

خون

فصلنامه علمی پژوهشی

دوره ۳ شماره ۳ پاییز ۸۵ (۲۲۱-۲۲۲)

تهیه مواد جایگزین سرم جنین گاو و بررسی اثر آن‌ها بر رشد دودمان‌های سلوالی هیبریدومایی و میزان ترشح آنتی‌بادی‌های منوکلونال

دکتر رضا گلستانی^۱، دکتر سید محمد مؤذنی^۲، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌الله^۳، لطیف حمیدپور^۴، دکتر مجتبی شرفی^۵، دکتر زهره عطارچی^۶، دکتر بشیر حاجی‌بیگی^۷، فرزانه توسلی^۸، جمشید اسماعیلی^۹، سعید ریوندی^{۱۰}

چکیده سابقه و هدف

دست‌یابی به منابع جایگزین سرم جنین گاو به عنوان ماده مغذی کشت سلوال به علت کمبود این نوع سرم و نیازهای متفاوت سلوال‌های مختلف همواره مورد بررسی می‌باشد. این مطالعه به تهیه مواد مغذی جانشین سرم جنین گاو و بررسی اثر آن‌ها بر رشد سلوال‌ها و ترشح آنتی‌بادی‌های منوکلونال توسط دودمان‌های سلوالی هیبریدومایی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پلاکت‌های تاریخ گذشته با گروه‌های مختلف به منظور استخراج عوامل رشد موجود در آن‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. پلاسما با گروه AB نیز به سرم تبدیل شد و اثر آن با محیط‌های حاوی سرم جنین گاو، هیبوگزانین - تیمیدین (HT) و RPMI ۱۶۴۰ (RPMI) مورد مقایسه قرار گرفت. شاخص‌های رشد مورد ارزیابی شامل شمارش ابتدایی سلوال‌ها، Confluency (میزان پر شدن چاهک) روزانه و تیتراسیون آنتی‌بادی‌های منوکلونال آنتی A و آنتی B گروه‌های خونی بودند. آنالیز آماری شامل آزمون t تک نمونه‌ای، برازش منحنی رگرسیون چندگانه لگاریتمی و تحلیل عاملی منحنی‌های رشد توسط نرم‌افزار SPSS ۱۲ انجام شد.

