دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وچهارم–شماره ۱۳۰
شهریور ۱۳۹۶

سلول‌های IgM^+CD5^+ در مدل موشی سرطان با ردهٔ سلولی BCL1

نویسندگان: محسن عبدالملکی[۱]، مریم خیراندیش[۲]، عبدالفتاح صراف‌نژاد[۳]، رضا صداقت[٤]، نریمان مصفا[٥]، رویا یارائی[٦*]

۱. دانش آموختهٔ کارشناسی‌ارشد ایمنی‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
۲. مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، موسسهٔ عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران، تهران، ایران.
۳. استاد گروه ایمونولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی تهران، تهران، ایران.
٤. استادیار گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
٥. استاد گروه ایمونولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران.
٦. گروه ایمنی‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: رویا یارائی
E-mail: ryaraee@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۰۷
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۰۵/۲۱
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۸

چکیده

مقدمه و هدف: استفاده از مدل‌های حیوانی برای توسعهٔ درمان‌های جدید به‌ویژه در بیماری‌های مهمی مثل سرطان‌ها امری مهم و ضروری‌است. در این مطالعه ایجاد سرطان (لوسمی) با تزریق وریدی سلول سرطانی و بررسی مارکرهای سلولی در طحال و خون حیوان پیگیری شده است.

مواد و روش‌ها: تعداد پنج میلیون سلول BCL-1 به ورید دمی موش‌های هم‌نژاد BALB/c تزریق شد. پنج موش بعد از دو هفته و پنج موش دیگر چهار هفته بعد کشته شدند و تغییرات ایندکس طحال، سلول‌های خون محیطی و تغییرات بافتی در آن‌ها بررسی شد. سلول‌های طحال و خون با استفاده از مارکرهای IgM و CD5 در فلوسیتومتری از نظر حضور سلول‌های سرطانی بررسی شدند.

نتایج: ایندکس وزنی و نسبت سطح طحال در موش‌های تزریق‌شده افزایش معنادار از نظر آماری داشت ($p<0/05$)، بالاترین افزایش سطح در گروه چهار هفته‌ای دیده شد (حدود ۱.۵ برابر کنترل). نسبت لنفوسیت به نوتروفیل در لام خون محیطی از ۴.۹ به ۸.۸ رسید ($p<0/05$). درصد سلول‌های IgM^+CD5^+ در طحال موش‌ها از حدود ۲.۵درصد در گروه کنترل به ۱۴درصد در گروه دو هفته و ۳۲درصد در گروه چهار هفته رسید. این سلول‌ها در خون نیز از حدود ۲درصد به ۸.۸درصد افزایش یافتند. در بررسی هیستولوژیک طحال، گسترش پالپ سفید مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در روش فوق، سلول‌های سرطانی در حیوان مستقرشده گسترش می‌یابند. تغییرات ابعاد طحال، نسبت لنفوسیت به نوتروفیل خون و درصد سلول‌های IgM^+CD5^+ می‌توانند برای پیگیری وضعیت استقرار سلول‌های سرطانی در حیوان مورداستفاده قرار گیرند و شاخصی برای تحقیقات درمورد روش‌های درمانی جدید باشند.

واژگان کلیدی: سرطان، مدل حیوانی، BCL-1 ، طحال، لکوسیت‌های خون، IgM، CD5.

مقدمه

لنفوم جزء پنج سرطان با بیشترین شیوع در ایران است (۱) و بنابر گزارش سال ۲۰۱۰ در تهران در هر صدهزار نفر حدود ٦ تا ۸ مورد لوسمی و ۵ تا ۷ مورد لنفوم (غیرهوچکینی) گزارش شده است (۲، ۳) که درمورد کودکان شیوع بیشتری نیز دارد (٤). از روش‌های مختلفی برای درمان لوسمی‌ها و لنفوم‌ها استفاده می‌شود که درمان‌های رایج‌تر در حال حاضر، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی می‌باشد (۵). این روش‌ها در کنار مزیت‌هایی که دارند، اثرات جانبی زیادی نیز بر بیمار خواهند داشت (٦). بنابراین نیاز به درمان‌های جدید با اثربخشی بهتر و اثرات جانبی کمتر کاملاً محسوس است. در بررسی اثربخشی و عوارض جانبی داروها و همچنین سیر بیماری و پاسخ‌های سیستم ایمنی، مدل‌های حیوانی هر بیماری نقش بسیار مهمی دارند (۷). ایجاد مدل بیماری‌های سرطانی از روش‌های بسیار مهم و رایج در مطالعه این بیماری‌ها در سراسر دنیا است. در کشور ما نیز مدل‌های سرطانی بسیار ارزشمندی ایجاد شده است که عمدتاً مربوط به ایجاد تودهٔ توموری مثل سارکوما و... هستند (۸–۱۰)؛ ولی تا کنون گزارشی حاکی از ایجاد مدل حیوان آزمایشگاهی برای بررسی داروهای جدید در سرطان‌های خونی مشاهده نشده است و در مطالعات خارج از کشور نیز هر چند از این مدل استفاده شده است (۱۱–۱۳)؛ ولی پیگیری سلول‌های اصلی به روش فلوسایتومتری در آن بررسی نشده است.

ردهٔ سلولی BCL-1 (B-cell lymphoma) اولین بار از یک موش BALB/c که به‌صورت خودبه‌خودی به لنفوم سلول B دچار شده بود، جدا شد. از آنجا که اکثر لنفوم‌های انسانی از لنفوسیت‌های B منشأ می‌گیرند؛ بنابراین سلول‌های BCL-1 ردهٔ نسبتاً مناسبی برای شبیه‌سازی لنفوم‌های انسانی می‌باشند (تقریبا معادل لوسمی لنفوئیدی مزمن در انسان) (١٤–١۵). منشأ این سلول‌ها لنفوسیت‌های B-1 هستند (١٦–١٧) که تولیدکنندهٔ آنتی‌بادی‌های طبیعی در بدن (١٨–١٩) می‌باشند. سلول‌های B-1 زیرمجموعه‌هایی از لنفوسیت‌های B هستند که در حفرهٔ صفاق، جنب و لامینا پروپریا به‌وفور یافت می‌شوند؛ ولی درصد کمی از سلول‌های B طحال و خون محیطی را شامل می‌شوند. دارای قدرت خودتجدیدشوندگی بوده و حدودا نیمی از IgM و IgA سرم و مقدار قابل‌توجهی از IgG سرم توسط این سلول‌ها تولید می‌شود (۲۰–۲۱). مارکرهای سطحی مهم ردهٔ سلولی BCL1 شامل IgM، IL-5R، CD5 است (۲۲–۲۳). با توجه به اهمیت دو مارکر IgM و CD5 که در مطالعات مختلف مورداستفاده قرار گرفته‌اند (۲٤–۲٦)، می‌توان از این دو آنتی‌ژن برای تعقیب سلول‌های سرطانی استفاده کرد.

در مطالعهٔ حاضر سلول‌های طحال و خون محیطی موش BALB/c، دو و چهار هفته پس از تزریق سلول‌های BCL1 با مارکرهای CD5 و IgM توسط فلوسیتومتری موردارزیابی قرار گرفته‌اند (علاوه بر بررسی‌های دیگر) تا از طرفی تثبیت سلول‌ها در حیوان موردتائید قرار گیرد و از طرف دیگر، حضور این سلول‌ها در خون و طحال مقایسه گردد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ ردهٔ سلولی BCL-1

سلول‌های BCL-1 از بانک سلولی انستیتوپاستور خریداری شدند و در محیط RPMI (Gibco) و ۱۰درصد سرم جنین گاوی یا FBS (Gibco) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵درصد نگهداری و تکثیر شدند. سلول‌ها در هنگام استفاده برای تزریق، شست‌وشو و در محیط بدون FBS حل‌شده و با تریپان بلو شمارش شدند تا سلول‌های زنده بیش از ۹۹درصد باشد.

