیط کشت، سرم جنین گاو می‌باشد. با توجه به قیمت گران این سرم، این مطالعه با هدف ارزیابی مایع کیست هیداتیک به عنوان جایگزین سرم جنین گاو در محیط‌های کشت سلول فیبروبلاست جدا شده از موش صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی از سلول‌های فیبروبلاست، ناحیه درم پوست ناحیه کشاله ران و شکم موش صحرایی استفاده شد. فیبروبلاست‌ها توسط آنزیم تریپسین ۰/۲۵ درصد از سایر سلول‌ها جدا شده و در محیط پایه RPMI حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) کشت داده شدند. پس از رشد و تکثیر کافی سلول‌ها، آن‌ها را جدا نموده و در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای به‌صورت سه رقت متوالی به‌ترتیب حاوی محیط کشت PRMI خالص و محیط کشت PRMI حاوی ۱۰ و ۲۰ درصد سرم جنین گاو به‌عنوان شاهد و محیط کشت PRMI حاوی ۱۰ و ۲۰ درصد مایع کیست هیداتیک گوسفندی کشت داده شدند. سپس میزان تکثیر و بقاء سلول‌های فیبروبلاست تا سه روز متوالی به ترتیب با استفاده از میکروسکوپ معکوس(بررسی مورفولوژی) و رنگ حیاتی تریپان بلو ۰/۴ درصد (ارزیابی کمی) مورد بررسی قرارگرفت.

یافته‌ها: سلول‌های فیبروبلاست در محیط‌های کشت RPMI با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد سرم جنین گاو طی سه روز رشد و تکثیر طبیعی داشتند و میزان بقاء ۹۵درصد بود. در مقابل، سلول‌های فیبروبلاست در محیط‌های کشت حاوی مایع کیست هیداتیک با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد، از حالت دوکی به شکل گرد تبدیل شدند و ۸۰ درصد آن‌ها طی سه روز متوالی زنده بودند.

استنتاج: نتایج نشان داد که می‌توان تا ۷۲ساعت از مایع کیست هیداتیک به عنوان جایگزین برای سرم جنین گاو در محیط کشت RPMI و یا به عنوان محیط ترانسپورت (انتقال) برای نگهداری کوتاه مدت سلول‌های فیبروبلاست استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های فیبروبلاست، محیط کشت، مایع کیست هیداتیک، سرم جنین گاو، موش صحرایی

مقدمه

در حال حاضر یکی از محیط‌های کشت سلول متداول، محیط مایع RPMI 1640 می‌باشد که به عنوان محیط پایه در زمینه کشت سلولی مطرح است. معمولاً برای رشد بهتر سلول‌ها و غنی‌تر نمودن این محیط،

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۳۷- ۸۸ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: علیرضا رفیعی- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص)، دانشکده پزشکی E-mail: rafiei1710@gmail.com

۱. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲. بخش پاتولوژی، بیمارستان بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳. گروه ایمونولوژی و باکتری شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۴. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت : ۹۰/۴/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۰/۵/۱۹ تاریخ تصویب : ۹۰/۶/۲۶

سرم‌های حیوانی با غلظت نهایی ۱۰ تا ۳۰ درصد استفاده می‌گردد. در این میان، متداول‌ترین سرم مصرفی، سرم جنین گاو(FBS: Fetal Bovine Serum) می‌باشد(۲،۱) که استفاده از این سرم مشکلاتی به همراه خواهد داشت. از جمله این مشکلات می‌توان به فراهم آوردن امکانات و تجهیزات وسیع جهت تهیه سرم و هزینه بر بودن آن، تغییر محتوی سرم در اثر تغییرات ژنتیکی گاوهای مورد استفاده اشاره نمود. از سوی دیگر استفاده از غلظت‌های بالای این سرم در محیط کشت برای سلول‌ها اثرات توکسیک دارد(۴-۱). همچنین هزینه بسیار بالای FBS یکی دیگر از عوامل تاثیرگذار جهت یافتن جایگزین مناسب برای آن می‌باشد.

علاوه بر سرم جنین گاو، زرده تخم مرغ، عصاره پلاکتی انسان، سرم انسان، پلاسمای انسان، مایع داخل چشم گاو، سرم مرغ، سرم موش صحرایی و سرم اسب از جمله افزودنی‌های محیط کشت هستند که در مطالعات مختلف با سرم جنین گاو مقایسه شده‌اند(۱۳-۵).