یافته‌ها

چهار ماده مغذی سرم AB انسانی (ABP)، سرم جنین گاو (FCS)، عصاره پلاکتی انسان (PLT) و مخلوط AB و PLT (ABP) (جهت رشد سلوال‌های هیبریدومایی موشی تولید) کشت سرم‌های گروه‌های خونی A و B مورد ارزیابی قرار گرفتند و با شاخص‌های رشد در محیط پایه RPMI ۱۶۴۰ مقایسه شدند. بیشترین اثر مثبت بر رشد به ترتیب نزولی عبارت بود از: ۱- ABP/۵٪ - ۲- ABP/۱۰٪ - ۳- FCS/۱۰٪ - ۴- ABP/۱۰٪ - ۵- AB/۱۰٪ - ۶- PLT/۵٪ - ۷- PLT/۱۰٪ - ۸- ABP/۱۰٪ - ۹- ABP/۲۰٪ - ۱۰- هیبوگزانین - تیمیدین و تنها AB/۲۰٪ مانع رشد گردید. تیتر آنتی A و آنتی B ایجاد شده توسط هیبریدوم‌ها در مقادیر ۵ و ۱۰ درصد از PLT، AB و مخلوط این دو (ABP) نسبت به FCS ۵ تا ۱۰ درصد به ترتیب نزولی به صورت زیر به دست آمد: ۱- ABP/۵٪ - ۲- ABP/۱۰٪ - ۳- ABP/۱۰٪ - ۴- AB/۱۰٪ - ۵- PLT/۱۰٪ - ۶- ABP/۱۰٪ - ۷- ABP/۱۰٪ - ۸- ABP/۱۰٪ - ۹- ABP/۱۰٪ - ۱۰- ABP/۱۰٪ - ۱۱- ABP/۱۰٪ - ۱۲- ABP/۱۰٪ - ۱۳- ABP/۱۰٪ - ۱۴- ABP/۱۰٪ - ۱۵- ABP/۱۰٪ - ۱۶- ABP/۱۰٪ - ۱۷- ABP/۱۰٪ - ۱۸- ABP/۱۰٪ - ۱۹- ABP/۱۰٪ - ۲۰- ABP/۱۰٪ - ۲۱- ABP/۱۰٪ - ۲۲- ABP/۱۰٪ - ۲۳- ABP/۱۰٪ - ۲۴- ABP/۱۰٪ - ۲۵- ABP/۱۰٪ - ۲۶- ABP/۱۰٪ - ۲۷- ABP/۱۰٪ - ۲۸- ABP/۱۰٪ - ۲۹- ABP/۱۰٪ - ۳۰- ABP/۱۰٪ - ۳۱- ABP/۱۰٪ - ۳۲- ABP/۱۰٪ - ۳۳- ABP/۱۰٪ - ۳۴- ABP/۱۰٪ - ۳۵- ABP/۱۰٪ - ۳۶- ABP/۱۰٪ - ۳۷- ABP/۱۰٪ - ۳۸- ABP/۱۰٪ - ۳۹- ABP/۱۰٪ - ۴۰- ABP/۱۰٪ - ۴۱- ABP/۱۰٪ - ۴۲- ABP/۱۰٪ - ۴۳- ABP/۱۰٪ - ۴۴- ABP/۱۰٪ - ۴۵- ABP/۱۰٪ - ۴۶- ABP/۱۰٪ - ۴۷- ABP/۱۰٪ - ۴۸- ABP/۱۰٪ - ۴۹- ABP/۱۰٪ - ۵۰- ABP/۱۰٪ - ۵۱- ABP/۱۰٪ - ۵۲- ABP/۱۰٪ - ۵۳- ABP/۱۰٪ - ۵۴- ABP/۱۰٪ - ۵۵- ABP/۱۰٪ - ۵۶- ABP/۱۰٪ - ۵۷- ABP/۱۰٪ - ۵۸- ABP/۱۰٪ - ۵۹- ABP/۱۰٪ - ۶۰- ABP/۱۰٪ - ۶۱- ABP/۱۰٪ - ۶۲- ABP/۱۰٪ - ۶۳- ABP/۱۰٪ - ۶۴- ABP/۱۰٪ - ۶۵- ABP/۱۰٪ - ۶۶- ABP/۱۰٪ - ۶۷- ABP/۱۰٪ - ۶۸- ABP/۱۰٪ - ۶۹- ABP/۱۰٪ - ۷۰- ABP/۱۰٪ - ۷۱- ABP/۱۰٪ - ۷۲- ABP/۱۰٪ - ۷۳- ABP/۱۰٪ - ۷۴- ABP/۱۰٪ - ۷۵- ABP/۱۰٪ - ۷۶- ABP/۱۰٪ - ۷۷- ABP/۱۰٪ - ۷۸- ABP/۱۰٪ - ۷۹- ABP/۱۰٪ - ۸۰- ABP/۱۰٪ - ۸۱- ABP/۱۰٪ - ۸۲- ABP/۱۰٪ - ۸۳- ABP/۱۰٪ - ۸۴- ABP/۱۰٪ - ۸۵- ABP/۱۰٪ - ۸۶- ABP/۱۰٪ - ۸۷- ABP/۱۰٪ - ۸۸- ABP/۱۰٪ - ۸۹- ABP/۱۰٪ - ۹۰- ABP/۱۰٪ - ۹۱- ABP/۱۰٪ - ۹۲- ABP/۱۰٪ - ۹۳- ABP/۱۰٪ - ۹۴- ABP/۱۰٪ - ۹۵- ABP/۱۰٪ - ۹۶- ABP/۱۰٪ - ۹۷- ABP/۱۰٪ - ۹۸- ABP/۱۰٪ - ۹۹- ABP/۱۰٪ - ۱۰۰- ABP/۱۰٪ - ۱۰۱- ABP/۱۰٪ - ۱۰۲- ABP/۱۰٪ - ۱۰۳- ABP/۱۰٪ - ۱۰۴- ABP/۱۰٪ - ۱۰۵- ABP/۱۰٪ - ۱۰۶- ABP/۱۰٪ - ۱۰۷- ABP/۱۰٪ - ۱۰۸- ABP/۱۰٪ - ۱۰۹- ABP/۱۰٪ - ۱۱۰- ABP/۱۰٪ - ۱۱۱- ABP/۱۰٪ - ۱۱۲- ABP/۱۰٪ - ۱۱۳- ABP/۱۰٪ - ۱۱۴- ABP/۱۰٪ - ۱۱۵- ABP/۱۰٪ - ۱۱۶- ABP/۱۰٪ - ۱۱۷- ABP/۱۰٪ - ۱۱۸- ABP/۱۰٪ - ۱۱۹- ABP/۱۰٪ - ۱۲۰- ABP/۱۰٪ - ۱۲۱- ABP/۱۰٪ - ۱۲۲- ABP/۱۰٪ - ۱۲۳- ABP/۱۰٪ - ۱۲۴- ABP/۱۰٪ - ۱۲۵- ABP/۱۰٪ - ۱۲۶- ABP/۱۰٪ - ۱۲۷- ABP/۱۰٪ - ۱۲۸- ABP/۱۰٪ - ۱۲۹- ABP/۱۰٪ - ۱۳۰- ABP/۱۰٪ - ۱۳۱- ABP/۱۰٪ - ۱۳۲- ABP/۱۰٪ - ۱۳۳- ABP/۱۰٪ - ۱۳۴- ABP/۱۰٪ - ۱۳۵- ABP/۱۰٪ - ۱۳۶- ABP/۱۰٪ - ۱۳۷- ABP/۱۰٪ - ۱۳۸- ABP/۱۰٪ - ۱۳۹- ABP/۱۰٪ - ۱۴۰- ABP/۱۰٪ - ۱۴۱- ABP/۱۰٪ - ۱۴۲- ABP/۱۰٪ - ۱۴۳- ABP/۱۰٪ - ۱۴۴- ABP/۱۰٪ - ۱۴۵- ABP/۱۰٪ - ۱۴۶- ABP/۱۰٪ - ۱۴۷- ABP/۱۰٪ - ۱۴۸- ABP/۱۰٪ - ۱۴۹- ABP/۱۰٪ - ۱۵۰- ABP/۱۰٪ - ۱۵۱- ABP/۱۰٪ - ۱۵۲- ABP/۱۰٪ - ۱۵۳- ABP/۱۰٪ - ۱۵۴- ABP/۱۰٪ - ۱۵۵- ABP/۱۰٪ - ۱۵۶- ABP/۱۰٪ - ۱۵۷- ABP/۱۰٪ - ۱۵۸- ABP/۱۰٪ - ۱۵۹- ABP/۱۰٪ - ۱۶۰- ABP/۱۰٪ - ۱۶۱- ABP/۱۰٪ - ۱۶۲- ABP/۱۰٪ - ۱۶۳- ABP/۱۰٪ - ۱۶۴- ABP/۱۰٪ - ۱۶۵- ABP/۱۰٪ - ۱۶۶- ABP/۱۰٪ - ۱۶۷- ABP/۱۰٪ - ۱۶۸- ABP/۱۰٪ - ۱۶۹- ABP/۱۰٪ - ۱۷۰- ABP/۱۰٪ - ۱۷۱- ABP/۱۰٪ - ۱۷۲- ABP/۱۰٪ - ۱۷۳- ABP/۱۰٪ - ۱۷۴- ABP/۱۰٪ - ۱۷۵- ABP/۱۰٪ - ۱۷۶- ABP/۱۰٪ - ۱۷۷- ABP/۱۰٪ - ۱۷۸- ABP/۱۰٪ - ۱۷۹- ABP/۱۰٪ - ۱۸۰- ABP/۱۰٪ - ۱۸۱- ABP/۱۰٪ - ۱۸۲- ABP/۱۰٪ - ۱۸۳- ABP/۱۰٪ - ۱۸۴- ABP/۱۰٪ - ۱۸۵- ABP/۱۰٪ - ۱۸۶- ABP/۱۰٪ - ۱۸۷- ABP/۱۰٪ - ۱۸۸- ABP/۱۰٪ - ۱۸۹- ABP/۱۰٪ - ۱۹۰- ABP/۱۰٪ - ۱۹۱- ABP/۱۰٪ - ۱۹۲- ABP/۱۰٪ - ۱۹۳- ABP/۱۰٪ - ۱۹۴- ABP/۱۰٪ - ۱۹۵- ABP/۱۰٪ - ۱۹۶- ABP/۱۰٪ - ۱۹۷- ABP/۱۰٪ - ۱۹۸- ABP/۱۰٪ - ۱۹۹- ABP/۱۰٪ - ۲۰۰- ABP/۱۰٪ - ۲۰۱- ABP/۱۰٪ - ۲۰۲- ABP/۱۰٪ - ۲۰۳- ABP/۱۰٪ - ۲۰۴- ABP/۱۰٪ - ۲۰۵- ABP/۱۰٪ - ۲۰۶- ABP/۱۰٪ - ۲۰۷- ABP/۱۰٪ - ۲۰۸- ABP/۱۰٪ - ۲۰۹- ABP/۱۰٪ - ۲۱۰- ABP/۱۰٪ - ۲۱۱- ABP/۱۰٪ - ۲۱۲- ABP/۱۰٪ - ۲۱۳- ABP/۱۰٪ - ۲۱۴- ABP/۱۰٪ - ۲۱۵- ABP/۱۰٪ - ۲۱۶- ABP/۱۰٪ - ۲۱۷- ABP/۱۰٪ - ۲۱۸- ABP/۱۰٪ - ۲۱۹- ABP/۱۰٪ - ۲۲۰- ABP/۱۰٪ - ۲۲۱- ABP/۱۰٪ - ۲۲۲- ABP/۱۰٪ - ۲۲۳- ABP/۱۰٪ - ۲۲۴- ABP/۱۰٪ - ۲۲۵- ABP/۱۰٪ - ۲۲۶- ABP/۱۰٪ - ۲۲۷- ABP/۱۰٪ - ۲۲۸- ABP/۱۰٪ - ۲۲۹- ABP/۱۰٪ - ۲۳۰- ABP/۱۰٪ - ۲۳۱- ABP/۱۰٪ - ۲۳۲- ABP/۱۰٪ - ۲۳۳- ABP/۱۰٪ - ۲۳۴- ABP/۱۰٪ - ۲۳۵- ABP/۱۰٪ - ۲۳۶- ABP/۱۰٪ - ۲۳۷- ABP/۱۰٪ - ۲۳۸- ABP/۱۰٪ - ۲۳۹- ABP/۱۰٪ - ۲۴۰- ABP/۱۰٪ - ۲۴۱- ABP/۱۰٪ - ۲۴۲- ABP/۱۰٪ - ۲۴۳- ABP/۱۰٪ - ۲۴۴- ABP/۱۰٪ - ۲۴۵- ABP/۱۰٪ - ۲۴۶- ABP/۱۰٪ - ۲۴۷- ABP/۱۰٪ - ۲۴۸- ABP/۱۰٪ - ۲۴۹- ABP/۱۰٪ - ۲۵۰- ABP/۱۰٪ - ۲۵۱- ABP/۱۰٪ - ۲۵۲- ABP/۱۰٪ - ۲۵۳- ABP/۱۰٪ - ۲۵۴- ABP/۱۰٪ - ۲۵۵- ABP/۱۰٪ - ۲۵۶- ABP/۱۰٪ - ۲۵۷- ABP/۱۰٪ - ۲۵۸- ABP/۱۰٪ - ۲۵۹- ABP/۱۰٪ - ۲۶۰- ABP/۱۰٪ - ۲۶۱- ABP/۱۰٪ - ۲۶۲- ABP/۱۰٪ - ۲۶۳- ABP/۱۰٪ - ۲۶۴- ABP/۱۰٪ - ۲۶۵- ABP/۱۰٪ - ۲۶۶- ABP/۱۰٪ - ۲۶۷- ABP/۱۰٪ - ۲۶۸- ABP/۱۰٪ - ۲۶۹- ABP/۱۰٪ - ۲۷۰- ABP/۱۰٪ - ۲۷۱- ABP/۱۰٪ - ۲۷۲- ABP/۱۰٪ - ۲۷۳- ABP/۱۰٪ - ۲۷۴- ABP/۱۰٪ - ۲۷۵- ABP/۱۰٪ - ۲۷۶- ABP/۱۰٪ - ۲۷۷- ABP/۱۰٪ - ۲۷۸- ABP/۱۰٪ - ۲۷۹- ABP/۱۰٪ - ۲۸۰- ABP/۱۰٪ - ۲۸۱- ABP/۱۰٪ - ۲۸۲- ABP/۱۰٪ - ۲۸۳- ABP/۱۰٪ - ۲۸۴- ABP/۱۰٪ - ۲۸۵- ABP/۱۰٪ - ۲۸۶- ABP/۱۰٪ - ۲۸۷- ABP/۱۰٪ - ۲۸۸- ABP/۱۰٪ - ۲۸۹- ABP/۱۰٪ - ۲۹۰- ABP/۱۰٪ - ۲۹۱- ABP/۱۰٪ - ۲۹۲- ABP/۱۰٪ - ۲۹۳- ABP/۱۰٪ - ۲۹۴- ABP/۱۰٪ - ۲۹۵- ABP/۱۰٪ - ۲۹۶- ABP/۱۰٪ - ۲۹۷- ABP/۱۰٪ - ۲۹۸- ABP/۱۰٪ - ۲۹۹- ABP/۱۰٪ - ۳۰۰- ABP/۱۰٪ - ۳۰۱- ABP/۱۰٪ - ۳۰۲- ABP/۱۰٪ - ۳۰۳- ABP/۱۰٪ - ۳۰۴- ABP/۱۰٪ - ۳۰۵- ABP/۱۰٪ - ۳۰۶- ABP/۱۰٪ - ۳۰۷- ABP/۱۰٪ - ۳۰۸- ABP/۱۰٪ - ۳۰۹- ABP/۱۰٪ - ۳۱۰- ABP/۱۰٪ - ۳۱۱- ABP/۱۰٪ - ۳۱۲- ABP/۱۰٪ - ۳۱۳- ABP/۱۰٪ - ۳۱۴- ABP/۱۰٪ - ۳۱۵- ABP/۱۰٪ - ۳۱۶- ABP/۱۰٪ - ۳۱۷- ABP/۱۰٪ - ۳۱۸- ABP/۱۰٪ - ۳۱۹- ABP/۱۰٪ - ۳۲۰- ABP/۱۰٪ - ۳۲۱- ABP/۱۰٪ - ۳۲۲- ABP/۱۰٪ - ۳۲۳- ABP/۱۰٪ - ۳۲۴- ABP/۱۰٪ - ۳۲۵- ABP/۱۰٪ - ۳۲۶- ABP/۱۰٪ - ۳۲۷- ABP/۱۰٪ - ۳۲۸- ABP/۱۰٪ - ۳۲۹- ABP/۱۰٪ - ۳۳۰- ABP/۱۰٪ - ۳۳۱- ABP/۱۰٪ - ۳۳۲- ABP/۱۰٪ - ۳۳۳- ABP/۱۰٪ - ۳۳۴- ABP/۱۰٪ - ۳۳۵- ABP/۱۰٪ - ۳۳۶- ABP/۱۰٪ - ۳۳۷- ABP/۱۰٪ - ۳۳۸- ABP/۱۰٪ - ۳۳۹- ABP/۱۰٪ - ۳۴۰- ABP/۱۰٪ - ۳۴۱- ABP/۱۰٪ - ۳۴۲- ABP/۱۰٪ - ۳۴۳- ABP/۱۰٪ - ۳۴۴- ABP/۱۰٪ - ۳۴۵- ABP/۱۰٪ - ۳۴۶- ABP/۱۰٪ - ۳۴۷- ABP/۱۰٪ - ۳۴۸- ABP/۱۰٪ - ۳۴۹- ABP/۱۰٪ - ۳۵۰- ABP/۱۰٪ - ۳۵۱- ABP/۱۰٪ - ۳۵۲- ABP/۱۰٪ - ۳۵۳- ABP/۱۰٪ - ۳۵۴- ABP/۱۰٪ - ۳۵۵- ABP/۱۰٪ - ۳۵۶- ABP/۱۰٪ - ۳۵۷- ABP/۱۰٪ - ۳۵۸- ABP/۱۰٪ - ۳۵۹- ABP/۱۰٪ - ۳۶۰- ABP/۱۰٪ - ۳۶۱- ABP/۱۰٪ - ۳۶۲- ABP/۱۰٪ - ۳۶۳- ABP/۱۰٪ - ۳۶۴- ABP/۱۰٪ - ۳۶۵- ABP/۱۰٪ - ۳۶۶- ABP/۱۰٪ - ۳۶۷- ABP/۱۰٪ - ۳۶۸- ABP/۱۰٪ - ۳۶۹- ABP/۱۰٪ - ۳۷۰- ABP/۱۰٪ - ۳۷۱- ABP/۱۰٪ - ۳۷۲- ABP/۱۰٪ - ۳۷۳- ABP/۱۰٪ - ۳۷۴- ABP/۱۰٪ - ۳۷۵- ABP/۱۰٪ - ۳۷۶- ABP/۱۰٪ - ۳۷۷- ABP/۱۰٪ - ۳۷۸- ABP/۱۰٪ - ۳۷۹- ABP/۱۰٪ - ۳۸۰- ABP/۱۰٪ - ۳۸۱- ABP/۱۰٪ - ۳۸۲- ABP/۱۰٪ - ۳۸۳- ABP/۱۰٪ - ۳۸۴- ABP/۱۰٪ - ۳۸۵- ABP/۱۰٪ - ۳۸۶- ABP/۱۰٪ - ۳۸۷- ABP/۱۰٪ - ۳۸۸- ABP/۱۰٪ - ۳۸۹- ABP/۱۰٪ - ۳۹۰- ABP/۱۰٪ - ۳۹۱- ABP/۱۰٪ - ۳۹۲- ABP/۱۰٪ - ۳۹۳- ABP/۱۰٪ - ۳۹۴- ABP/۱۰٪ - ۳۹۵- ABP/۱۰٪ - ۳۹۶- ABP/۱۰٪ - ۳۹۷- ABP/۱۰٪ - ۳۹۸- ABP/۱۰٪ - ۳۹۹- ABP/۱۰٪ - ۴۰۰- ABP/۱۰٪ - ۴۰۱- ABP/۱۰٪ - ۴۰۲- ABP/۱۰٪ - ۴۰۳- ABP/۱۰٪ - ۴۰۴- ABP/۱۰٪ - ۴۰۵- ABP/۱۰٪ - ۴۰۶- ABP/۱۰٪ - ۴۰۷- ABP/۱۰٪ - ۴۰۸- ABP/۱۰٪ - ۴۰۹- ABP/۱۰٪ - ۴۱۰- ABP/۱۰٪ - ۴۱۱- ABP/۱۰٪ - ۴۱۲- ABP/۱۰٪ - ۴۱۳- ABP/۱۰٪ - ۴۱۴- ABP/۱۰٪ - ۴۱۵- ABP/۱۰٪ - ۴۱۶- ABP/۱۰٪ - ۴۱۷- ABP/۱۰٪ - ۴۱۸- ABP/۱۰٪ - ۴۱۹- ABP/۱۰٪ - ۴۲۰- ABP/۱۰٪ - ۴۲۱- ABP/۱۰٪ - ۴۲۲- ABP/۱۰٪ - ۴۲۳- ABP/۱۰٪ - ۴۲۴- ABP/۱۰٪ - ۴۲۵- ABP/۱۰٪ - ۴۲۶- ABP/۱۰٪ - ۴۲۷- ABP/۱۰٪ - ۴۲۸- ABP/۱۰٪ - ۴۲۹- ABP/۱۰٪ - ۴۳۰- ABP/۱۰٪ - ۴۳۱- ABP/۱۰٪ - ۴۳۲- ABP/۱۰٪ - ۴۳۳- ABP/۱۰٪ - ۴۳۴- ABP/۱۰٪ - ۴۳۵- ABP/۱۰٪ - ۴۳۶- ABP/۱۰٪ - ۴۳۷- ABP/۱۰٪ - ۴۳۸- ABP/۱۰٪ - ۴۳۹- ABP/۱۰٪ - ۴۴۰- ABP/۱۰٪ - ۴۴۱- ABP/۱۰٪ - ۴۴۲- ABP/۱۰٪ - ۴۴۳- ABP/۱۰٪ - ۴۴۴- ABP/۱۰٪ - ۴۴۵- ABP/۱۰٪ - ۴۴۶- ABP/۱۰٪ - ۴۴۷- ABP/۱۰٪ - ۴۴۸- ABP/۱۰٪ - ۴۴۹- ABP/۱۰٪ - ۴۵۰- ABP/۱۰٪ - ۴۵۱- ABP/۱۰٪ - ۴۵۲- ABP/۱۰٪ - ۴۵۳- ABP/۱۰٪ - ۴۵۴- ABP/۱۰٪ - ۴۵۵- ABP/۱۰٪ - ۴۵۶- ABP/۱۰٪ - ۴۵۷- ABP/۱۰٪ - ۴۵۸- ABP/۱۰٪ - ۴۵۹- ABP/۱۰٪ - ۴۶۰- ABP/۱۰٪ - ۴۶۱- ABP/۱۰٪ - ۴۶۲- ABP/۱۰٪ - ۴۶۳- ABP/۱۰٪ - ۴۶۴- ABP/۱۰٪ - ۴۶۵- ABP/۱۰٪ - ۴۶۶- ABP/۱۰٪ - ۴۶۷- ABP/۱۰٪ - ۴۶۸- ABP/۱۰٪ - ۴۶۹- ABP/۱۰٪ - ۴۷۰- ABP/۱۰٪ - ۴۷۱- ABP/۱۰٪ - ۴۷۲- ABP/۱۰٪ - ۴۷۳- ABP/۱۰٪ - ۴۷۴- ABP/۱۰٪ - ۴۷۵- ABP/۱۰٪ - ۴۷۶- ABP/۱۰٪ - ۴۷۷- ABP/۱۰٪ - ۴۷۸- ABP/۱۰٪ - ۴۷۹- ABP/۱۰٪ - ۴۸۰- ABP/۱۰٪ - ۴۸۱- ABP/۱۰٪ - ۴۸۲- ABP/۱۰٪ - ۴۸۳- ABP/۱۰٪ - ۴۸۴- ABP/۱۰٪ - ۴۸۵- ABP/۱۰٪ - ۴۸۶- ABP/۱۰٪ - ۴۸۷- ABP/۱۰٪ - ۴۸۸- ABP/۱۰٪ - ۴۸۹- ABP/۱۰٪ - ۴۹۰- ABP/۱۰٪ - ۴۹۱- ABP/۱۰٪ - ۴۹۲- ABP/۱۰٪ - ۴۹۳- ABP/۱۰٪ - ۴۹۴- ABP/۱۰٪ - ۴۹۵- ABP/۱۰٪ - ۴۹۶- ABP/۱۰٪ - ۴۹۷- ABP/۱۰٪ - ۴۹۸- ABP/۱۰٪ - ۴۹۹- ABP/۱۰٪ - ۵۰۰- ABP/۱۰٪ - ۵۰۱- ABP/۱۰٪ - ۵۰۲- ABP/۱۰٪ - ۵۰۳- ABP/۱۰٪ - ۵۰۴- ABP/۱۰٪ - ۵۰۵- ABP/۱۰٪ - ۵۰۶- ABP/۱۰٪ - ۵۰۷- ABP/۱۰٪ - ۵۰۸- ABP/۱۰٪ - ۵۰۹- ABP/۱۰٪ - ۵۱۰- ABP/۱۰٪ - ۵۱۱- ABP/۱۰٪ - ۵۱۲- ABP/۱۰٪ - ۵۱۳- ABP/۱۰٪ - ۵۱۴- ABP/۱۰٪ - ۵۱۵- ABP/۱۰٪ - ۵۱۶- ABP/۱۰٪ - ۵۱۷- ABP/۱۰٪ - ۵۱۸- ABP/۱۰٪ - ۵۱۹- ABP/۱۰٪ - ۵۲۰- ABP/۱۰٪ - ۵۲۱- ABP/۱۰٪ - ۵۲۲- ABP/۱۰٪ - ۵۲۳- ABP/۱۰٪ - ۵۲۴- ABP/۱۰٪ - ۵۲۵- ABP/۱۰٪ - ۵۲۶- ABP/۱۰٪ - ۵۲۷- ABP/۱۰٪ - ۵۲۸- ABP/۱۰٪ - ۵۲۹- ABP/۱۰٪ - ۵۳۰- ABP/۱۰٪ - ۵۳۱- ABP/۱۰٪ - ۵۳۲- ABP/۱۰٪ - ۵۳۳- ABP/۱۰٪ - ۵۳۴- ABP/۱۰٪ - ۵۳۵- ABP/۱۰٪ - ۵۳۶- ABP/۱۰٪ - ۵۳۷- ABP/۱۰٪ - ۵۳۸- ABP/۱۰٪ - ۵۳۹- ABP/۱۰٪ - ۵۴۰- ABP/۱۰٪ - ۵۴۱- ABP/۱۰٪ - ۵۴۲- ABP/۱۰٪ - ۵۴۳- ABP/۱۰٪ - ۵۴۴- ABP/۱۰٪ - ۵۴۵- ABP/۱۰٪ - ۵۴۶- ABP/۱۰٪ - ۵۴۷- ABP/۱۰٪ - ۵۴۸- ABP/۱۰٪ - ۵۴۹- ABP/۱۰٪ - ۵۵۰- ABP/۱۰٪ - ۵۵۱- ABP/۱۰٪ - ۵۵۲- ABP/۱۰٪ - ۵۵۳- ABP/۱۰٪ - ۵۵۴- ABP/۱۰٪ - ۵۵۵- ABP/۱۰٪ - ۵۵۶- ABP/۱۰٪ - ۵۵۷- ABP/۱۰٪ - ۵۵۸- ABP/۱۰٪ - ۵۵۹- ABP/۱۰٪ - ۵۶۰- ABP/۱۰٪ - ۵۶۱- ABP/۱۰٪ - ۵۶۲- ABP/۱۰٪ - ۵۶۳- ABP/۱۰٪ - ۵۶۴- ABP/۱۰٪ - ۵۶۵- ABP/۱۰٪ - ۵۶۶- ABP/۱۰٪ - ۵۶۷- ABP/۱۰٪ - ۵۶۸- ABP/۱۰٪ - ۵۶۹- ABP/۱۰٪ - ۵۷۰- ABP/۱۰٪ - ۵۷۱- ABP/۱۰٪ - ۵۷۲- ABP/۱۰٪ - ۵۷۳- ABP/۱۰٪ - ۵۷۴- ABP/