طراحی مدل و شرایط حیوانات

در این مطالعه از موش‌های BALB/c ماده، به سن هشت هفته استفاده شد. موش‌ها به دو گروه تست (دریافت تعداد پنج میلیون سلول BCL1) و کنترل (دریافت هم‌حجم محیط) تقسیم شدند. گروه تست نیز

به دو دسته تقسیم شدند: دستهٔ اول که شامل پنج سر موش بود و دو هفته پس از تزریق موردمطالعه قرار گرفتند و دستهٔ دوم که این گروه نیز متشکل از پنج سر موش بوده و چهار هفته پس از تزریق کشته شده و موردمطالعه قرار گرفتند.

بی‌هوش‌کردن حیوان، توزین و نمونه‌برداری

موش‌ها را قبل از کشتن، وزن کرده و سپس با اتر بیهوش نموده و با استفاده از سرنگ دو سی‌سی هپارینه از قلب حیوان خون‌گیری کرده و آن را داخل لوله ریخته و لوله به‌خوبی تکان داده شد تا با مادهٔ ضدانعقاد مخلوط شود. سپس زیر هود و تحت شرایط استریل پوست شکم و صفاق را باز کرده و طحال و کبد و گره لنفاوی جدا شد. طول و عرض طحال را اندازه گرفته و خود طحال نیز توزین شد. سپس طحال را نصف کرده، نیمی از آن همراه با بافت‌های کبد، گره لنفاوی و تیموس و ریه جهت انجام کارهای پاتولوژی در فرمالین ۱۰درصد نگهداری شد و از نیم دیگر برای جداسازی سلول استفاده گردید.

برای محاسبهٔ سطح طحال از حاصل‌ضرب ابعاد طحال استفاده شد و ایندکس طحال نیز با فرمول (نسبت وزن طحال به وزن موش× ۱۰۰) محاسبه گردید.

تهیهٔ گسترش از خون محیطی موش و شمارش

یک قطره خون را روی لام ریخته و گسترش تهیه شد، پس از خشک‌شدن و فیکس با متانول با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شد و سپس در منطقه‌ای که گلبول‌های قرمز فشرده نبودند، سیصد عدد لوکوسیت را با استفاده از یک شمارندهٔ سلول شمارش کرده و درصد لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها، ائوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌ها را محاسبه کردیم.

آماده‌سازی سلول‌های طحال و خون

جداسازی سلول‌های طحال، با تزریق محیط RPMI با استفاده از سرنگ دو به‌داخل بافت طحال و خارج‌کردن سلول‌ها با کمک پنس و جمع‌آوری آن‌ها صورت گرفت. به‌منظور حذف گلبول‌های قرمز موجود در سلول‌های طحال دو میلی‌لیتر محلول کلرید آمونیوم ۸۳درصد به سلول‌ها اضافه شد. پس از گذشت دو دقیقه، دو میلی‌لیتر FBS افزوده شده و به‌مدت پنج دقیقه و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و محلول رویی دورریخته شده و سلول‌ها در PBS سوسپانسیون شدند و با لام نئوبار شمارش گردیدند.

خون موش‌ها با استفاده از سرنگ حاوی مادهٔ ضدانعقاد هپارین جمع‌آوری شد. سپس به‌منظور حذف گلبول‌های قرمز، دو میلی‌لیتر از محلول لیزکنندهٔ محتوی کلرید آمونیوم، کربنات پتاسیم و اتیلن‌دی‌آمین‌ترا استیک اسید (EDTA) اضافه شد. پس از گذشت دو دقیقه FBS اضافه شده و همانند سلول‌های طحال سانتریفوژ شدند. جهت شمارش سلول‌های موجود در هر میلی‌لیتر، نمونه‌ای از سوسپانسیون با سمپلر گرفته شد و با لام نئوبار شمارش گردید.

افزودن آنتی‌بادی و فلوسیتومتری

برای خون و طحال دو لولهٔ مجزا در نظر گرفته شد و در هر لوله ۵۰ میکرولیتر از محلول حاوی سلول ریخته شد. در یکی از لوله‌ها آنتی‌بادی‌های کنترل منفی، رنگ‌شده با فلورسین ایزوتیوسیانات و فیکواریترین و در لولهٔ دیگر آنتی‌بادی‌های علیه IgM و CD5 که به‌ترتیب با FITC و PE کونژوگه بودند، اضافه شد (Bioscience). مراحل آماده‌سازی سلول‌ها جهت بررسی با فلوسیتومتری طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به‌طور خلاصه، آنتی‌بادی‌های مربوطه اضافه شده و سپس آنتی‌بادی به‌مدت سی دقیقه در دمای چهار درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه گردید. جهت زدون اتصال‌های غیراختصاصی سلول‌ها با PBS شسته شده و مجدداً در یک میلی‌لیتر پارافرمالدهید ۱درصد (در PBS) حل گردید.

سپس از دستگاه PARTEC برای خوانش سلول‌ها استفاده شد. برای دیدن سلول‌ها و تحلیل داده‌ها از پارامترهای FSC و SCC استفاده شد. بر اساس سلول عبوری از دستگاه فلوسیتومتر و بر اساس FSC و SSC جمعیت سلولی را انتخاب کرده و با رسم کادر بر روی جمعیت سلولی، برای مطالعه و تجزیه‌وتحلیل آماری

توسط کامپیوتر دستگاه فلوسیتومتری و نرم‌افزار فلومکس آماده شدند.

تهیهٔ مقطع از بافت‌ها

پس از بررسی ظاهری، از بافت‌های کبد، گره لنفاوی، تیموس و ریه نمونه‌هایی تهیه شد. این نمونه‌ها پس از ثبوت در محلول فرمالین ۱۰درصد، برای قالب‌گیری با پارافین مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشتگی را گذراندند. پس از تهیهٔ قالب‌های پارافینی از نمونه‌ها، مقاطع ٦ میکرومتری تهیه و سپس به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند و از نظر تغییرات هیستولوژیک با میکروسکوپ نوری موردبررسی قرار گرفتند.

آزمون‌های آماری

نتایج تمامی آزمایشات توسط نرم‌افزار سیگما استات ارزیابی شد، به‌طوری که در صورت توزیع پارامتریک داده‌ها، آزمون آنوا (ANOVA) یک‌طرفه و در صورت توزیع غیرنرمال، آنالیز آماری کروسکال والیس برای مقایسهٔ گروه‌های موردمطالعه، مورداستفاده قرار گرفت و نتایج برحسب میانگین و انحراف معیار گزارش شد و اختلاف با $p<0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری تعریف شد.

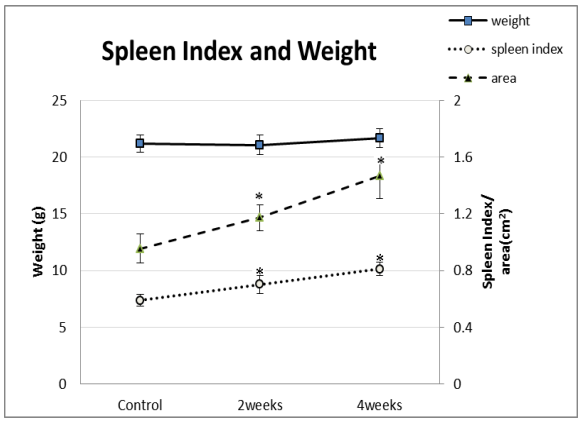
نتایج

تغییرات وزن و ایندکس طحال

وزن هریک از موش‌ها و همچنین وزن و ابعاد طحال در گروه‌های مختلف تعیین شد، به این ترتیب که گروه «دو هفته»، بعد از گذشت دو هفته از تزریق سلول‌های سرطانی، گروه «٤ هفته»، بعد از گذشت چهار هفته از تزریق سلول‌های سرطانی و گروه کنترل در پایان کار، یعنی همزمان با گروه چهار هفته اندازه‌گیری شدند. سپس سطح طحال (حاصل‌ضرب ابعاد طحال) و نیز ایندکس طحال (نسبت وزن طحال به وزن موش× ۱۰۰) محاسبه گردیدند.