از ادرار پستانداران (انسان و حیواناتی از قبیل گاو و گوسفند) در محیط‌های مختلف کشت مایع به منظور غنی‌سازی آن‌ها استفاده شده است که البته کاربرد ادرار دارای محدودیت بوده و تاثیر کمی در رشد سلول‌ها به همراه داشته است(۱۴). ضمناً شیر گاو، گوسفند و بز نیز به عنوان محرک رشد در محیط‌های کشت مایع و سلول‌های حیوانی از جمله جهت کشت انگل‌های لیشمانیا استفاده شده است که نتایج نسبتاً مطلوبی به همراه داشته است(۱۵). به طور کلی اغلب مطالعات محققین در خصوص جایگزینی سرم جنین گاو در محیط‌های کشت انگل‌های لیشمانیا و تریپانوزوم انجام گرفته است(۱۶) و با جستجو در منابع موجود و در دسترس، مطالعه‌ای در خصوص کاربرد مایع کیست هیداتیک به عنوان جایگزینی سرم جنین گاو در محیط‌های کشت سلول یافت نشد. تنها مطالعه موجود بررسی نویسندگان در بکارگیری مایع کیست هیداتیک گوسفندی به عنوان جایگزین سرم جنین گاو در کشت انگل‌های لیشمانیا می‌باشد(۱۷).

مایع کیست هیداتیک مایع زلالی با وزن مخصوص ۱۰۰۷ تا ۱۱۷۵، اسیدیته ۷/۲ تا ۷/۴ است. املاح موجود در این مایع شامل سدیم، کلر، منیزیم، کلسیم، فسفر و ... می‌باشد. پروتئین‌های اصلی آن را آلبومین و گلبولین تشکیل می‌دهند. در مطالعات مختلف بین ترکیبات مایع کیست هیداتیک و سرم تشابهات زیادی گزارش شده است(۲۰- ۱۸).

با در نظر گرفتن مباحث سلامتی و حقوق حیوانات که در تولید سرم جنین گاو (FBS) مطرح است ضرورت استفاده از یک ماده جایگزین یا کاهش دهنده مصرف FBS احساس می‌گردد. از آن‌جا که تا کنون تلاش‌های زیادی توسط محققین مختلف در زمینه حذف مواد حیوانی از محیط کشت سلولی انجام گرفته، نتیجه آن معرفی محیط‌های کاملاً شیمیایی بوده است. اما هر کدام از آن‌ها به دلایل مختلفی نافرجام مانده است. با توجه به مزایای مایع کیست هیداتیک و تجربه قبلی، بر آن شدیم کاربرد این مایع را در محیط کشت سلول‌های فیبروبلاست به‌عنوان یک مدل مناسب ارزیابی کنیم.

هدف مطالعه حاضر، استفاده از مایع کیست هیداتیک گوسفندی (که به فراوانی و به آسانی در کشور در دسترس است و هزینه چندانی نیز در بر نخواهد داشت) به عنوان یک نوآوری جدید در زمینه کشت سلول می‌باشد. در این راستا از سلول‌های فیبروبلاست به عنوان یک مدل استفاده شد تا جنبه‌های مختلف کاربرد آن مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش ها

این مطالعه به روش تجربی انجام گرفت. در این تحقیق پوست ناحیه درم شکم و کشاله ران موش صحرایی (رت) با وزن تقریبی ۱۲۰ گرم تحت شرایط کاملاً استریل برداشته شد و در محیط RPMI حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین، استرپتومایسین و فونژیزون به میزان ده برابر غلظت در مقایسه با محیط کشت سلول) قرار داده و سپس به اطاق کشت منتقل گردید. تمام

مراحل جداسازی بافت همبند از پوست مورد نظر زیر هود لامینار و با استفاده از مواد، معرف‌ها و وسایل استریل انجام گرفت.

برای جداسازی سلول‌های فیبروبلاست، نمونه تهیه شده از پوست موش، از محیط RPMI حاوی آنتی‌بیوتیک خارج و با محیط RPMI دیگری حاوی آنتی‌بیوتیک شستشو داده شد. با تریپسینه کردن توسط آنزیم‌تریپسین ۲۵ /۰ درصد، اپیدرم طی چند مرحله از درم جدا گردید و سپس درم به قطعات کوچکتر از ۱ میلی‌متر تقسیم و با روش کاشت (Explantaion)، در پلیت‌های کشت ۵۰ میلی‌لیتری کشت داده شد. آن‌گاه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵ درصد دی اکسیدکربن انکوبه شد. سپس محیط کشت کامل شامل: محیط کشت RPMI با ۲۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین به مقدار ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر، استرپتومایسین به مقدار ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر و فونژیزون به مقدار ۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه گردید. پس از آن سلول‌های کشت داده شده، سه روز یکبار تغذیه شدند، در زمانی که به هم پیوستگی کلنی‌ها صورت گرفت با تریپسینه کردن کوتاه مدت، فیبروبلاست‌ها از سایر سلول‌ها جدا شده و پس از تهیه سوسپانسیون و سانتریفوژ، فیبروبلاست‌ها جمع آوری و در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند.