مقدمه

کشت سلول‌ها در خارج از بدن کاربردهای تحقیقاتی فراوانی دارد. سرم جنین گاو (FCS) برای کشت بسیاری از سلول‌ها ضروری است و مواد افزایش‌دهنده رشد و سیتوکاین‌های مورد نیاز یک کشت موفق را فراهم می‌کند. با درنظر گرفتن مباحث سلامتی و حقوق حیوانات که در تولید FCS مطرح است، ضرورت استفاده از یک ماده جایگزین یا کاهش‌دهنده مصرف FCS احساس می‌گردد(۱). هزینه بسیار بالای تهیه FCS از دیگر عوامل محرك جهت جستجوی جایگزینی مناسب برای آن می‌باشد(۲). زرده تخم مرغ، عصاره پلاکتی انسان، سرم انسان، پلاسمای انسان، مایع داخل چشم گاو، سرم موش، سرم موش صحرایی(رات) و سرم اسب از جمله افزودنی‌های محیط کشت هستند که با FCS مقایسه شده‌اند(۳-۸). از آن‌جا که در کشت سلول‌ها نیاز به مواد افزودنی به محیط کشت با منشا انسانی وجود دارد، بر آن شدیدم تا این مواد را از پلاکت‌های تاریخ گذشته سازمان انتقال خون ایران در حجم‌های نیمه صنعتی تهیه نماییم و اثر آن را بر انواع سلول، مورد مقایسه قرار دهیم تا قابلیت جایگزینی و مقدمات عرضه به بازار را به عنوان یک جایگزین مناسب FCS بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