همان طور که در نمودار ۱ دیده می‌شود، میانگین وزن موش‌ها در سه گروه اختلاف معنی‌داری از نظر آماری نشان نداد (به‌ترتیب در گروه کنترل و دو هفته و چهار هفته پس از تزریق ۰.۷۸±۲۱.۲۰ ، ۰.۸۹ ± ۲۱.۰۹ و ۰.۸۵±۲۱.٦۸ گرم). حاصل‌ضرب ابعاد طحال (سطح) در گروه کنترل ۰.۱۰±۰.۹٦، در گروه دو هفته ۰.۰۹±۱.۱۷ و در گروه چهار هفته برابر ۰.۱٦±۱.٤۷ سانتی‌متر مربع بود. اختلاف گروه دو هفته و کنترل، گروه چهار هفته و کنترل و بین دو گروه دو هفته و چهار هفته از نظر آماری معنی‌دار بود (به‌ترتیب p=0.0008، p=0.002 و p=0.011) که نشان‌دهندهٔ تغییر ابعاد و بزرگ‌ترشدن اندازهٔ طحال است.

ایندکس طحال در گروه کنترل ۰.۰٤۱±۰.۵۹٤، در گروه دو هفته ۰.۰٦۲±۰.۷۰۳ و در گروه چهار هفته برابر ۰.۰٤۵±۰.۸۱۲ بود. اختلاف بین هر دو گروه سرطانی با گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار است (دو هفته و چهار هفته به‌ترتیب p=0.011 و p=0.000) و بین گروه دو هفته و چهار هفته نیز اختلاف معنی‌دار دیده می‌شود (p=0.015) که نشان می‌دهد طحال از نظر وزنی افزایش معنی‌داری داشته است.



نمودار ۱. بررسی مقایسه‌ای وزن و ایندکس طحال بین گروه‌های موردمطالعه با یکدیگر.

به موش‌های BALB/c به‌صورت وریدی تعداد پنج میلیون سلول BCL-1 تزریق گردید. وزن موش‌ها (weight) و همچنین وزن و ابعاد طحال موش‌های سه گروه (گروه کنترل n= ۱۰ ، گروه تزریق دو هفته‌ای n=۵ و گروه تزریق چهار هفته‌ای n=۵) در پایان تست (دو یا چهار هفته) اندازه‌گیری شد و ایندکس طحال (spleen index) و سطح طحال (area) محاسبه گردید. نتایج برحسب میانگین و انحراف معیار (SD) نشان داده شده‌است. محور عمودی سمت راست هم نشان‌دهندهٔ ابعاد طحال (بر حسب سانتی‌متر مربع) و هم نشان‌دهندهٔ

ایندکس طحال است و محور عمودی سمت راست وزن حیوان بر حسب گرم را نشان می‌دهد. ستاره معنی‌داربودن تفاوت با گروه کنترل و § معنی‌داربودن تفاوت با گروه دوهفته را نشان می‌دهد ($p<0.05$).

شمارش افتراقی لکوسیت‌های خون محیطی

از خون محیطی حیوان گسترش تهیه شده و به روش گیمسا رنگ‌آمیزی گردید و سپس شمارش افتراقی لکوسیت‌ها انجام شد که نتایج آن بر حسب درصد گزارش شده است. همانطور که در جدول ۱ دیده می‌شود، تنها تفاوت معنی‌دار بین درصد لنفوسیت گروه کنترل و گروه تزریق چهار هفته‌ای BCL-1 است که در آن افزایش حضور لنفوسیت‌ها در خون قابل‌مشاهده است (p=۰/۰۰۲)، کاهش نوتروفیل‌ها (حدود ٦٠درصد در گروه چهار هفته نسبت به کنترل) قابل‌توجه است و نسبت لنفوسیت به نوتروفیل از ٤.٤ در گروه کنترل به ٨.٨ در گروه چهار هفته رسیده است. تفاوت معنی‌دار از نظر آماری برای درصد مونوسیت‌ها مشاهده نشد.

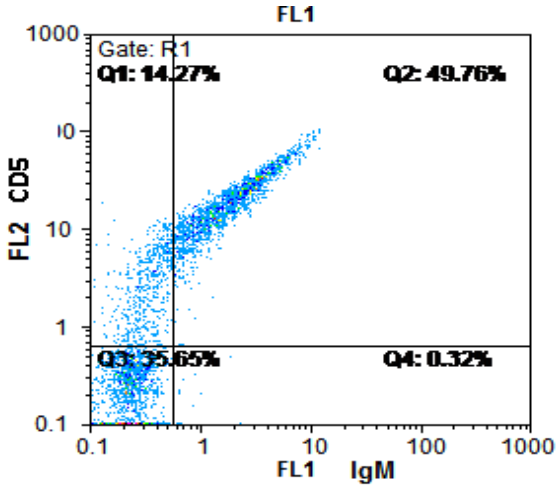
جدول ۱. شمارش افتراقی لنفوسیت، نوتروفیل و مونوسیت در خون موش‌های کنترل و سرطانی‌شده با BCL-1 بعد از دو و چهار هفته (SD±میانگین)

گروه سلول	لنفوسیت	نوتروفیل	منوسیت	نسبت لنفوسیت به نوتروفیل
کنترل (n=۳)	۸۱/۹۷±۰/۵۳درصد	۱۶/۶۲±۱/۰۱درصد	۱/۴۵±۰/۱۷درصد	۴.۹۳
تزریق دو هفته (n=۴)	۸۲/۵۷±۰/۹۵درصد	۱۵/۷.±۱/۶۶درصد	۱/۸۶±۰/۵۱درصد	۵.۲۶
تزریق چهار هفته (n=۵)	۸۷/۷۸±۱/۶۰ *درصد	۹/۹۶±۱/ ۷۲درصد	۱/۹۴±۰/۴۸درصد	۸.۸۲
ستاره معنی‌داربودن تفاوت با گروه کنترل را نشان می‌دهد گروه کنترل۳=n ، گروه تزریق دو هفته‌ای ۴=n و گروه تزریق چهار هفته‌ای ۵=n				

نتایج مربوط به فلوسیتومتری

الف. ردهٔ سلولی BCL-1

در مرحلهٔ اول سلول‌های مورداستفاده برای ایجاد مدل موشی سرطانی از نظر مارکرهای سطحی و سایر مشخصات سلولی موردبررسی قرار گرفتند. همان طور که در نمودار ۲ دیده می‌شود، میزان IgM و CD5 در این سلول‌ها یکسان نیست. خطوط تعیین‌کننده بر اساس ایزوتیپ کنترل رسم شده است. میزان سلول‌های IgM^+ حدود ۵۰درصد، سلول‌های $CD5^+$ حدود ٦٤درصد و سلول‌های IgM^+CD5^+ نیز نزدیک به ۵۰درصد است.