ارزیابی کمی و کیفی کشت سلول‌های فیبروبلاست:

در این مطالعه هر غلظت به صورت سه تایی انجام شد و در مجموع از ۱۵ چاهک استفاده گردید، جهت گروه شاهد ۳ چاهک کشت حاوی محیط RPMI، خالص، ۳ چاهک حاوی RPMI به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ۳ چاهک حاوی RPMI به همراه ۲۰ درصد سرم جنین گاو و برای گروه مورد، ۳ چاهک حاوی RPMI به همراه ۱۰ درصد مایع کیست هیداتیک و ۳ چاهک حاوی RPMI به همراه ۲۰ درصد مایع کیست هیداتیک انتخاب شدند. سپس به هر چاهک تعداد مشخصی سلول در هر سی‌سی (۴۰۰۰۰۰ سلول در هر چاهک)، که به وسیله لام نئوبار شمارش شد اضافه گردید. سپس به منظور ارزیابی کمی و کیفی سلول‌ها، میزان رشد و بقاء به ترتیب با استفاده از میکروسکوپ معکوس (بررسی مورفولوژی) و رنگ حیاتی تریپان بلو ۰/۴ درصد (ارزیابی کمی) مورد بررسی قرار گرفت .

آماده سازی مایع کیست هیداتیک (Hydatid Cyst Fluid: HCF) :

مایع کیست هیداتیک از ریه و یا کبد گوسفندان آلوده به کیست هیداتیک با استفاده از سرنگ‌های ۲۰ میلی‌لیتری جمع‌آوری و پس از سانتریفوژ در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار (به مدت ۱۰ دقیقه و در دور ۵۰۰۰)، مایع رویی (به عنوان مایع کیست هیداتیک) برداشته و در لوله‌های جداگانه ریخته و تا انجام مراحل بعدی در فریزر ۲۰- نگهداری شدند. به منظور استریل نمودن مایع کیست، قبل از استفاده در محیط‌های کشت، از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استفاده گردید و همچنین به منظور غیرفعال نمودن کمپلمان، مایع کیست در ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد(۱۷).

یافته ها

در مطالعه حاضر ۵ گروه تیمار شده از سلول‌های فیبروبلاست در فلاسک‌های حاوی محیط کشت به ترتیب در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کاشته شدن سلول‌ها و اضافه کردن محیط با غلظت‌های مورد نظر، مورد بررسی قرار گرفت. سپس میزان تکثیر و رشد سلول‌ها تا سه روز متوالی ارزیابی شدند. میزان تکثیر و رشد سلول‌ها در ۵ گروه تحت بررسی به ترتیب زیر بودند.

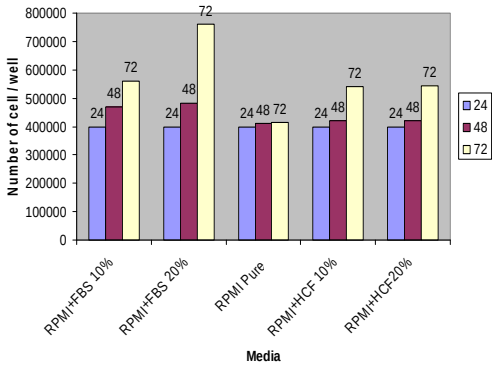
گروه اول شامل FBS ده درصد + RPMI بود که بعد از ۲۴ ساعت کشت تعداد سلول به طور میانگین به ۴۰۰۰۰۰ افزایش یافت و بعد از ۴۸ ساعت به ۴۷۰۰۰۰ عدد و بعد از ۷۲ ساعت به ۵۶۰۰۰۰ عدد رسید.

گروه دوم شامل FBS بیست درصد + RPMI بعد که بعد از ۲۴ ساعت کشت تعداد سلول به طور میانگین به ۴۰۰۰۰۰ افزایش یافت و بعد از ۴۸ ساعت به ۴۸۲۰۰۰ عدد و بعد از ۷۲ ساعت به ۷۶۰۰۰۰ عدد رسید.