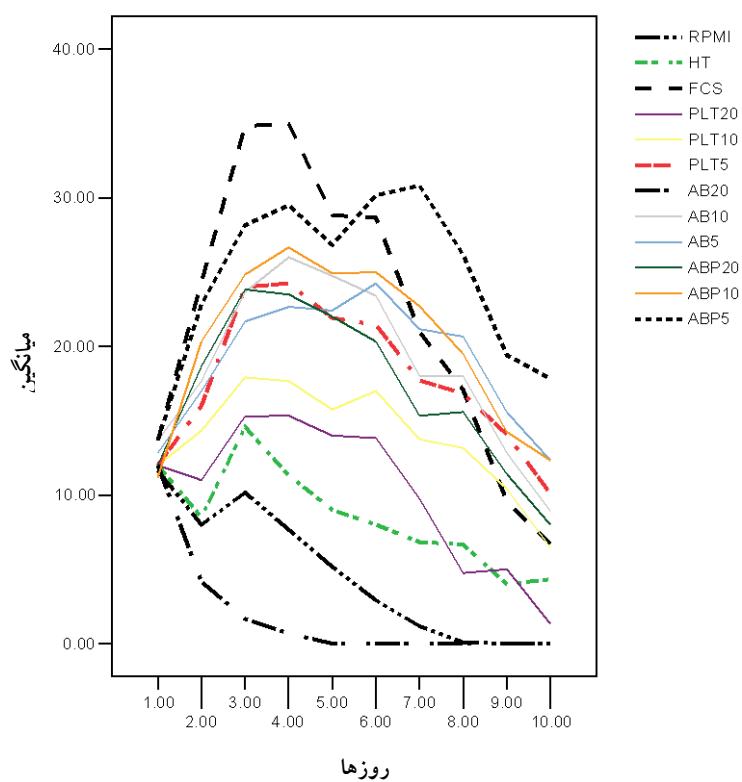
مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود و در مراحل زیر به انجام رسید:

ج- مواد مغذی سلول: از جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه و نیم ساعت در ۵۶ درجه سانتی‌گراد غیر فعال گردید. پلاکت‌های تاریخ گذشته از پایگاه انتقال خون استان تهران تهیه شدند.

د- کشت سلول‌ها و چگونگی بررسی آن‌ها: چهار ماده مغذی سرم AB انسانی (AB)، سرم جنین گاو (FCS)، عصاره پلاکتی انسان (PLT) و مخلوط AB و (ABP)PLT به میزان مساوی جهت رشد سلول‌های هیبریدومای موشی تولید کننده آتنی سرم‌های گروههای خونی A و B مورد ارزیابی قرار گرفتند و با شاخص‌های رشد در محیط پایه RPMI1640 مقایسه شدند. مواد مغذی آزمایش شده با درصددها و ترکیب‌های مختلف شامل سرم جنین گاو (FCS)، سرم AB انسانی (AB)، عصاره پلاکت (PLT) و مخلوط AB و (ABP)PLT، هیپوگرانتین - تیمیدین (HT) به محیط پایه RPMI1640 حاوی ۵۰ میکرومولار ۲- مرکاپتو اتانول، ۲ میلی‌مولار ال - گلوتامین، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) - استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه شدند. میزان هیپوگرانتین ۰/۱ میکرومولار و تیمیدین ۰/۰۱۶ میکرو مولار بود. هیبریدوم‌های مولد آتنی A و آتنی B با سه رقت متوالی چهار برابر در پلیت‌های ۹۶ خانه جهت بررسی میزان پرشدن چاهک و در فلاسکهای ۲۵ و ۷۵ سانتی‌متری جهت ارزیابی تیتر کشت داده شدند. میزان پرشدن چاهک (Confluence) درصدی از سطح هر چاهک است که توسط سلول‌ها پر می‌شود. میزان پرشدن چاهک روزانه با میکروسکوب معکوس مورد ارزیابی قرار گرفت و روز بعد از ریختن سلول‌ها در چاهک به عنوان روز اول در نظر گرفته شد. در پلیت‌های ۹۶ خانه، ۱۰۰ میکرولیتر محیط

جدول شماره ۱: نحوه امتیازدهی چاهک‌ها بر اساس میزان پر شدن سطح آنها

درصد پرشدن چاهک امتیاز	۱۰۰ ۹۰ ۸۰ ۷۰ ۶۰ ۵۰ ۴۰ ۳۰ ۲۰ ۱۰	۱۰۰ ۹۰ ۸۰ ۷۰ ۶۰ ۵۰ ۴۰ ۳۰ ۲۰ ۱۰	قرائت <> از هر یک از اعداد جدول -۵ یا +۵	<<۱۰ <<<۱۰ ۳ ۱
------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--	-------------------



منحنی شماره ۱: نمونه‌ای از منحنی رشد هیبریدوم‌های مولد آنتی A و مولد آنتی B در محیط‌هایی با مواد مغذی RPMI، HT، FCS10%，

ABP5%，ABP10%，ABP20%，AB5%，AB10%，AB20%，PLT5%，PLT10%，PLT20% بر حسب میانگین درصد پر شدن

چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه در هر روز

اول به شرح زیر تعیین شد: در پلیت‌های ۹۶ خانه سه رقت متوالی هیبریدوم مولد آنتی A ریخته شد که اگر شمارش چاهک ۱۴۰۰۰ بود، میزان پر شدن چاهک در حدود ۴۰٪ برابر با ۴۰ امتیاز، اگر شمارش چاهک ۳۵۰۰ بود، میزان پر شدن چاهک در حدود ۱۰٪ برابر با ۱۰ امتیاز و با شمارش ۸۷۵ که میزان پر شدن چاهک در حدود ۵٪ بود ۵ امتیاز در نظر گرفته شد. همچنین در سه رقت متوالی، هیبریدوم مولد آنتی B با شمارش ۹۰۰۰ در هر چاهک که میزان پر شدن چاهک در حدود ۲۰٪ برابر با ۲۰ امتیاز، با شمارش ۲۲۵۰ که میزان پر شدن

اضافه شد. در طول بررسی هیچ تعویض محیطی انجام نگرفت. سلول‌های واجد رنگدانه (پیکتوتیک) مرده قلمداد شدند و میزان امتیاز پر شدن چاهک توسط آنها بر اساس جدول شماره ۱ محاسبه و از امتیاز کل چاهک مربوطه کم شد و منحنی رشد هر سلول در هر چاهک بر اساس امتیاز محاسبه شده در هر روز رسم و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. میزان پر شدن چاهک در هیبریدوم‌های مولد آنتی A و آنتی B، ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت (منحنی شماره ۱).

امتیاز میزان پر شدن چاهک هر سلول در FCS در روز

آنتی‌سرم‌های گروه‌های خونی A و B مورد ارزیابی قرار گرفتند و با شاخص‌های رشد در محیط پایه RPMI ۱۶۴۰ مقایسه شدند.

در آزمون t تک نمونه‌ای از اختلاف میانگین (MD) پرشدن چاهک‌ها در گروه‌های مختلف نسبت به RPMI در صورت معنی‌دار بودن به عنوان معیار رتبه‌بندی اثر رشد استفاده شد.

در کشت هیریدوم‌های مولد آنتی A و آنتی B اختلاف میانگین کلی (MD) میزان پر شدن چاهک‌ها در همه گروه‌های مواد مغذی نسبت به میانگین رشد در ABP RPMI اختلاف معنی‌داری را نشان دادند؛ $\% ۵$ (MD=۱۹/۸۵، p=۰/۰۰۱) بیشترین اختلاف میانگین مثبت (بیشترین اثر رشد مثبت)، (HT MD=۳/۸۴، p=۰/۰۴۹) کمترین اختلاف میانگین مثبت را نشان دادند و $\% ۲۰$ (AB MD=۲/۸۳، p=۰/۰۰۱) دارای اختلاف میانگین منفی معنی‌دار (اثر منفی بر رشد) بود. FCS (MD=۱۷/۲۸، p=۰/۰۰۱) در رتبه دوم و PLT (MD=۵/۵۴، p=۰/۰۰۶) در رتبه نهم قرار داشتند.

در مجموع سه رقت سلولی هیریدوم مولد آنتی A همه گروه‌ها اختلاف میانگین معنی‌دار داشتند به جز PLT٪/۲۰ و HT که اختلاف بی‌معنی بود. ABP٪/۵ (MD=۲۶/۰۱) (p=۰/۰۰۱) بیشترین اختلاف میانگین مثبت و PLT٪/۱۰ (MD=۱۳/۹۲) (p=۰/۰۰۱) کمترین اختلاف معنی‌دار مثبت را داشتند و AB٪/۲۰ (MD=۴/۹۶) (p=۰/۰۰۰۲) اختلاف میانگین منفی معنی‌دار (اثر رشد منفی) نسبت به RPMI داشت و FCS٪/۱۰ (MD=۱۷/۹۸) (p=۰/۰۰۱) در رتبه چهارم قرار گرفت.