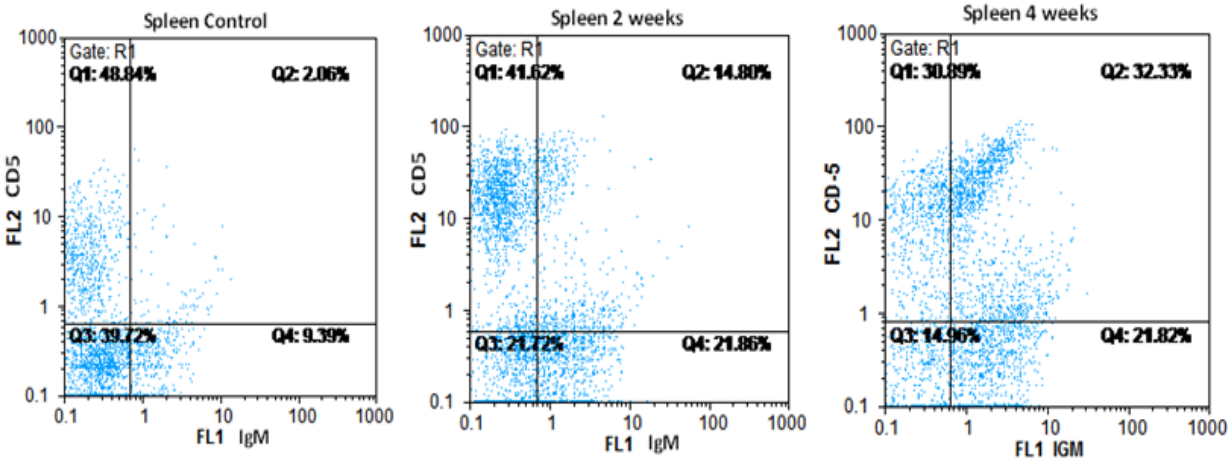


نمودار ۲. هیستوگرام سلول‌های BCL1 از نظر مارکرهای IgM و CD5.

محور افقی میزان فلورسانس ساطع‌شده از آنتی‌بادی کونژوگه شده با FITC را نشان می‌دهد که در اینجا آنتی‌بادی علیه IgM است و محور عمودی میزان فلورسانس ساطع‌شده از آنتی‌بادی کونژوگه شده با PE که در اینجا آنتی‌بادی علیه CD5 است. درصد سلول‌های IgM^+ ، $CD5^+$، IgM^+CD5^+ در نمودار مشخص شده است.

ب. طحال

یک نمونه از نتایج فلوسیتومتری طحال موش‌های کنترل، تزریق دو هفته و چهار هفته از نظر مارکرهای IgM و CD5 در نمودار ۳ دیده می‌شود. همان طور که مشاهده می‌شود در گروه کنترل، سلول‌های IgM^+CD5^+ حدود ۲درصد، در گروه دو هفته حدود ۱۵درصد و در گروه چهار هفته بالاتر از ۳۰درصد هستند.



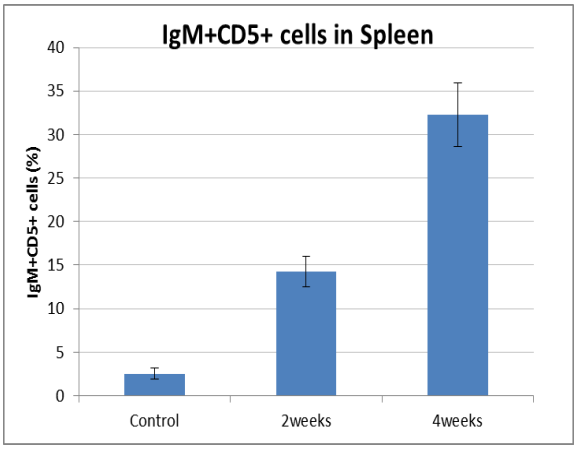
نمودار ۳ . هیستوگرام سلول‌های طحال موش گروه کنترل (سمت چپ)، دو هفته (وسط) و چهار هفته (سمت راست) پس از تزریق.

محور افقی میزان فلورسانس ساطع‌شده از آنتی‌بادی کونژوگه شده با FITC را نشان می‌دهد که در اینجا آنتی‌بادی علیه IgM است و محور عمودی میزان فلورسانس ساطع‌شده از آنتی‌بادی کونژوگه شده با PE که در اینجا آنتی‌بادی علیه CD5 است. درصد سلول‌های IgM + ، CD5+، IgM+CD5+ در نمودار مشخص شده است.

درصد سلول‌های IgM^+CD5^+ در چند نمونه و همچنین میانگین و انحراف معیار (SD) آن در جدول ۲ و نمودار ٤ مشاهده می‌شود. افزایش چشمگیر سلول‌های IgM^+CD5^+ با گذشت زمان مشهود است و این اختلاف بین گروه‌های دو هفته و کنترل، چهار هفته و کنترل و بین دو و چهار هفته از نظر آماری معنی‌دار است (در هر سه مورد $p<0.000$).

جدول ۲. درصد سلول‌های IgM^+، $CD5^+$ و IgM^+CD5^+ در طحال

	موش‌های گروه کنترل			دو هفته پس از تزریق			چهار هفته پس از تزریق		
	IgM^+	$CD5^+$	IgM^+CD5^+	IgM^+	$CD5^+$	IgM^+CD5^+	IgM^+	$CD5^+$	IgM^+CD5^+
۱	۱۱/۸	۴۸/۳۱	۲/۰۱	۲۲/۳۷	۳۳/۹۸	۱۲/۶	۱۷	۳۱/۶۳	۳۵/۱۴
۲	۱۰/۵۴	۴۹/۶	۲/۹۶	۲۶/۳۶	۴۱/۹۴	۱۶/۱۳	۲۱/۸۲	۳۰/۸۹	۳۲/۳۳
۳	۹/۳۹	۴۸/۸۴	۲/۰۶	۲۳/۵۷	۴۵/۴۱	۱۵/۶۶	۱۴/۱۳	۴۰/۸۳	۳۰/۱۹
۴	۷/۶۵	۴۷/۱	۳/۱۴	۲۱/۸۶	۴۱/۶۲	۱۴/۸	۱۶/۰۶	۳۳/۷۴	۳۶/۲۶
۵				۲۶/۷۱	۳۶	۱۲/۲۹	۲۲/۸۸	۳۰/۶۷	۲۷/۳۸
میانگین	۹.۸۴	۴۸.۴۶	۲.۵۴	۲۴.۱۷	۴۳.۹۵	۱۴.۳۰	۱۸.۲۷	۳۳.۵۵	۳۲.۲۶
SD	۱.۷۶	۱.۰۵	۰.۵۹	۲.۲۵	۱۱.۲۹	۱.۷۶	۳.۶۷	۴.۲۴	۳.۶۲

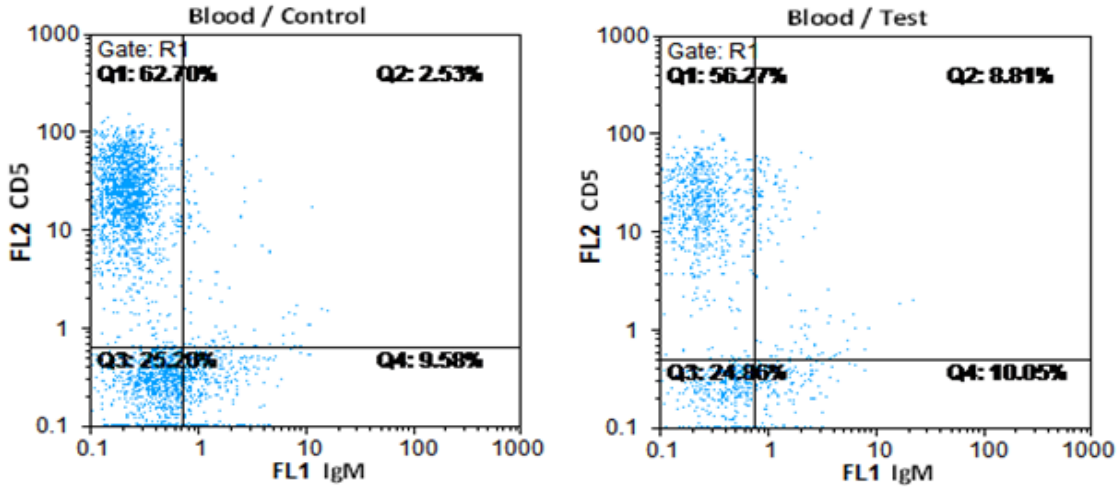


نمودار ٤. بررسی مقایسه‌ای درصد سلول‌های CD_5^+ IgM^+ به‌دست آمده از فلوسیتومتری بین گروه‌های موردمطالعه با یکدیگر.