گروه سوم شامل RPMI خالص بود که بعد از ۲۴ ساعت کشت به طور میانگین به ۴۰۰۰۰۰ افزایش داشت و بعد از ۴۸ ساعت به ۴۱۰۰۰۰ عدد و بعد از ۷۲ ساعت به ۴۱۵۰۰۰ عدد رسید.

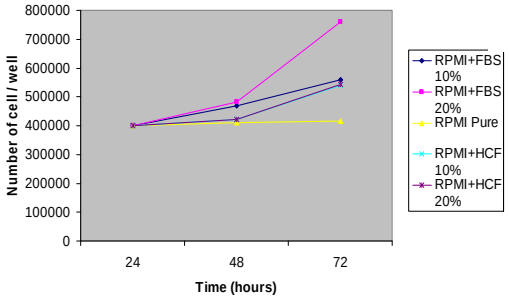
گروه چهارم شامل HCF ده درصد + RPMI بود که بعد از ۲۴ ساعت کشت تعداد سلول به طور میانگین به ۴۰۰۰۰۰ افزایش یافت و بعد از ۴۸ ساعت به ۴۲۰۰۰۰ عدد و بعد از ۷۲ ساعت به ۵۴۰۰۰۰ عدد رسید.

گروه پنجم شامل HCF بیست درصد + RPMI بود که بعد از ۲۴ ساعت کشت تعداد سلول به‌طور میانگین به ۴۰۰۰۰۰ افزایش یافت و بعد از ۴۸ ساعت به ۴۲۰۰۰۰ عدد و بعد از ۷۲ ساعت به ۵۴۴۰۰۰ عدد رسید (نمودار شماره ۱).



نمودارشماره ۱ : میزان رشد سلول‌های فیبروبلاست در محیط‌های مختلف بر اساس زمان

روند رشد سلول‌های فیبروبلاست در زمان های مختلف براساس نوع محیط کشت نشان داد که، در طی ۲۴ ساعت اول، فاز تاخیری به طور یکسان برای تمام گروه‌ها رخ داد. پس از آن درطی ۴۸ تا ۷۲ ساعت فاز لگاریتمی رشد اتفاق افتاد، این روند در محیط کشت RPMI با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد مایع کیست هیداتیک در مقایسه با محیط کشت RPMI حاوی غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد سرم جنین گاو، آهسته‌تر و تقریباً مشابه روند رشد در محیط کشت RPMI خالص بود. روند رشد تا ۷۲ ساعت ادامه یافت اما پس از آن رشد سلول‌های فیبروبلاست وارد فاز سکون (Plateau) شدند (نمودار شماره ۲).



نمودارشماره ۲ : منحنی رشد سلول‌های فیبروبلاست در زمان‌های مختلف براساس نوع محیط کشت

در ارزیابی کیفی (مورفولوژی)، سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت RPMI با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد سرم جنین گاو، رشد و تکثیر طبیعی داشته و بعد از یک هفته برای پاساژ مجدد آماده شدند. نهایتاً سلول‌ها در محیط RPMI خالص به صورت خفته و از حالت دوکی کشیده همراه با استطاله‌های سیتوپلاسمی به شکل دوکی کوچک ظاهر شدند. در محیط کشت حاوی مایع کیست هیداتیک با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد سلول‌ها از حالت دوکی به شکل گرد تبدیل شدند.

در ارزیابی کمی (میزان بقاء) سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت RPMI با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد مایع کیست هیداتیک، ۸۰ درصد طی سه روز متوالی زنده بودند. با پیگیری رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست در طی یک هفته، مشخص شد بیش از ۵۰ درصد (۵۴ درصد) سلول‌ها زنده هستند. در مقابل، میزان بقاء سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت حاوی غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد سرم جنین گاو، ۹۵ درصد (شرایط ایده‌ال) بود و در پیگیری سلول‌ها در طی یک

هفته بیش از ۸۰ درصد (۸۴ درصد) سلول‌ها زنده بودند.

بحث

مطالعه حاضر، بر اساس جستجو در بانک‌های اطلاعاتی معتبر و در دسترس برای نخستین بار در دنیا، به ارزیابی مایع کیست هیداتیک بر روی سلول‌های فیبروبلاست پرداخته است. تنها مطالعه موجود، بررسی قبلی نویسنده گان مقاله در زمینه کاربرد HCF بر روی انگل لیشمانیا می‌باشد(۱۷) که نتایج آن نشان داد، استفاده از HCF با غلظت ده درصد جایگزین مناسبی برای سرم جنین گاو (FBS) در محیط کشت مایع شامل عصاره مغز و قلب حاوی انگل لیشمانیا می‌باشد و در مقایسه با FBS باعث تحریک رشد و تکثیر انگل تا ۷۲ ساعت شده بود. یافته‌های تحقیق ما نشان داد که، می‌توان از مایع کیست هیداتیک گوسفندی به‌عنوان جایگزین سرم جنین گاو در محیط کشت RPMI حاوی سلول‌های فیبروبلاست استفاده نمود به‌طوری که به‌دنبال استفاده از این محیط کشت ۸۰ درصد سلول‌های فیبروبلاست طی سه روز متوالی به رشد خود ادامه داده و زنده مانند.