در مجموع سه رقت سلولی هیریدوم مولد آنتی B همه گروه‌ها دارای اختلاف میانگین معنی‌دار بودند به جز ۲۰٪/AB (MD=۰/۶۹، p=۰/۰۷۱)؛ در FCS٪/۱۰ (MD=۰/۰۰۱، P=۰/۰۰۱) بیشترین اختلاف میانگین معنی‌دار مثبت و HT٪/۱۰ (MD=۰/۰۱۲) (p=۰/۰۰۰۲) کمترین اختلاف میانگین (کمترین اثر مثبت رشد) را داشتند و AB٪/۱۳/۷ (MD=۰/۰۰۱) در رتبه دوم قرار داشت. اختلاف میانگین تیتر مجموع مقداری آنتی A و آنتی B ایجاد شده توسط هیریدوم‌های مولد این

چاهک در حدود ۱۰٪ بود برابر با ۵ امتیاز و با شمارش ۵۶۰ که میزان پر شدن چاهک در حدود ۲٪ بود ۲ امتیاز تعلق گرفت.

هیریدوم‌های مولد آنتی A و آنتی B در فلاسک‌های ۲۵ و ۷۵ سانتی‌متری (Corning) با رقت ۰/۲×۱۰^۰ سلول در میلی‌لیتر کشت داده شد و با میزان مرگ سلول حدود ۵۰٪ مورد جداسازی مایع رویی قرار گرفت و تیتراسیون و آزمون‌های کترل کیفی بر روی آنها انجام شد.

هـ - نحوه تیتراسیون آنتی‌بادی: تیتراسیون و کترل کیفی آنتی‌بادی‌های گروه‌های خونی کشت شده بر روی غلاظت‌های ۵ و ۱۰ درصد از HT-AB، HT-PLT و ABP به روش لوله‌ای با سوسپانسیون گلوبول‌های قرمز در درصد انجام شد. کترل کیفی شامل واکنش با O-cell در شرایط دمای اتاق، آلبومین در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و کومبس غیر مستقیم همراه با بررسی واکنش آگلوتیناسیون با گلوبول‌های قرمز به دست آمده از کوردهای چهار کیسه خون مجزا برای هر یک از گروه‌های خونی O، A و B بود. جهت تیتراسیون آنتی A از گلوبول‌های قرمز با فنوتیپ A₁, A₂, A₃ و برای آنتی B از گلوبول‌های قرمز با فنوتیپ B استفاده شد. مخلوط چند سری ساخت (پولد) هر یک از آنتی‌سرم‌های A و B محصولات شرکت پالایش و پژوهش خون به عنوان آنتی‌سرم کترل در تمامی آزمایش‌های کترل کیفی یاد شده مورد مقایسه بودند.

و- تجزیه و تحلیل آماری: مقایسه میانگین میزان پر شدن چاهک‌ها و تیتر آنتی A و آنتی B با آزمون t تک نمونه‌ای انجام شد. بررسی میزان اثر مواد مغذی مختلف بر میزان پر شدن چاهک‌ها توسط برازش منحنی رگرسیون چندگانه لگاریتمی صورت گرفت. تعیین اثر محیط‌های مختلف بر مراحل متفاوت منحنی‌های رشد سلول‌ها بر حسب میزان پر شدن چاهک‌ها (تحلیل کیتیک رشد) توسط تحلیل عاملی با نرم‌افزار SPSS ۱۲ انجام شد.

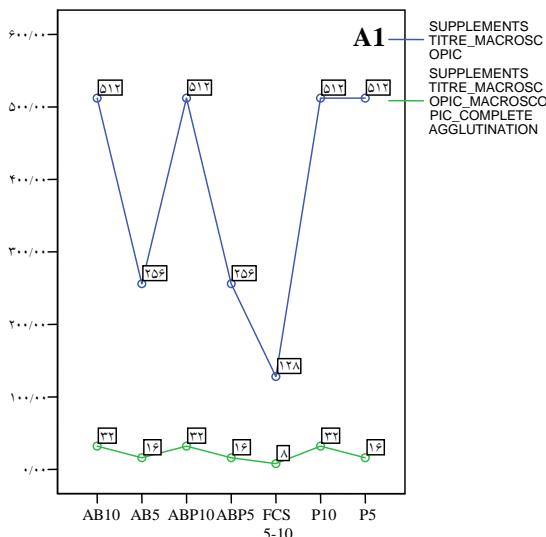
یافته‌ها

چهار ماده مغذی سرم AB انسانی (AB)، سرم جنین گاو (FCS)، عصاره پلاکتی انسان (PLT) و مخلوط AB و (ABP) سلول‌های هیریدوم‌ای موشی تولید کننده

استفاده شد که با نتایج t تک نمونه‌ای و نتایج تحلیل عاملی هم خوانی دارد.

در کشت هیبریدوم‌های مولد آنتی A و آنتی B نتایج کلی رگرسیون به شرح زیر به دست آمد: $A = 5/5$ (sig $t = 0/0001$, $B = 20/67$) بیشترین ضریب تاثیر رشد و $A = 20/24$ ($B = 4/24$) (sig $t = 0/0007$) کمترین ضریب تاثیر رشد را دارا بود و $A = 20/05$ ($B = 20/01$) (sig $t = 0/0001$) در رتبه دوم قرار داشت.

در مجموع سه رقت هیبریدوم مولد آنتی A $A = 5/5$ ($B = 22/53$) (sig $t = 0/0002$) بیشترین ضریب تاثیر رشد و $A = 4/65$ ($B = 20/20$) (sig $t = 0/04$) کمترین ضریب تاثیر رشد



منحنی شماره ۲: نمونه‌ای از منحنی حداکثر تیتر و حداکثر تیتر $+4$ ماکروسکوپی به روش آگلوبولیناسیون در لوله مشاهده شده در مایع روبی هیبریدوم مولد آنتی A با گلوبول قرمز A₂, B₁, A₂, B₁ و هیبریدوم مولد آنتی B با گلوبول‌های قرمز B در محیط‌هایی با مواد مغذی مختلف.

را نشان دادند و $A = 10/21$ ($B = 21/09$) (sig $t = 0/0002$) در رتبه چهارم قرار گرفت.

در مجموع سه رقت هیبریدوم مولد آنتی B $A = 10/15$ ($B = 41/15$) (sig $t = 0/0001$) بیشترین ضریب تاثیر رشد و $A = 20/2$ ($B = 19/2$) (sig $t = 0/052$) کمترین ضریب تاثیر را دارند.

جهت تعیین اثر مواد مغذی مختلف بر مراحل منحنی

آنتی‌بادی‌ها در محیط‌هایی با مواد مغذی مختلف نسبت به تیتر مخلوط چند سری ساخت این آنتی‌بادی‌ها در محیط $A = 10/5$ ($B = 44/94$) با ترتیب نزولی به قرار زیر به دست آمد: $A = 44/18$, $M = 44/94$, $P = 0/010$, $M = 39/75$, $A = 10/10$, $A = 5/5$, $P = 0/042$, $M = 26/94$, $P = 0/032$ و تیتر آنتی-بادی‌های منوکلونال به دست آمده از کشت سلول‌های مولد آنتی A و آنتی B در مواد مغذی مختلف با گلوبول‌های قرمز مربوطه به دو صورت حداکثر آگلوبولیناسیون ماکروسکوپی و حداکثر آگلوبولیناسیون کامل ماکروسکوپی به صورت منحنی مقایسه شده‌اند (منحنی شماره ۲). آنتی A تولید شده در هیچ یک از مواد مغذی با گلوبول‌های قرمز O یا B واکنش نداد. آنتی B تولید شده در هیچ یک از مواد مغذی با گلوبول‌های قرمز O یا A واکنش نداد.

جهت تعیین میزان تاثیر استفاده از مواد مغذی مختلف نسبت به RPMI از روش برآزش منحنی رگرسیون چندگانه لگاریتمی استفاده شد. متغیر مستقل برای هر سلول میزان پر شدن چاهک در محیط RPMI است (Independent Variable) و میزان پر شدن چاهک‌ها با مواد مغذی دیگر به عنوان متغیرهای وابسته برای همان سلول در نظر گرفته شده‌است (Dependent Variables). در روش برآزش منحنی رگرسیون چندگانه لگاریتمی، R² واریانس مشترک متغیر مستقل با متغیرهای وابسته برای هر سلول است؛ بتا به عنوان ضریب تاثیر متغیر مستقل استاندارد شده بر متغیرهای وابسته در نظر گرفته می‌شود و B ضریب تاثیر متغیر مستقل در متغیرهای وابسته است. ضریب بتا قدر مطلق و علامت مثبت یا منفی آن با رتبه‌بندی میزان اثر مواد مغذی که در آزمون t تک نمونه‌ای مشاهده شد، مطابقت ندارد. لذا از آزمون تحلیل عاملی استفاده شد و مشخص گردید که شاخص رشد میزان پرشدن چاهک یک تا سه عامل را شامل می‌شود. در مواقعی که فقط یک عامل در تحلیل عاملی مشاهده شد، R² و بتا جهت تعیین رتبه‌بندی، میزان اثر مورد استفاده قرار گرفتند (که با رتبه‌بندی مشاهده شده در تحلیل عاملی و t تک نمونه‌ای هم خوانی دارد). در موقع مشاهده بیش از یک جزء، از ضریب B جهت تعیین رتبه‌بندی میزان اثر

در رتبه اول، ۵٪ ABP (۰/۲۲۷) در رتبه دوم، ۱۰٪ (۰/۰۷۹) در رتبه دهم و ۲۰٪ AB (۰/۸۷۸) در رتبه دوازدهم یا آخر است؛ ب- در جزء شماره ۱ یا مرگ ۲۰٪ AB (۰/۴۲۵) دارای حداکثر میزان فاز مرگ ۱۰٪ FCS (۰/۷۶۱) در رتبه دوم و ۲۰٪ ABP (۰/۹۸۴) دارای حداقل میزان فاز مرگ است.

در تحلیل عاملی منحنی رشد به دست آمده از مجموع سه رقت هیبریدوم مولد آنتی B سه جزء شناسایی شدند: الف- جزء شماره ۲ یا فاز تکثیر، ب- جزء شماره ۱ یا فاز مرگ و ج- جزء شماره ۳ یا فاز ثبات. الف- در جزء ۲ یا FCS تکثیر ۱۰٪ (۰/۳۱۶) بالاترین رتبه، AB ۵٪ (۰/۷۲۵) RPMI رتبه یازدهم و ۲۰٪ (۰/۲۸۱) رتبه دوم، AB ۸٪ (۰/۸۸۷) رتبه آخر یا دوازدهم را دارا می‌باشند؛ ب- در جزء ۳ یا فاز ثبات، ۱۰٪ PLT (۰/۵۳۰) رتبه اول، ۲۰٪ PLT (۰/۴۵۰) رتبه دوم، ۵٪ PLT (۰/۲۳۰) رتبه سوم، ۱۰٪ FCS (۰/۳۰۴) رتبه دهم، AB ۲۰٪ (۰/۳۱۰) رتبه یازدهم و RPMI ۵٪ (۰/۳۵۵) رتبه دوازدهم را دارند؛ ج- در جزء ۱ یا فاز مرگ ۲۰٪ AB (۰/۱۰۲) رتبه اول، RPMI ۵٪ (۰/۴۸۵) رتبه دوم، ۱۰٪ FCS (۰/۸۴۰) رتبه چهارم، ۵٪ ABP و ۵٪ PLT (۰/۹۵۱) رتبه دهم و ۱۰٪ AB (۰/۹۷۱) رتبه آخر را دارند.