نتایج برحسب میانگین و انحراف معیار (SD) نشان داده شده است. (در گروه کنترل٤=n ، در گروه تزریق دو هفته‌ای و چهار هفته‌ای هر کدام ٥=n). ستاره نشان‌دهندهٔ معنی‌دار بودن اختلاف با گروه کنترل و § نشان دهندهٔ معنی‌داربودن اختلاف بین گروه‌های دو و چهار هفته‌ای است ($p<0.000$).

ب. خون محیطی

در این قسمت نتایج فلوسیتومتری خون محیطی یک موش کنترل و یک موش تحت تزریق (چهار هفته) آورده شده است. همان طور که در نمودار (سمت چپ) دیده می‌شود، درصد سلول‌های IgM^+CD5+ در نمونهٔ خون گروه کنترل بسیار محدود است (حدود ۲.۵درصد) و این سلول‌ها در گروه تزریق چهار هفته‌ای نسبت به کنترل افزایش داشته و به حدود ۸.۸درصد رسیده است.



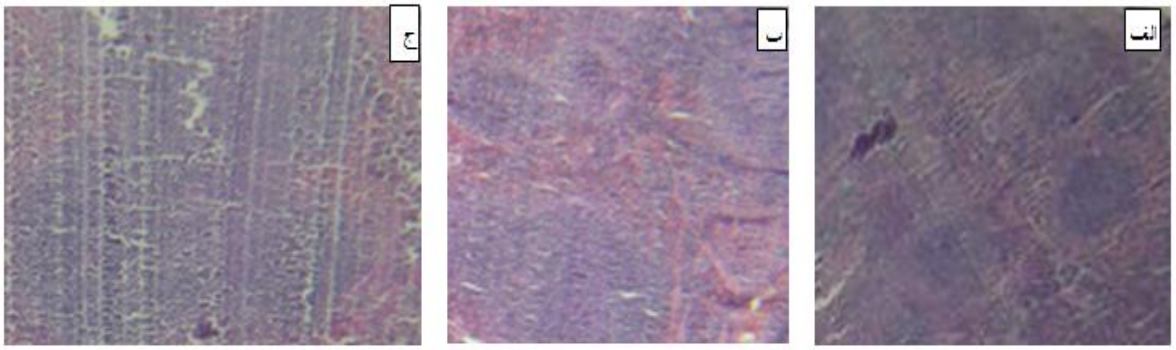
نمودار ۵. هیستوگرام خون محیطی موش گروه کنترل (سمت چپ) و چهار هفته پس از تزریق (سمت راست).

محور افقی میزان فلورسانس ساطع‌شده از آنتی‌بادی کونژوگه شده با FITC را نشان می‌دهد که در اینجا آنتی‌بادی علیه IgM است و محور عمودی میزان فلورسانس ساطع‌شده از آنتی بادی کونژوگه شده با PE که در اینجا آنتی‌بادی علیه CD5 است. درصد سلول‌های IgM^+، $CD5^+$، IgM^+CD5^+ در نمودار مشخص شده است.

نتایج بررسی میکروسکوپی مقاطع بافتی از طحال، گره‌های لنفاوی و کبد

بررسی مقاطع تهیه‌شده از بافت طحال

در مجموع سه مورد از مقاطع تهیه‌شده از بافت طحال موش‌های گروه کنترل موردبررسی قرار گرفت. در این نمونه‌ها ساختار کلی بافت طحال به‌صورت طبیعی بود (تصویر ۱). ولی در بررسی ریزبینی مقاطع بافتی تهیه شده از طحال موش‌های گروه دو و چهار هفته پس از تزریق تغییراتی در پولپ سفید به‌شکل هیپرپلازی بافت لنفاوی (توسعهٔ پولپ سفید) مشاهده شد.



تصویر ۱. فتومیکروگراف طحال موش گروه کنترل (الف)، دو هفته (ب) و چهار هفته (ج) پس از تزریق.

در گروه‌های دو و چهار هفته پس از تزریق، هیپرپلازی بافت لنفاوی به‌شکل توسعهٔ پولپ سفید دیده می‌شود. اگرچه تعداد زیادی لنفوسیت با هستهٔ هیپرکروم مشاهده می‌شود با این وجود ساختار و سازمان طبیعی طحال حفظ شده است (هماتوکسیلین و ائوزین ۴۰×).

بررسی مقاطع تهیه‌شده از بافت گره لنفی و کبد

با توجه به مقایسهٔ نتایج، در گره لنفی موش‌های گروه کنترل با گروه دوهفته و گروه چهار هفته پس از تزریق تفاوتی دیده نشد و ساختار بافت در سه گروه طبیعی بود. بر اساس این یافته، چنین به‌نظر می‌رسد که تزریق سلول‌های سرطانی ظرف چهار هفته تأثیری در منظرهٔ میکروسکوپیک بافت گره لنفی نداشته است و حداقل با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و با میکروسکوپ نوری تغییری مشاهده نمی‌شود.

در بررسی ریزبینی بافت کبد با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسلین و ائوزین در موش‌های گروه کنترل، گروه دو هفته و گروه چهار هفته پس از تزریق تفاوتی مشاهده نشد و ساختمان طبیعی کبد حفظ شده بود و اثری از ارتشاح سلول‌های سرطانی دیده نشد.

بحث

مدل‌های حیوانی بیماری‌ها، ارزش زیادی در بررسی‌های مختلف به‌ویژه اثر داروها دارند. با توجه به اینکه سرطان‌های خونی، گروه مهمی از سرطان‌ها را تشکیل می‌دهند، ایجاد مدل مناسب و همچنین جست‌وجوی معیارهای مفید برای دنبال‌کردن بیماری در مدل می‌تواند بسیار مفید باشد. در این مطالعه از ردهٔ سلولی BCL1 برای ایجاد موش سرطانی استفاده شد و سپس فاکتورهای مختلف از جمله تغییرات ایندکس طحال، نسبت سلول‌های خونی و همچنین تغییرات مارکرهای CD5 و IgM در سلول‌های خون و طحال توسط فلوسیتومتری در زمان‌های دو و چهار هفته ارزیابی شد.

مشاهده و هیستولوژی

تغییرات وزن طحال: با توجه به اینکه طحال یکی از محل‌های اصلی استقرار این نوع سلول‌های سرطانی در بدن است (۲۷)، در این مطالعه از مقایسهٔ تغییرات وزن طحال و ایندکس طحال که نسبت وزن طحال به وزن موش است، استفاده شد. بررسی نتایج مربوط به وزن موش‌ها و طحال آن‌ها در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد که وزن و ابعاد و همچنین ایندکس طحال در گروه دو هفته‌ای بیش از گروه کنترل بوده و در گروه چهار هفته‌ای افزایش معناداری در مقایسه با گروه کنترل و گروه دو هفته‌ای وجود داشت.