از مزایای کاربرد مایع کیست هیداتیک می‌توان به در دسترس بودن، مقرون به صرفه بودن و توکسیک نبودن، اخلاقی بودن، عدم نیاز به امکانات وسیع جهت تهیه آن، مغذی بودن و کارآمدی آن اشاره نمود. با توجه به این‌که ایرا ن جزء مناطق هایپر آندمیک بیماری کیست هیداتیک می باشد و بیماری در اغلب دام‌های ایران شیوع فراوانی دارد(۲۰-۱۸)، لذا مایع کیست به راحتی در دسترس است و با مراجعه به کشتارگاه‌های دام در هر شهر می‌توان مقدار فراوانی از آن را بدون پرداخت هیچ هزینه‌ای تهیه نمود.

با توجه به یافته‌های به‌دست آمده از تحقیق حاضر، در طی ۴۸ ساعت همان‌طور که انتظار می‌رفت تعداد سلول‌ها در FBS بیست درصد + RPMI به بیشترین مقدار رسید (۴۸۲۰۰۰ عدد) که در مقایسه با HCF بیست درصد + RPMI که به تعداد ۴۲۰۰۰۰ رسید تفاوت چندانی نداشته است. این مطلب در ۷۲ ساعت بعد از مطالعه نیز صدق می‌کند بدین ترتیب که تعداد سلول‌ها در محیط FBS بیست درصد + RPMI به تعداد ۷۶۰۰۰۰ رسید و اما در محیط FBS بیست درصد + RPMI به تعداد ۵۴۴۰۰۰ افزایش یافت که در مقایسه با غلظت ۲۰ درصدی FBS در محیط کشت و وجود فاکتورهای رشد موجود در آن، این تفاوت چشمگیر نیست. در ارزیابی کمی (میزان بقاء) سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت RPMI با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد مایع کیست هیداتیک، ۸۰ درصد طی سه روز متوالی زنده بودند اما با پیگیری رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست در طی یک هفته، مشخص شد تقریبا ۵۰ درصد (۵۴ درصد) سلول‌ها زنده هستند.

همچنین تعداد سلول‌ها در محیط FBS ده درصد + RPMI بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب به رقم ۴۲۰۰۰۰ و ۵۴۰۰۰۰ رسیدند که در مقایسه با محیط FBS بیست درصد + RPMI که بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب به رقم ۴۷۰۰۰۰ و ۵۶۰۰۰۰ رسیدند، که تفاوت زیادی مشاهده نمی‌شود. در بررسی ما، زمانی که مایع کیست هیداتیک با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد به همراه محیط RPMI برای رشد سلول‌های فیبروبلاست استفاده گردید، بعد از ۷۲ ساعت به ترتیب تعداد ۵۴۰۰۰۰ و ۵۴۴۰۰۰ سلول شمارش شد که این تعداد بیشتر از تعداد سلول‌های شمارش شده در محیط RPMI خالص (۴۱۵۰۰۰) بعد از ۷۲ ساعت بود. لذا حداقل می‌توان نتیجه گرفت که HCF حاوی فاکتورهای مناسب رشد بوده که سبب تحریک مکانیسم‌های رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست می‌شوند.

فخار و همکاران (۱۷) بیان کردند که میزان غلظت مایع کیست هیداتیک نیز در روند رشد انگل لیشمانیا اهمیت دارد و غلظت ده درصد از مایع کیست هیداتیک در محیط کشت باعث رشد بیشتر انگل می‌شود. در مطالعه مشابه دیگری در ایران (۱۲) غلظت ده درصد از

سرم مرغ باعث افزایش رشد پروماستیگوت‌های انگل لیشمانیا شده و سرم مرغ به عنوان جایگزین مناسبی برای FBS در محیط کشت RPMI معرفی شده است و توصیه شده از سرم مرغ به منظور کشت اولیه و حتی کشت انبوه انگل استفاده گردد.