تحلیل عاملی منحنی رشد به دست آمده از رقت اول کشت هیبریدوم مولد آنتی A دو جزء دارد. الف- جزء شماره ۱ یا فاز تکثیر- ثبات که در آن ۱۰٪ (AB/۰/۹۸۷) بالاترین میزان، ۱۰٪ FCS (۰/۹۷۰) در رتبه چهارم و ۲۰٪ AB (۰/۲۷۷) در رتبه آخر جزء تکثیر- ثبات قرار دارند؛ ب- جزء شماره ۲ یا فاز مرگ که در آن ۲۰٪ AB (۰/۹۵۰) در بالاترین میزان، RPMI ۱۰٪ (۰/۳۶۵) و PLT ۱۰٪ (۰/۱۱۲) به ترتیب در رتبه دوم و سوم و ۵٪ PLT (۰/۰۴۳۴) در رتبه آخر این جزء یا کمترین میزان مرگ قرار دارند.

در تحلیل عاملی منحنی رشد به دست آمده از رقت دوم هیبریدوم مولد آنتی A سه جزء مشخص گردید؛ الف- جزء شماره ۳ یا تکثیر که در آن ۱۰٪ FCS (۰/۴۹۱) در رتبه اول، ۱۰٪ AB (۰/۱۰۰) در رتبه دوم، ۲۰٪ AB (۰/۴۲۳) در رتبه یازدهم و ۲۰٪ PLT (۰/۷۷۱)

رشد سلول‌ها بر حسب میزان پر شدن چاهک‌ها، از تحلیل عاملی استفاده شد (تحلیل کیتیک رشد).

در تحلیل عاملی سه جزیی یا سه عاملی، هر جزء نماینده یکی از مراحل منحنی رشد سلول شامل فاز تکثیر، فاز "ثبات" و فاز "مرگ" می‌باشد. در تحلیل عاملی دو جزیی، یک جزء نماینده ترکیب فاز اول و دوم رشد یعنی تکثیر- ثبات و جزء دیگر نماینده فاز مرگ است. فاز Ascending یا تکثیر شبیه منحنی، نماینده مرحله رشد است و هر چه بیشتر باشد سرعت رسیدن به حداکثر رشد بیشتر و زمان آن کوتاه‌تر است و بر عکس فاز Stationary یا ثبات نماینده مدت زمانی است که سلول با رشد حداکثر یا نزدیک به آن در محیط زنده می‌ماند و هر چه این فاز بیشتر باشد این زمان زنده ماندن بیشتر است. فاز Descending یا مرگ، شبیه یا سرعت مرگ سلول‌ها در محیط است و هر چه بیشتر باشد سلول‌ها زودتر می‌میرند. برآیند این سه مرحله سرنوشت یعنی شمارش و مدت زنده‌ماندن سلول در هر محیط کشت را معین می‌سازد. ما از تحلیل عاملی به عنوان شاخص تاثیر مواد غذی مختلف در هر مرحله از رشد (کیتیک رشد) سلول‌های مختلف استفاده نمودیم.

در تحلیل عاملی منحنی‌های رشد (منحنی شماره ۱- میانگین Anti B و Anti A) بر حسب میزان پرشدن چاهک در هر روز) هیبریدوم‌های مولد آنتی A و آنتی B مشاهده می‌شود؛ الف- دو جزء یا عامل (Component) منحنی رشد است که در آن ۵٪ ABP (۰/۲۲۶) در رتبه ۱۰٪ FCS (۰/۸۵۹) دارای کمترین میزان این جزء بودند و ۱۰٪ FCS (۰/۰۷۹) در رتبه ششم قرار گرفت؛ ب- جزء شماره ۱ نماینده فاز مرگ منحنی رشد می‌باشد که ۲۰٪ (AB/۰/۴۴۲) در رتبه اول فاز مرگ، ۱۰٪ FCS (۰/۷۷۷) در رتبه دوم و ۲۰٪ ABP (۰/۹۷۸) کمترین میزان مرگ را نشان دادند.

تحلیل عاملی منحنی رشد به دست آمده از مجموع سه رقت هیبریدوم مولد آنتی A دو جزء را نشان می‌دهد. الف- جزء شماره ۲ یا تکثیر- ثبات که ۵٪ PLT (۰/۰۲۶۸)

(۰/۸۱۶)-) رتبه یازدهم و ۱۰٪ (PLT ۰/۸۳۳)-) رتبه دوازدهم را دارند؛ ب- جزء شماره ۳ یا ثبات که در آن ۵٪ PLT (۰/۵۲۰)-) رتبه اول، ۱۰٪ (PLT ۰/۴۲۰)-) رتبه دوم، ۱۰٪ FCS (۰/۲۷۹)-) رتبه ششم، HT (۰/۱۴۲)-) رتبه یازدهم و ۲۰٪ AB (۰/۱۲۷)-) رتبه دوازدهم را دارند؛ ج- جزء شماره ۲ یا مرگ که در آن ۲۰٪ AB (۰/۸۳۱)-) رتبه اول، ۱۰٪ RPMI (۰/۶۱۲)-) رتبه دوم، ۱۰٪ FCS رتبه هشتم، ۱۰٪ PLT (۰/۳۱۳)-) رتبه یازدهم و ۵٪ PLT (۰/۶۱۰)-) رتبه دوازدهم را دارند.

هم چنین در تحلیل عاملی منحنی رشد رقت سوم هیبریدوم مولد آنتی B دو جزء یافت شد؛ الف- جزء شماره ۱ یا تکثیر- ثبات که در آن ۵٪ ABP (۰/۸۸۸)-) رتبه اول، ۵٪ (AB ۰/۸۳۳)-) رتبه دوم، ۱۰٪ FCS (۰/۶۶۳)-) رتبه پنجم، ۱۰٪ PLT/۲۰ و ۵٪ PLT/۹۳۵)-) رتبه آخر را دارند؛ ب- جزء شماره ۲ یا مرگ که در آن ۲۰٪ ABP (۰/۶۵۲)-) رتبه اول، ۲۰٪ PLT (۰/۲۹۰)-) رتبه ماقبل آخر و ۵٪ PLT (۰/۲۲۵)-) ABP (۰/۲۲۵)-) رتبه آخر را دارا می‌باشد.

بحث

گوارش‌های موجود مبنی بر وجود مواد مغذی رشد در پلاکت‌ها و سرم عنوان می‌دارند که آسیب به سلول‌های اندوتیلیال عروق خونی باعث تجمع و اتصال پلاکت‌ها در محل و آزاد کردن میتوژن‌هایی می‌گردد که همراه با عوامل رشد پلاسمایی باعث تکثیر سلول‌ها و ترمیم آسیب می‌شود^(۹). سرم تهیه شده از پلاسمای میزان کم پلاکت (Platelet Poor Plasma) اثر میتوژنی بسیار کمی نسبت به عصاره پلاکتی با سرم تهیه شده از پلاسمای غنی از پلاکت یا سرم معمولی دارد و به نظر می‌رسد که کلسیم محیط نیز عامل تکثیر نمی‌باشد چون عوامل تکثیر منشا پلاکتی دارند^(۱۱-۹). عصاره پلاکتی حاوی مواد زیر می‌باشد: ۱- مواد کاتیونی رشد مشتق از پلاکت (۷۰۰ Da) مقاوم به اسید و حرارت با اثر رشد بر اندوتیلیوم خوک، ۲- مواد آنیونی شبیه عوامل رشد ترانسفورمه کننده TGFs (transforming growth factors) (۱۴KDa) که با گیرنده رقابت نمی‌کنند ولی باعث ایجاد کلونی در آگار نرم TGFs

در رتبه دوازدهم یا آخر می‌باشد؛ ب- جزء شماره ۲ یا فاز ثبات که در آن ۵٪ PLT (۰/۴۳۸)-) دارای رتبه اول، ۵٪ ABP (۰/۲۳۳)-) رتبه دوم، ۲۰٪ ABP رتبه یازدهم و ۱۰٪ FCS (۰/۸۳۹)-) رتبه دوازدهم یا آخر می‌باشد؛ ج- جزء شماره ۱ یا فاز مرگ که در آن HT (۰/۸۲۳)-) رتبه اول، ۲۰٪ (RPMI ۰/۷۹۵)-) رتبه دوم، ۲۰٪ AB (۰/۷۷۹)-) رتبه سوم، ۱۰٪ FCS (۰/۱۶۲)-) رتبه چهارم، ۵٪ ABP (۰/۸۹۰)-) رتبه یازدهم و ۱۰٪ PLT رتبه دوازدهم را دارا می‌باشد. تحلیل عاملی رقت سوم هیبریدوم مولد آنتی A سه جزء را نشان می‌دهد الف- جزء شماره ۳ یا فاز تکثیر که در آن ۱۰٪ FCS (۰/۵۷۹)-) رتبه اول و ۵٪ ABP (۰/۴۶۳)-) رتبه آخر را دارا می‌باشد؛ ب- در جزء شماره ۲ یا فاز ثبات (۰/۸۵۳)-) PLT (۰/۸۹۸)-) در رتبه اول و ۱۰٪ (۰/۵۲۳)-) FCS در رتبه دوم است، ۱۰٪ (۰/۵۸۲)-) PLT در رتبه آخر قرار دارند؛ ج- جزء شماره ۱ یا مرگ که در آن HT (۰/۸۹۷)-) و ۲۰٪ AB (۰/۸۵۶)-) به ترتیب در رتبه اول و دوم قرار دارند، ۱۰٪ (۰/۹۴۸)-) AB در رتبه هفتم و ۵٪ (۰/۶۰۱)-) FCS در رتبه دوازدهم یا آخر هستند.