در مطالعات مشابه دیگر نیز افزایش قابل‌توجه وزن طحال مشاهده شده‌است (۲۸). سلاوین و همکاران (۲۷) در مطالعهٔ خود نشان دادند که BCL-1 ابتدا در طحال موش‌های تزریق‌شده تکثیر می‌یابد. آن‌ها تعداد 10^{7} سلول را به‌صورت وریدی به موش‌های Balb/c تزریق کردند و در زمان‌های مختلف یک ساعت پس از تزریق، سه روز پس از تزریق، یک هفته پس از تزریق و ۲۱ روز پس از تزریق، طحال حیوانات را خارج کردند. در

یک گروه نیز دو هفته قبل از تزریق طحال خارج شد. نتیجه اینکه وزن طحال در گروهی که یک ساعت پس از تزریق طحال خارج شده بود مشابه موش‌های نرمال تزریق نشده بود؛ ولی در گروه‌های دیگر افزایش معنادار وجود داشت و این افزایش با گذشت زمان روند صعودی نشان می‌داد. همچنین نتایج حاکی از این بود که برداشت سریع طحال ظهور سلول‌ها در خون محیطی و بروز لوسمی را به‌طور قابل توجهی به‌تعویق می‌اندازد و بقای طولانی حیوان را به‌همراه دارد که نشان می‌دهد اکثر سلول‌ها در مرحلهٔ اولیه در طحال لانه‌گزینی می‌کنند. همچنین، بعد از تزریق داخل وریدی 5×10^{7} سلول طی پنج دقیقه بعد از تزریق، درصد این سلول‌ها در طحال بسیارکم است اما هجده ساعت پس از تزریق تعداد زیادی از سلول‌ها در طحال حضور می‌یابند. بعد از گذشت ۳۵ روز طحال کاملا بزرگ می‌شود (۲۷). لذا می‌توان گفت در این مطالعه نیز نتایج با مطالعات مشابه سازگار است و بخش عمده‌ای از سلول‌ها در طحال مستقر شده‌اند.

گسترش خون محیطی: در مطالعهٔ لام خون محیطی بین تغییر درصد لنفوسیت‌ها درگروه کنترل و گروه دو هفته پس از تزریق، تفاوتی مشاهده نشد؛ ولی بین گروه تزریق چهار هفته و دو گروه دیگر تفاوت معنادار وجود داشت. بهترین تفاوت درنسبت لنفوسیت به نوتروفیل قابل‌مشاهده است. می‌توان گفت در شرایط مطالعهٔ ما حضور سلول‌های سرطانی در خون محیطی و بروز لوسمی در هفتهٔ چهارم بهتر قابل‌مشاهده است و در زمان قبل از این سلول‌ها در خون محیطی در حد قابل‌تشخیص وارد نشده‌اند. کرولیک و همکاران در مطالعهٔ خود میزان سلول‌های BCL-1 را در طحال و خون موش‌ها در زمان‌های مختلف و همچنین با استفاده از دوزهای مختلف تزریق سلول سنجیده‌اند. در تزریق وریدی ۱۰٤ عدد سلول BCL-1 تعداد این سلول‌ها در خون و طحال افزایش معناداری نداشت. در تزریق ۱۰۵ سلول این افزایش در هفتهٔ چهارم کاملاً مشهود بود و در هفتهٔ دوم به میزان کمتر مشاهده شد. در تزریق ۱۰۷ سلول در هفتهٔ دوم و چهارم تعداد بسیار بیشتری سلول در خون و طحال وجود داشت (۲۱). در مطالعهٔ سلاوین لوسمی لنفوسیتی یا درگیری خون محیطی بین روزهای ۲۱ تا ٢٤ و با میانگین ۲۸ روز در موش‌ها اتفاق افتاد و برداشت طحال ارتباط مستقیمی با کاهش بروز لوسمی نشان می‌داد (٢٦). نتایج مطالعهٔ ما با توجه به تزریق ۱۰۵ سلول با سایر مطالعات مشابه همخوانی دارد و تفاوت‌ها ناشی از تفاوت در تعداد سلول تزریقی و زمان بررسی است. در کل چنین استنباط می‌شود که سلول‌های لنفومی پس از تزریق به حیوان در مراحل اولیه در طحال مستقر شده و شروع به تکثیر می‌کنند در حالی که هنوز به‌شکل وسیع وارد خون نشده‌اند. ظهور سلول‌ها در خون محیطی و بروز لوسمی کمی با تأخیر و بعد از درگیری طحال رخ می‌دهد. البته با توجه به اینکه در بررسی خون محیطی، تعداد لنفوسیت‌ها به‌طور کلی بررسی می‌شوند و در موش نسبت لنفوسیت‌های خون بسیار بالاست، دقت این روش در مقایسه با روش فلوسیتومتری کمتر است؛ هرچند که سهولت بیشتری دارد.

بررسی فلوسیتومتری

آزمایش فلوسیتومتری با استفاده از سنجش آنتی‌ژن‌های سطحی CD5 وIgM انجام شد. ردهٔ سلولی BCL-1 در سطح خود IgM و CD5 را بیان می‌کنند. CD5 یک گلیکوپروتئین ٦٧ کیلودالتونی است که روی سلول‌های T بالغ و B-1 بیان می‌شود. احتمال می‌رود این ملکول در طی میان‌کنش بین سلول‌های T و B نقش داشته باشد (٢٦). IgM نیز گیرندهٔ آنتی‌ژن است که در سطح هر دو دستهٔ لنفوسیت B-1 و B-2 بیان می‌شود. لنفوسیت‌های B-1 در زندگی جنینی جمعیت زیادی دارند و در بند ناف یافت می‌شوند (۲۷). در بالغین در حفرهٔ صفاق و جنب و لامینا پروپریا به‌وفور یافت می‌شود. ولی درصد کمی از سلول‌های B طحال و خون محیطی را شامل می‌شوند (۲۳).

با توجه به حضور فراوان مارکرهای CD5 و IgM بر سطح سلول‌های BCL1 ، انتظار بر این بود که پس از سرطانی‌شدن موش، درصد سلول‌های مثبت از نظر دو آنتی‌ژن IgM و CD5 که نشان‌دهندهٔ سلول‌های لنفومی BCL-1 است افزایش داشته باشد و بررسی مقایسه‌ای درصد سلول‌های IgM+CD5+ موجود در طحال به روش فلوسیتومتری نیز نشان داد که درصد این سلول‌ها در گروه تزریق‌شده افزایش می‌یابد و تفاوت بین گروه کنترل و گروه تزریق دوهفته‌ای و چهارهفته‌ای معنی‌دار است (میانگین درصد سلول‌های IgM+CD5+ در گروه کنترل ۲/۵درصد و در گروه دو هفته ۱٤/۲درصد و در گروه چهار هفته ۳۲درصد). در واقع یک افزایش صعودی چشمگیر در تعداد این سلول‌ها در طحال با گذشت زمان مشاهده می‌شود. در حالی که درصد سلول‌های CD5+ (به تنهایی) در موش‌های گروه تزریق دو و چهار هفته نسبت به گروه کنترل روند کاهشی طی کرده بود.

سلول‌های BCL1 در سطح خود IgM بیان می‌کنند که از زنجیرهٔ سبک لامبدا در آن استفاده شده است. در موش‌های نرمال، زنجیرهٔ سبک لامبدا در ۲درصد سلول‌های B موش نرمال یافت می‌شود (۲۱). در مطالعهٔ ما نیز در گروه کنترل تعداد سلول‌های IgM+ در همین حدود بود. در مطالعه‌ای که توسط کرولیک انجام شد به موش‌ها ۱۰٦ عدد سلول BCL-1 به‌صورت وریدی تزریق شد و میزان سلول‌های لامبدا مثبت به‌صورت هفتگی سنجیده شد. درصد سلول‌های لامبدا مثبت دو هفته پس از تزریق بین ۵ تا ۱۰درصد و در موش‌های نرمال ۵درصد بود. در طی هفتهٔ سوم تعداد آن‌ها رو به افزایش نهاده و در هفته ششم به ٦۵درصد رسید (۲۱). اگرچه در نوع آنتی‌ژن موردبررسی تفاوت وجود دارد؛ ولی هر دو آنتی‌ژن تمایزی مورداستفاده در دو مطالعه، یعنی CD5 و زنجیرهٔ سبک لامبدا در سلول‌های BCL-1 بیان می‌شوند و هر دو مطالعه نشان‌دهندهٔ تثبیت و گسترش سلول‌های سرطانی در حیوان هستند.