در مطالعات مختلف بین ترکیبات مایع کیست هیداتیک و سرم تشابهات زیادی گزارش شده است(۲۰). بنابراین ممکن است ترکیبات و عوامل رشد موجود در این مایع مشابه عوامل رشد سرمی بوده و یا احتمالاً با توجه به تنوع میزبان و نوع کیست (واجد یا فاقد پروتواسکولکس) متفاوت می‌باشد. برخی از عوامل رشد سرمی گزارش شده در مطالعات مختلف شامل انسولین، عوامل رشد شبه انسولینی، عامل رشد اپی‌تلیالی، عوامل رشد پلاکتی، ترانسفرین و سوماتومدین C می‌باشند(۲۲،۲۱).

گلستانی و همکاران با بررسی مواد جایگزین برای FBS از قبیل سرم گروه خونی AB انسانی و عصاره پلاکتی و مخلوط آن دو در مقایسه با FBS و اثر آن‌ها بر رشد دودمان‌های سلولی هیبریدومای، دریافتند که FBS اثر شدیدی بر رشد سلول در فاز تکثیر دارد اما دارای فاز ثابت کوتاه و فاز مرگ سریع است و کمترین اثر در مرحله ثبات منحنی رشد است. لذا جهت تکثیر سلول‌ها در شمارش پایین مناسب به‌نظر می‌رسد(۱۱) که با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد و نشان می‌دهد FBS برای کشت تعداد سلول کمتر مانند کلون نمودن مناسب است. بنابراین ممکن است جهت کشت سلول در سیستم‌های پیوسته کشت که مدت زمان زنده بودن و تعداد سلول‌های زنده اهمیت بیشتری دارند مناسب باشد.

اما در مطالعه ما، HCF در مقادیر مناسب دارای شیب تکثیر کمتری نسبت به FBS بوده و اثر چندانی بر مرحله ثبات نداشته و سبب افزایش شیب مرگ منحنی رشد سلول‌ها گردید. بنابراین ممکن است جهت کشت سلول در سیستم‌های نا پیوسته کشت که مدت زمان زنده بودن و تعداد سلول‌های زنده اهمیت کمتری دارند، مناسب باشد. بنابراین می‌توان از HCF برای کشت تعداد کافی سلول و حفظ و نگهداری کوتاه مدت و یا به منظور انتقال و جابجایی سلول‌ها استفاده نمود. ضمناً گلستانی و همکاران سرم گروه خونی AB انسانی و عصاره پلاکتی و یا مخلوط آن دو را به‌عنوان جایگزین‌های کامل یا نسبی FBS برای دودمان‌های هیبریدومایی موش معرفی نمودند(۱۱).

در بررسی ما، رشد و تکثیر سلول های فیبروبلاست به مدت یک هفته هر روز به طور متوالی توسط میکروسکوپ معکوس مورد ارزیابی و مشاهده قرار گرفت. سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت RPMI با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد رشد و تکثیر طبیعی داشته و بعد از یک هفته برای پاساژ مجدد آماده گردیدند. سلول‌ها در محیط RPMI خالص به صورت خفته و از حالت دوکی کشیده همراه با استطاله‌های سیتوپلاسمی به شکل دوکی کوچک ظاهر گردیدند و در محیط کشت حاوی مایع کیست هیداتیک با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد سلول‌ها به شکل گرد و غیر فعال ظاهر شدند ولی زنده بودند.

به نظر می‌رسد تغییرات مورفولوژی ایجاد شده در سلول‌های فیبروبلاست در مواجهه با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد HCF در طی ۷۲ساعت ناشی از استرس و کاهش قابل توجه میزان بقاء آن‌ها در طی یک هفته احتمالاً به دنبال مکانیسم‌های آپوپتوز و عوامل خارج سلولی موثر در آن مانند سایتوکاین‌ها، هورمون‌ها، اندوتوکسین‌ها، نیتریک اکسید و غیره باشد. البته مشخص شدن این مطلب با تایید شواهد مولکولی و سیتولوژی و بررسی مارکرهای آپوپتوز امکان‌پذیر خواهد بود و پیشنهاد می‌گردد در آینده با ارزیابی روند احتمالی آپوپتوز و فاکتورهای میتوژنیک بر روی سلول‌های فیبروبلاست مواجهه شده با مایع کیست هیداتیک مطالعات گسترده‌ای انجام پذیرد. همچنین بررسی سمیت سلولی (Toxicity) احتمالی مایع کیست هیداتیک در مواجهه با

تیره‌های مختلف سلولی با استفاده از روش رنگ سنجی MTT Assay نیز توصیه می‌گردد.