تحلیل عاملی منحنی رشد رقت اول هیبریدوم مولد آنتی B نیز سه جزء را نشان می‌دهد؛ الف- جزء شماره ۱ یا تکثیر که در آن ۵٪ AB (۰/۹۸۰)-) در رتبه اول، ۵٪ ABP (۰/۹۵۹)-) در رتبه دوم، ۱۰٪ FCS (۰/۹۴۲)-) در رتبه چهارم، ۲۰٪ (۰/۳۶۶)-) AB در رتبه یازدهم و ۲۰٪ (۰/۰۶۲)-) RPMI رتبه دوازدهم قرار دارند؛ ب- جزء شماره ۲ یا ثبات که ۱۰٪ (۰/۷۷۳)-) PLT (۰/۷۲۰)-) رتبه اول، ۲۰٪ (۰/۰۶۳۹)-) AB در رتبه ششم، ۱۰٪ (۰/۱۴۶)-) FCS رتبه یازدهم و ۲۰٪ (۰/۸۶۵)-) RPMI رتبه دوازدهم را دارند؛ ج- جزء شماره ۳ یا مرگ که در آن ۲۰٪ AB (۰/۶۳۲)-) رتبه اول، ۱۰٪ (۰/۴۶۲)-) PLT (۰/۰۴۹)-) FCS در رتبه دوم، ۱۰٪ (۰/۵۱۲)-) AB در رتبه دوازدهم را دارا می‌باشد.

در تحلیل عاملی منحنی رشد رقت دوم هیبریدوم مولد آنتی B سه جزء رقت یافت شد؛ الف- جزء شماره ۱ یا تکثیر که در آن ۲۰٪ AB (۰/۹۴۸)-) رتبه اول، ۵٪ AB (۰/۹۴۳)-) FCS در رتبه دوم، ۱۰٪ (۰/۹۳۷)-) FCS رتبه سوم، HT

عوامل رشد پلاکتی در غلظت‌های بالا باعث مهار رشد سلول‌ها می‌گرددند چنان‌که مقادیر بالای PDGF باعث مهار رشد سلول‌های پیش‌ساز خونی تحریک شده با اریتروپویتین می‌شوند ولی مقادیر پایین‌تر اثر مطلوب اریتروپویتین را تشخیص نمی‌کنند. این اثر مهاری بر سلول‌های اندوتیال خوب با حرارت رفع شد (۲۶، ۹). اثر مهاری گزارش شده در مقادیر بالای عصاره پلاکتی در نتایج ما نیز مشهود است چنان‌که ۲۰٪ PLT باعث مهار رشد انواع سلول‌های مورد آزمایش شد. ولی اثر مهاری سرم AB در غلظت‌های ۲۰٪ که حتی نسبت به RPMI تکثیر را مهار می‌کند می‌تواند تا حدودی به این علت باشد که این سرم‌ها از پلاسمای مجاور با پلاکت‌های تاریخ گذشته به دست آمده‌اند و در طول مجاورت با پلاکت‌ها به علت تخلیه گرانول‌های پلاکتی میزان میتوزن آن‌ها بیشتر از سرم AB معمولی است و در واقع سرم AB غنی از عصاره پلاکتی می‌باشد. ما عصاره پلاکتی را با حرارت غیر فعال نگردیم اما سرم AB را برای غیر فعال کردن کمپلمان حرارت دادیم که با گزارش غیر فعال نمودن اثر مهاری پلاکت‌ها با حرارت مطابقت ندارد. لذا ممکن است سرم در غلظت‌های بالا، مواد مهاری مقاوم به حرارت یا فعال شده در اثر حرارت داشته باشد. در نتایج به دست آمده، غلظت‌های پایین مخلوط عصاره پلاکتی با سرم AB در حد FCS یا بهتر و از عصاره پلاکتی یا سرم AB به تنها بیشتر است که شاید به علت حضور مکمل انواع عوامل رشد پلاکتی حساس به حرارت باشد که در حین غیر فعال کردن سرم AB از بین رفته‌اند اما با اضافه کردن عصاره پلاکتی که با حرارت غیر فعال نشده است جایگزین می‌گردند (۲۴).

همچنین مشاهده شد که هیپوگزانین - تیمیدین به ویژه بر روی سلول‌های هیبریدومایی اثر تکثیری نسبت به RPMI دارد که می‌تواند در تفسیر نتایج در مطالعات مشابه مدنظر باشد.

در تحلیل عاملی کیتیک رشد سلول‌ها مشخص شد که عصاره پلاکتی، سرم AB انسانی یا مخلوط این دو باعث افزایش فاز ثبات و کاهش فاز مرگ می‌شوند که با اثر ضد آپوپتوزی گزارش شده مطابقت دارد. از طرفی مشاهده

توسط سلول‌های رات NRK و غیر ترانسفورمه موش -۲B ARK می‌گرددند، ۳- عوامل رشد کاتیونی مشتق از پلاکت (PDGF) (platelet derived growth factor) (۳۲-۳۶KDa) با اثر رشد بر سلول‌های گلیال و فیروblast دیپلوبید انسان، عضله صاف، فیروblast موش $3T^3$ و ۴- TGFB هم چنین می‌توان از انسولین و عوامل رشد پلاکتی در محیط‌های فاقد سرم به عنوان عوامل رشد استفاده کرد. تعدادی از عوامل رشد سرمی شامل انسولین، عوامل رشد شبه انسولینی، عامل رشد اپیتلیالی، عوامل رشد پلاکتی، ترانسفیرین و سوماتومدین C می‌باشند (۱۹-۲۱).

به طور کلی نتایج ما نشان می‌دهد FCS دارای بیشترین اثر در شبکه تکثیر و شبکه مرگ و کمترین اثر در مرحله ثبات منحنی رشد سلول‌ها است. لذا جهت تکثیر سلول‌ها در شمارش پایین مناسب به نظر می‌رسد. سرم AB، عصاره پلاکتی و مخلوط این دو در مقادیر مناسب دارای شبکه پلاکتی و شبکه مرگ مناسب به نظر می‌رسد. سلول شدن مرحله ثبات و کاهش شبکه مرگ منحنی رشد سلول‌ها می‌گرددند (این مواد در غلظت‌های بالا باعث مرگ سلول‌ها می‌شوند). بنابراین ممکن است جهت کشت سلول در سیستم‌های ممتد کشت که مدت زمان زنده‌بودن و تعداد سلول‌های زنده اهمیت بیشتری دارند مناسب باشند.

یافته‌های ما نشان می‌دهد که عصاره پلاکتی، سرم AB انسانی و مخلوط این دو توانایی جایگزینی کامل یا نسبی FCS را برای دودمان‌های هیبریدومایی موش دارند (اثر این مواد جایگزین FCS بر شش رده سلولی دیگر توسط مؤلفان این مقاله بررسی شده است - یافته‌های چاپ نشده). نتایج مشابه و تایید کننده نتایج این تحقیق توسط سایر محققین نیز گزارش شده است از جمله: عوامل رشد پلاکتی باعث تکثیر سلول‌های شبکه استیوبلاستی جنین انسان، کندروسیت‌های مفصل گاو، افزایش ایجاد کلونی سلول‌های توموری سینه انسان و تومورهای اپیتلیالی و مژودرمی انسان، تکثیر (فاکتور رشد پلاکتی حساس به حرارت) سلول‌های ترانسفورمه $3T^3$ با ویروس سیمین (Simian) می‌گرددند (۲۰-۲۴). هیبریدوم WuT 3 که علیه لنفوسيت T آنتی‌بادی ترشح می‌کند، در RPMI ۱۶۴۰ همراه با ۱٪ سرم انسانی کشت شده است (۲۵).

سلول‌ها با محیط جدید توسط مخلوط نمودن مقادیر FCS با مواد مغذی عنوان شده صورت گرفته است. لذا ممکن است نتایج بهتری با انجام سازگاری سلول‌ها به دست آید. در مطالعات مشابه کمتر به وضعیت سلول در فاز ثبات یا مرگ و اثر مواد مغذی بر این مراحل توجه شده است چرا که اغلب بر مبنای میزان برداشت تیمیدین نشاندار در فاز تکثیر لگاریتمی انجام شده‌اند (۱۳).

مطالعه ما روش ساده در حجم کم محیط کشت و تعداد پایین سلول بدون تعویض محیط بود. الگوی تحلیل عاملی برای بررسی اثر مواد مختلف در کیتیک و مراحل رشد سلول‌ها به عنوان یک مدل ریاضی پیشنهاد می‌گردد. از آنجا که در حدود ۱۰٪ از پلاکت‌های تهیه شده برای مصارف بالینی، تاریخ گذشته می‌شوند در سازمان انتقال خون امکان استفاده از این منبع برای تولید مواد مغذی کشت سلول موجود می‌باشد (۳۱).

نتیجه‌گیری

فن تهیه FCS و مواد جایگزین آن در شرکت پالایش و پژوهش خون با موفقیت به انجام رسیده است لذا می‌توان از آن در تهیه این مواد به عنوان محصول صنعتی استفاده نمود.

به طور کلی FCS دارای بیشترین اثر در شبکه تکثیر و مرگ و کمترین اثر در مرحله ثبات منحنی رشد سلول‌ها است لذا جهت تکثیر سلول‌ها در شمارش پایین مناسب به نظر می‌رسد. سرم AB، عصاره پلاکتی و مخلوط این دو در مقادیر مناسب دارای شبکه تکثیر نسبت به FCS بوده و باعث طولانی شدن مرحله ثبات و کاهش شبکه مرگ می‌گردد (این مواد در غلظت‌های بالا باعث مرگ سلول‌ها می‌شوند). بنابراین ممکن است جهت کشت سلول در سیستم‌های ممتد کشت مناسب باشند.

تحلیل عاملی منحنی‌های رشد می‌تواند به عنوان الگوی بررسی کیتیک رشد سلول‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندهای مقاله از آقایان محمدرضا غلامنیایی فومنی، دکتر محسن منشی، محمد تعبدی و خانم‌ها مینا

می‌شود که FCS اثر شدیدی بر رشد سلول در فاز تکثیر دارد اما دارای فاز ثبات کوتاه و فاز مرگ سریع است که با گزارش کاهش بقای سلول در FCS نسبت به محیط حاوی مواد مشتق از شیر (Whey) مطابقت دارد و نشان می‌دهد FCS برای کشت تعداد پایین سلول مانند کلون نمودن مناسب است (چنان‌که مطالعه ما نشان می‌دهد).