بررسی هیستولوژیک بافت‌ها: در مقایسهٔ مقطع‌های تهیه‌شده و رنگ‌آمیزی‌شده به‌روش هماتوکسیلین–ائوزین از بافت طحال بین گروه کنترل و گروه‌های تزریقی، پالپ سفید در گروه‌های دو هفته و چهار هفته پس از تزریق نسبت به گروه کنترل گسترش بیشتری داشت. با توجه به اینکه در این روش رنگ‌آمیزی امکان افتراق دقیق بین سلول‌های لنفاوی سالم از تئوپلاستیک کمتر وجود دارد؛ لذا قضاوت درمورد ارتشاح سلول‌های نئوپلاستیک به بافت طحال باید با احتیاط صورت گیرد و از روش‌های دقیق‌تر به‌ویژه ایمونوهیستوشیمی استفاده گردد تا با شناسایی شاخص‌های سطحی امکان تشخیص دقیق لنفوسیت‌های نئوپلاستیک امکان‌پذیر گردد. ولی مطالعات مشابه حاکی از این است که این تجمع لنفوسیتی در طحال می‌تواند به سلول‌های سرطانی نسبت داده شود. در مطالعه‌ای که بررسی انفیلتراسیون سلولی در طحال موش‌های تحت تزریق وریدی با سلول BCL-1 علاوه‌بر رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین توسط روش ایمونوهیستوشیمی نیز سنجیده شد (رنگ‌آمیزی ایمونوهستوشیمی برای زنجیرهٔ سبک لامبدا که مخصوص سلول‌های توموری تزریق شده‌است) ارتشاح فراوان این سلول‌ها را در طحال نشان می‌داد (۳۱).

در مطالعهٔ ما، نتایج به‌دست‌آمده از مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی‌شده با هماتوکسیلین–ائوزین درمورد بافت گره لنفی و کبد نشان می‌دهد که گره‌های لنفاوی موش‌هایی که به آن‌ها سلول BCL-1 تزریق شده بود از نظر انفیلتراسیون سلولی و تعداد و نوع سلول‌ها مشابه نمونه‌های موش‌های کنترل است و بین دو گروه تزریق‌شده با یکدیگر و با گروه کنترل تفاوت عمده‌ای مشاهده نمی‌شود. درمورد گسترش‌های رنگ‌آمیزی‌شده از بافت کبد نیز بین گروه‌ها تفاوتی مشاهده نشد. در سایر مطالعات نیز در روز ۹٤ پس از تزریق وریدی ۱۰۷ سلول وزن گره‌های لنفاوی نسبت به گروه کنترل تغییری نکرده بود و از نظر میزان سلول نیز تفاوت معناداری نداشت؛ اما در مقابل گره‌های لنفاوی موش‌هایی که در چند هفته قبل طحال آن‌ها برداشته شده بود، افزایش وزن کاملاً قابل‌توجهی داشت و انفیلتراسیون سلولی

به‌صورت کم در کبد وجود داشت (۲۷). در مطالعهٔ کرولیک پس از گذشت ٤۲ روز از تزریق وریدی۱۰٦ عدد سلول BCL-1 ، تعداد زیادی از این سلول‌ها در گره‌های لنفاوی مشاهده نشد؛ ولی در تزریق ۱۰۷ سلول پس از ٤۲ روز درصد بیشتری از سلول لنفومی در گره لنفی حضور داشت. سه ماه پس از تزریق، اندازه گره‌های لنفاوی طبیعی و مشابه موش‌های نرمال بود؛ اما وزن کبد به دو برابر حالت عادی رسیده بود. در بررسی بافت‌شناسی انفیلتراسیون سلول‌های بلاست در کبد خصوصاً در قسمت پورتال مشاهده شد (۳۲). لذا می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که علت عدم‌مشاهدهٔ تغییر عمده در گره‌های لنفاوی نمونه‌های ما می‌تواند به‌دلیل کمتربودن سلول‌های سرطانی تزریق شده از یک طرف و کوتاه‌تربودن زمان بررسی نسبت به مطالعات فوق باشد. در هر صورت در این مدل لنفوم، سلول‌های سرطانی ارتشاح کمتری در گره‌های لنفاوی دارند و زمان بیشتری نیز برای این حضور لازم است که با توجه به مناسب بودن محیط طحال برای لنفوسیت‌های B منطقی به‌نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش چشم‌گیر درصد سلول‌هایی که از نظر مارکرهای سلول‌های سرطانی مثبت بودند و این مارکرها را بیان می‌کردند و نیز افزایش وزن و ابعاد طحال در موش‌های تحت تزریق با ردهٔ سرطانی و روند رو به رشد آن با افزایش زمان و همچنین مشاهدهٔ تدریجی این سلول‌ها در خون محیطی می‌توان گفت که در این آزمایش، سلول‌های سرطانی در حیوان مستقر شده و در حال تکثیر و گسترش هستند. لذا این مدل برای تحقیقات مختلفی که به مدل حیوانی نیاز دارند، مناسب بوده و ضمناً طحال مناسب‌ترین ارگان برای پیگیری وضعیت پیشرفت بیماری در هفته‌های اول می‌باشد.

تشکر

این مقاله مستخرج از پایان‌نامهٔ کارشناسی‌ارشد ایمنی‌شناسی دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه شاهد و کد مصوبهٔ کمیتهٔ اخلاق IR.Shahed.REC.1395.22 می‌باشد.

منابع

1. Mohagheghi MA, Mosavi A, Malekzadeh R, Parkin M. Cancer Incidence in Tehran Metropolis: The First Report from the Tehran Population-Based Cancer Registry 1998-2001. Archive of Iranian Medicine 2009; 12: 15-23
2. Moore MA, Eser S, Igisinov N, Igisinov S, Mohagheghi MA, Mousavi-Jarrahi A, et al. Cancer epidemiology and control in North-Western and Central Asia - past, present and future. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention 2010; 11(Suppl 2): 17-32
3. Hashemi M, Parwaresch MR, Tabrizchi H, kumar Gupta R, Raffii MR. Lymphomas in Iran. Archives of Iranian Medicine 2007; 10: 343-8
4. Karimi M, Mehrabani D, Yarmohammadi H, Jahromi FS. The prevalence of signs and symptoms of childhood leukemia and lymphoma in Fars Province. Cancer Detection and Prevention 2008; 32: 178-83
5. Raemaekers J.M, van der Maazen R.W.M. Hodgkin's lymphoma: news from an old disease. The Netherlands Journal of Medicine 2008; 66: 457-65
6. Bierman PJ, Harris N, Armitage JO. Nom Hodgkin's lymphoma. In: Goldman N, Ausiello D, editor. Cecil textbook of medicine. 23th ed. california. Elsevir Inc. 2004:1174-83
7. Bolon B. Genetically engineered animals in drug discovery and development: a maturing resource for toxicologic research. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology. 2004; 95: 154-161
8. Hashemi SM, Hassan ZM, Soudi S, Ghazanfari T, Shahabi S, Kheirandish M. The effect of injection of heat shocked tumor cell lysate on splenocytes proliferation and nitric oxide production in BALB/c mice with fibrosarcoma tumor. Cell Journal (Yakhteh) 2006; 8: 106-13
9. Sazgarnia A, Toossi, MHB, Shirin-Shandiz M, Bayani Roudi S, Khoei A, Esmaily H, et al. Treatment of Colon Carcinoma Tumors by Electrolysis: Effect of Electrical Dose and Polarity. Iranian Journal of Medical Physics 2008; 5: 39-51
10. Tabar Molla Hassan A, Pakravan N, Zahir M, Mostafaie A, Moazeni S, Ebtekar M, et al. Evaluation of cell proliferation and interleukine-4 and interferon γ level measurement in Balb/c mice with experimental fibrosarcoma tumor by combination of Gp96-tumor peptide and naloxon. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2008; 18: 1-9
11. BitMansour A, Pop LM, Vitetta ES. The Role of Regulatory B Cell-Like Malignant Cells and Treg