مختاری و همکاران در سال ۲۰۱۱ طی یک مطالعه In vitro در یافتند، که سلول‌های لنفوسیت انسان در مواجهه با مایع کیست هیداتیک دچار آپوپتوز می‌شوند. آن‌ها آپوپتوز را به عنوان یک مکانیسم احتمالی انگل اکینوکوکوس (عامل کیست هیداتیک) در مقابله با سیستم دفاعی میزبان و رشد و نهایتاً ایجاد کیست هیداتیک معرفی نموده‌اند(۲۳).

Benjamin و Kanan در سال ۲۰۰۶ اثرات مایع کیست هیداتیک بر تمایز سلول‌های دندرتیک و تولید سایتوکاین‌ها در محیط‌های کشت را به منظور شناخت بیشتر مکانیسم‌های پاسخ سیستم ایمنی در بیماری کیست هیداتیک مورد بررسی قرار دادند. مشخص شده است مقادیر اندوتوکسین‌های موجود در مایع کیست گاوی در صورتی که کمتر از ۱۰۰pg/ml باشد اختلالی در کشت ایجاد نمی‌کند و این مایع باعث تغییرات در تولید سایتوکاین‌ها شده و به‌طور فزاینده‌ای باعث تولید PGE2 ، IL-6 و IL-12 توسط مونوسیت‌های خون محیطی کشت داده شده در IL-4/GM-CSF می‌شود. ضمناً آن‌ها اذعان نمودند که آزاد شدن PGE2 می‌تواند فنوتیپ سلول‌ها را حین کشت سلول تغییر دهد(۲۴). در مطالعه Macintyre و همکاران نیز با بررسی تولید سایتوکاین‌ها و اثرات آن‌ها بر رشد تیره‌های مختلف لوکوسیتی در مواجهه با HCF دریافتند که این مایع با تولید سایتوکاین‌های مختلف مانع از ورود سلول‌های T cell از نوع D^{10} به فاز s چرخه سلولی می‌شود(۲۵).

در پایان پیشنهاد می‌شود جهت دستیابی به نتایج ارزنده‌تر در این مورد و استفاده بهینه از سرمایه‌های کشور، این مطالعه را با طیف وسیع‌تری ادامه داده و بتوانیم با ایجاد تغییرات اساسی درآن و آنالیز کمی و کیفی، آن را در اختیار محققین کشور و حتی سایر کشورهای منطقه و یا کشورهایی که دسترسی به سرم جنین گاو وجود ندارد یا تهیه آن مشکل و پرهزینه است قرار دهیم.

در نهایت می‌توان نتیجه‌گیری کرد که، با توجه به میزان بقاء و روند رشد سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت RPMI حاوی مایع کیست هیداتیک با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد و مشابه بودن چنین وضعیتی برای سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت RPMI خالص و از سوی دیگر دسترسی آسان و ارزان بودن مایع کیست هیداتیک، می‌توان از مایع کیست هیداتیک به عنوان جایگزین مناسبی برای سرم جنین گاو به‌مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت RPMI استفاده نمود. همچنین مایع کیست هیداتیک می‌تواند به عنوان محیط ترانسپورت (انتقال) برای نگهداری نسبتاً طولانی در شرایط آزمایشگاهی با کمترین هزینه برای سلول‌های فیبروبلاست استفاده گردد. این امر امید بخش آن است که با توجه به بسیار پرهزینه و غیراخلاقی بودن (به دلیل سزارین اجباری یک گاو) تهیه سرم جنین گاو، مایع کیست هیداتیک بسیار مقرون به صرفه خواهد بود.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی ۳۷-۸۸ دانشگاه علوم پزشکی مازندران می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران بخاطر تامین هزینه‌های مالی تشکر می‌نماییم.

References

1. Helgason ChD, Miller CL. Basic cell culture protocols, 3th ed. New Jersey: Humana press; 2004.
2. Becker JM, Calawell GA, Zachgo EA. Biotechnology: a laboratory course. 2nd ed. California USA: Academic press; 1996.
3. New Man C. Serum-free cell culture, the ethical, scientific and economic choice. Biomed Scientist 2003; p 941-942.
4. Ali SA, Igbal J, Ahmad B, Masoom M. A

semi synthetic fetal calf serum-free liquid medium for in vitro cultivation of Leishmania promastigotes. Am J Trop Med Hyg 1998 59(1): 163-165.