نتایج قابل توجه تیتراسیون آنتی A و آنتی B به دست آمده در عصاره پلاکتی و سرم AB و مخلوط این دو نسبت به FCS ممکن است با نتایج افزایش میزان بقای این سلول‌ها در این مواد تا حدودی قابل توضیح باشد. گزارش‌ها بیان می‌دارند که تکثیر هیبریدومای موشی در مواد مشتق از شیر مانند FCS است اما میزان بقا (viability) در مواد مشتق از شیر بیشتر از FCS می‌باشد. میزان تولید آنتی‌بادی در مواد مشتق از شیر ۲۰٪ بیشتر از FCS است (۲۷). فاکتورهای رشد مشتق از پلاکت دارای ویژگی ضد آپوپتوزی بر روی سلول‌های دیسک بین مهره‌های انسان در خارج بدن می‌باشند (۲۸).

به نظر می‌رسد حفظ بقای سلول مهم‌تر از سرعت رشد آن جهت تولید آنتی‌بادی است (۲۹).

از آنجا که عصاره پلاکتی، سرم AB یا مخلوط این دو میزان بقای سلول را با افزایش فاز ثبات و کاهش فاز مرگ بالا می‌برند شاید برای تولید محصول بیشتر، آنتی‌بادی‌های منوکلونال در سیستم‌های کشت ممتد سلول مناسب‌تر باشند. نتایج ما نشان می‌دهد عصاره پلاکتی می‌تواند در محیط بدون سرم مورد استفاده قرار گیرد. اما باید سلول مدت بیشتری با آن کشت شود تا تغییرات احتمالی کترول شوند (نتایج تیتراسیون آنتی A و آنتی B).

در بحث جایگزینی FCS باید مراقب بود چرا که افزایش زمان تقسیم، کاهش کارآیی کشت و افزایش حجم سلول دیپلوبلاست انسان در کشت با سرم نوزاد گاو (newborn bovine calf)، سرم گوساله (bovine) و سرم اسب اختلالاتی هستند که در جایگزینی سرم جنین گاو در گاو ایجاد شده‌اند. لذا در جایگزینی سرم جنین گاو در موقع کمبود یا گرانی جهت کشت فیربلاست انسان باید توجه بیشتری نمود (۳۰).

باید توجه داشت که این مطالعه بدون انجام سازگاری

تهران قدردانی می‌نمایند.

садات الداغی و مروارید اخوان، همکاران شرکت پالایش و پژوهش خون و خانم افتخاری در پایگاه انتقال خون

References :

- 1- 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): 815-31.
- 2- 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): 23-7.
- 3- Clemmons DR, Isley WL, Brown MT. Dialyzable factor in human serum of platelet origin stimulates endothelial cell replication and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983; 80(6):1641-5.
- 4- 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): 377-83.
- 5- 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.
- 6- 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): 21-6.
- 7- Reisser D, Fady C, Pelletier H, Lagadec P, Jeannin JF, Olsson N.O. Comparative effect of rat and fetal calf serum on measurement of the natural tumoricidal activity of rat lymphocytes, macrophages and polymorphonuclear cells. *Cancer Immunol. Immunother* 1989; 28(1): 34-6.
- 8- 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): 445-50.
- 9- Clemmons DR, Isley WI, Brown MT, Clemmons DR, Isley WI, Brown MT. Dialyzable factor in human serum of platelet origin stimulates endothelial cell replication and growth . *Proc. NatL. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 1641-1645.
- 10- Childs CB, Proper JA, Tucker RF, Moses HL. Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. *Proc. NatL. Acad. Sci. USA* 1982; 79: 5312-5316.
- 11- Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A Platelet-Dependent, Serum Factor That Stimulates the Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells In Vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1974;71(4): 1207-1210.
- 12- 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: 1206-1214.
- 13- Owen III AJ, Geyer RP, Antonides HN. Human platelet-derived growth factor stimulates amino acid transport and protein synthesis by human diploid fibroblasts in plasma-free media. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982; 79: 3203-3207.
- 14- Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int. J. Periodontics Restorative Dent* 2002; 22(6): 547-57.
- 15- Morris AE, Schmid J. Effects of insulin and LongR(3) on serum-free Chinese hamster ovary cell cultures expressing two recombinant proteins. *Biotechnol. Prog* 2000; 16(5): 693-7.
- 16- Wang XF, Cynader MS. Effects of astrocytes on neuronal attachment and survival shown in a serum-free co-culture system. *Brain Res. Brain Res. Protoc* 1999; 4(2): 209-16.
- 17- Liu C, Chu I, Hwang S. Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for CHO cells. *Enzyme Microb. Technol* 2001; 28(4-5): 314-321.
- 18- Denholm IA, Moule AJ, Bartold PM. The behaviour and proliferation of human dental pulp cell strains in Denholm IA, Moule AJ, Bartold PM. The behaviour and proliferation of human dental pulp cell strains in vitro, and their response to the application of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-1. *Int. Endod. J* 1998; 31(4): 251-8.
- 19- Sanders DA, Fiddes I, Thompson DM, Philpott MP, Westgate GE, Kealey T. In the absence of streptomycin, minoxidil potentiates the mitogenic effects of fetal calf serum, insulin-like growth factor 1, and platelet - derived growth factor on NIH 3T3 fibroblasts in a K⁺ channel-dependent fashion. *J. Invest. Dermatol* 1996; 107(2): 229-34.
- 20- Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J. Orthop. Res* 1995; 13(5): 655-63.
- 21- Kaps C, Loch A, Haisch A, Smolian H, Burnester GR, Haupl T, Sittinger M. Human platelet supernatant promotes proliferation but not differentiation of articular chondrocytes. *Med. Biol. Eng. Comput* 2002; 40(4): 485-90.
- 22- Cowan DH, Graham J, Paskevich MC, Quinn PG. Influence of platelet lysate on colony formation of

- human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat* 1983; 3(2): 171-8.
- 23- Cowan DH, Graham J. Stimulation of human tumor colony formation by platelet lysate. *J. Lab. Clin. Med* 1983; 102(6): 973-86.
- 24- Kepner N, Lipton A. A mitogenic factor for transformed fibroblasts from human platelets. *Cancer Res* 1981; 41(2): 430-2.
- 25- Zhang Y, Zhou Y, Yu J. Effects of peptone on hybridoma growth and monoclonal antibody formation. *Cytotechnology* 1994; 16(3): 147-50.
- 26- Blagosklonnyi MV, Zaritskii. [Thermolabile inhibiting proliferation of connective tissue cell activity from platelets]. *Tsitologiia* 1989; 31(4): 499-502.
- 27- Legrand C, Capiaumont J, Belleville F, Nabet P. Comparison of metabolism of hybridoma cells cultured in media supplemented with whey or fetal calf serum. *Biotechnol. Prog* 1993;9(6): 573-9.
- 28- Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN. Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. *Spine* 2000; 25(17): 2153-7.
- 29- Velez D, Reuveny S, Miller L, Macmillan JD. Kinetics of monoclonal antibody production in low serum growth medium. *J. Immunol. Methods* 1986 ; 86 (1): 45-52.
- 30- Zamansky GB, Arundel C , Nagasawa H , Little JB . daptation of human diploid fibroblasts in vitro toserum from different sources. *J. Cell. Sci* 1983; 61: 289-97.
- 31- 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): 23-7.

Preparation of fetal calf serum alternatives and their effects on growth and secretion of hybridoma cell lines

Golestan R.^{1,2,3}(DMT), Moazzeni S. M.^{1,2,3}(PhD), Puorfathollah A.A.^{1,3}(PhD), Hamidpour L.²(MS), Sharafi M.²(DMT), Attarchi Z.⁴(MD), Hadji-Beygi B.⁴(MD), Tavasoli F.²(BS), Esmaili J.⁴(BS), Reyvandi S.²(MS)

¹ Tarbiat Modares University, Immunology Department

² Iranian Blood Research & Fractionation Company

³ Iranian Blood Transfusion Organization – Research Center

⁴ Tehran Regional Educational Blood Transfusion Center

Abstract

Background and Objectives

Providing fetal calf serum (FCS) alternatives as cell culture supplements is an important field of research to compensate for the FCS supply shortage. This study focused on preparation of fetal calf serum alternatives and their effects on growth and secretion of hybridoma cell lines.

Materials and Methods

Outdated human platelet units undergo extraction for its growth factors to be obtained. Human AB blood group plasma was also converted to serum and its growth effect was compared to FCS, hypoxanthine-thymidine (HT) and RPMI1640 as cell culture media and supplement. Cell growth indices were preliminary counting of cells, confluence as surface area of plates filled with cells, and titration of monoclonal anti-A and anti-B blood group antibodies collected from cultured mouse hybridoma cells. Statistical analysis including one sample t-test, logarithmic multiple regression curve fit, and factor analysis was done by SPSS v12 software.

Results

The four nutritional supplements of (1) human serum AB (AB), (2) human platelet extract (PLT), (3) equal mixture of AB & PLT (ABP), and (4) fetal calf serum as cell culture were examined on mouse hybridoma anti-A and anti-B monoclonal antibody producer cell lines for cell growth indices and compared with the same indices on RPMI1640 media. The growth-stimulating effects in descending order of values were (1) ABP5%, (2) FCS10%, (3) ABP10%, (4) AB5%, (5) AB10%, (6) PLT5%, (7) ABP20%, (8) PLT10%, (9) PLT20%, and (10) HT; but AB20% inhibited growth of mentioned hybridoma cell lines. The titer of anti-A and anti-B monoclonal antibodies produced by cultured hybridoma on 5 and 10 percent concentration of AB, PLT and ABP compared to FCS5-10% at descending order were (1) PLT5%, (2) PLT10%, ABP5%, ABP10%, AB10%, and (3) AB5%.

Conclusions

In general FCS had the following effects on curves of cell growth: (1) the highest increase on slope of multiplication (ascending) phase, (2) the highest increase on slope of death (descending) phase, and (3) the lowest duration of stationary phase. Then, FCS can be appropriate for growth of cells at initial low cell count. Human serum AB, human platelet extract, and equal mixture of both at optimum concentrations (these supplements at high concentrations killed cells) compared to FCS showed (1) decreased slope of multiplication phase, (2) decreased slope of death phase, and (3) increased duration of stationary phase. Thus, AB and PLT may be suitable for continuous cell culture systems in which cell survival during longer times is required. Factor analysis was introduced as a model to evaluate kinetics of cell growth at different supplements.

Key words: Human serum, Cell culture, Growth kinetic, Blood groups, Factor analysis

SJIBTO 2006; 3(3): 221-232

Received: 26 Sep 2005

Accepted: 26 Apr 2006

Correspondence: Moazzeni S.M., PhD of Immunology, Tarbiat Modares University. P.O.Box: 14155-111, Tehran, Iran. Tel: (09821)88011001; Fax: (09821)88013030
E-mail: Moazzeni@dr.com