Cells in the Mouse Model of BCL1 Tumor Dormancy. PLoS One. 2016;11(12):e0167618.
12. Kovar M, Tomala J, Chmelova H, Kovar L, Mrkvan T, Joskova R, Zakostelska Z, Etrych T, Strohalm J, Ulbrich K, Sirova M, Rihova B. Overcoming immunoescape mechanisms of BCL1 leukemia and induction of CD8+ T-cell-mediated BCL1-specific resistance in mice cured by targeted polymer-bound doxorubicin. Cancer Research. 2008;68(23):9875-83.
13. Pola R, Laga R, Ulbrich K, Sieglová I, Král V, Fábry M, Kabešová M, Kovář M, Pechar M. Polymer therapeutics with a coiled coil motif targeted against murine bcl1 leukemia. Biomacromolecules. 2013;14(3):881-9.
14. Warnke RA, Slavin S, Coffman RL, Butcher EC, Knapp MR, Strober S, et al. The pathology and homing of a transplantable murine B cell leukemia (BCL1). Journal of Immunology. 1979; 123: 1181-8.
15. Schrek R. An Animal Model for Intractable Chronic Lymphocytic Leukemia. Medical Hypotheses 1990; 33: 175-83.
16. Boyd A, Goding JW, Schrader JW. The regulation of growth and differentiation of a murine B cell lymphoma: I. Lipopolysaccharide-induced differentiation. Journal of Immunology 1981; 126: 2461-5
17. Knapp M, Severinson-Gronowicz E, Schröder J, Strober S. Characterization of a spontaneous murine B cell leukemia (BCL1). II. Tumor cell proliferation and IgM secretion after stimulation by LPS. Journal of Immunology 1979; 123: 1000-6
18. Soldevila G, Raman C, Lozano F. The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease. Current Opinions in Immunology 2011; 23: 310-8
19. Yardel V, r Seyed2 N, Mosaffa3 N. In-vitro Production of Anti LPS Antibody by Peritoneal and Spleen B-Lymphocyte of Balb/c mice. Research in Medicine 2010; 33: 148-55
20. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. B-1 B cell development in the fetus and adult. Immunity 2012; 36: 13-21
21. Krolick KA, Isakson PC, Uhr JW, Vitetta ES.Murine B cell leukemia (BCL1): organ distribution and kinetics of growth as determined by fluorescence analysis with an anti-idiotypic antibody. Journal of Immunology. 1979; 123: 1928-35
22. Koganei S, Ito M, Yamamoto K, Matsumoto N. B-1a cell origin of the murine B lymphoma line BCL1 characterized by surface markers and bacterial reactivity of its surface IgM. Immunology Letters. 2005; 98: 232-44
23. Paeng N, Kido N, Kato Y, Sugiyama T. Marked Reduction of Mouse Peritoneal CD5+ B Cells by Intraperitoneal Administration of Lipopolysaccharide. Infection and immunity 1997; 65: 122-126
24. Benjamin H, lee and leffry l. Murine models of hematopoietic disease:patologic analize and charactrization. Shaoguang Li, editor. Mouse models of human blood cancers. Springer, USA. 2008; 45-81
25. Puebla N, M Slaknus. Induction of B-cell lymphoma by UVB Radiationin p53 Haploinsufficient Mice. BMC Cancer. 2011, 36: 753-762
26. Shimada M, Yamada Y, Nakakuki Y, Okamoto K. SL/KH strain of mice: a model of spontaneous pre-B lymphoma. Leukemia Research.1993; 17: 573-8
27. Slavin S, Morecki S, Weiss L. The role of the spleen in tumor growth kinetics of the murine B cell leukemia. Journal of Immunology. 1980; 124: 586-90
28. Warnke R, Salvin S, Coffman R, Butcher E, Knapp M, Strober S. The pathology and homing of a transplantable murine B cell lymphoma. Journal of immunology. 1979; 123: 1181-8
29. Bikah G, Lynd F, Aruffo A, Ledbetter J, Bondada S. A role for CD5 in cognate interactions between T cells and B cells, and identification of a novel ligand for CD5. International Immunology 1998; 10: 1185-96
30. Sanchooli J, Mosafa N, Shahraki Vahed A, Farjah G. Isolation of B-1 subtype B lymphocytes from human cord blood. Journal of Jahrom University of Medical Sciences. 2013; 11: 33-40
31. Lafrenz D, Koretz S, Stratte PT, Ward RB, Strober S. LPS-induced differentiation of a murine B cell leukemia (BCL1): changes in surface and secreted IgM. Journal of Immunology. 1982; 129: 1329-35.
32. Krolick K, Isakson P.C, Uhr J, Vitetta E.S. Murine B cell leukemia (BCL1): organ distribution and kinetics of growth as determined by fluorescence analysis with an anti-idiotypic antibody. The journal of immunology. 1979; 123:1928-35

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
24th Year, No.130
August- September 2017

Received: 28/06/2017
Last revised: 12/08/2017
Accepted: 19/08/2017

$IgM^{+}CD5^{+}$ cells in cancerous murine model using BCL1 cell line

Mohsen Abdolmaleki[1], Maryam Kheirandish[2], Abdolfattah Sarrafnejad[3], Reza Sedaghat[4] , Nariman Mosaffa[5], Roya Yaraee [6*]

1. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.
3. Department of Immunology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Department of Anatomy and Pathology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
5. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
6. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

*** Corresponding author e-mail: ryaraee@yahoo.com**

Abstract

Background: Animal models are crucial for the development of new therapies, especially in serious diseases such as cancer. In this study, cancer (leukemia) was established by an injection of cancerous cells and followed by evaluating cell markers in spleen and blood.

Materials and Methods: $5_{\times}10^{6}$ BCL-1 cells were injected through tail vein into syngenic BALB/c mice. Then, 5 mice were killed after two weeks and 5 after four weeks and changes in spleen index, peripheral blood leukocytes and histology of organs were assessed. Spleen and blood cells were evaluated by flow cytometry using IgM and CD5 as markers of cancer cells.

Results: Spleen index was increased in injected groups statistically significant ($p<0.05$) and the most increase was observed in spleen area of the 4-week group (about 1.5 fold of control group). Lymphocyte to the neutrophil ratio in peripheral blood smear was augmented from 4.9 to 8.8 ($p<0.05$). The percentage of IgM+CD5+ cells in the spleen increased from 2.5% in the control group to 14% in 2 weeks and 32% in 4-weeks group. In the histological examination of the spleens, the white pulp was developed.

Conclusion: In this method, cancer cells were established in animals. Changes in spleen size, blood cells ratio and the percentage of IgM+CD5+ cells in spleen can be used to track the status of the establishment of cancer cells in animals and could be considered as indicators to use for research on new therapies.

Keywords: Cancer, Animal model, BCL-1, Spleen, Blood leukocytes, IgM, CD5