5. Sasse M, Lengwinat T, Henklein P, Hlinak A, Schade R. Replacement of fetal calf serum in cell cultures by an egg yolk factor with cholecystokinin/gastrin-like immunoreactivity. Altern Lab Anim 2000; 28(6): 815-831.
6. Schwartz KA, Lu G, Trosko JE, Chang CC. Serum from outdated human platelet concentrates: an alternative supplement for tissue (fibroblast) culture media. Am J Hematol 1984; 17(1): 23-27.
7. Clemmons DR, Isley WL, Brown MT. Dialyzable factor in human serum of platelet origin stimulates endothelial cell replication and growth. Proc Natl Acad Sci 1983; 80(6): 1641-1645.
8. Pietschmann P, Stockl J, Draxler S, Majdic O, Knapp W. Functional and phenotypic characteristics of dendritic cells generated in human plasma supplemented medium. Scand J Immunol 2000; 51(4): 377-383.
9. Filipic B, Shehata M, Toth S, Schwarzmeier J, Koren S. Novel serum replacement based on bovine ocular fluid: a useful tool for cultivation of different animal cells in vitro. Altex 2002; 19(1): 15-20.
10. Grace S, Guthrie LA, Johnston RB Jr. The use of mouse serum and the presence of non-adherent cells for the culture of mouse macrophages. J Immunol Methods 1988; 114(1-2): 21-26.
11. Golestani R, Moazzeni S M, Puorfathollah AA, Hamidpour L, Sharafi M, Attarchi Z, et al. Preparation of fetal calf serum alternatives and their effects on growth and secretion of hybridoma cell lines. Blood Res J 2006; 3(3): 221-232.
12. Nasiri V, Dalimi A, Habibi Gh, Esmailnia K. Use of chicken serum as a good replacement for the fetal calf serum in cultivation of promastigotes of Leishmania major. Arch Razi Institute 2011; 66(1): 59-64.
13. Mangalo R, Marcovich H. Mitogenic factors for Balb/c 3T3 cells isolated from the serum of horses by affinity chromatography on a column using fetal calf serum as the ligand. C R Acad Sci III 1984; 299(11): 445-450.
14. Howard MK, Pharaoh MM, Ashall F, Miles MA. Human urine stimulates growth of Leishmania in vitro. Trans R Soc Med Hyg 1991; 85(1): 477-479.
15. Muniaraj M, Lal CS, Kumar S, Sinha P K, Das P. Milk of cow (Bos Taurus), Buffalo, (Bubalus bubalis) and Goat (Capra hircicus): a better alternative than fetal bovine serum in media for primary isolation, in vitro cultivation and maintenance of Leishmania donovani promastigotes. J Clin Microbiol 2007; 45(4): 1353-1560.
16. Keila A M Ferreira, Paulo E S Lemos-Júnior, Eliane Lages-Silva, Luis E Ramírez, André LPedrosa. Human urine stimulates in vitro growth of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli. Parasitol Res 2007; 101(5): 1383-1388.
17. Fakhar M, Habibi P, Motazedian MH. Evaluation of hydatid cyst fluid as a substitute for fetal bovine serum (FBS) in culture of Leishmania major. Tabibe-Shargh 2006; 8(1): 47-52 (Persian).
18. Frayha GJ, Hadad R. Composition of protoscolices and hydatid cyst fluid of Echinococcus granulosus. Int J Parasitol 1989; 10(5-6): 359-364.
19. Radfar MH, Iranyar N. Biochemical profiles of hydatid cyst fluids of Echinococcus

granulosus of human and animal origin in Iran. Vet Arhiv 2004; 74(6): 435-442.

20. Kojuri GA, Moshtaghi HA. Comparative study on copper, Zinc, Cobalt and Iron concentration in hydatid cyst (fertile and infertile) fluid, Liver and Sheep serum. Res J Parasitol 2008; 3(2): 67-70.
21. Childs CB, Proper JA, Tucker RF, Moses HL. Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. Proc Natl Acad Sci 1982; 79(17): 5312-5316.
22. Dainiak N, Davies G, Kalmanti M, Lawler J, Kulkarni V. Platelet-derived Growth Factor Promotes Proliferation of Erythropoietic Progenitor Cells In Vitro. J Clin Invest 1983; 71(5): 1206-1214.
23. Mokhtari Amirmajdi M, Sankian M, Eftekharzadeh Mashhadi I, Varasteh A, Vahedi F, Sadrizadeh A, Spotin A. Apoptosis of human lymphocytes after exposure to hydatid fluid. Iranian J Parasitol 2011; 6(2): 9-16.
24. Kanan JH, Chain BM. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of Echinococcus granulosus. Immunology 2006; 118(2): 271-278.
25. Macintyre AR, Dixon JB, Green JR. Growth kinetics of leukocyte cell lines cultured with hydatid fluid of Echinococcus granulosus equinus. Parasite Immunol 2000; 22(12): 651-657.