مقاله تحقیقی

تمایز سلولهای کیسه زرده موش به سلولهای اریتروئیدی در حضور اریتروپوئیتین

طیبه رهبرپور M.Sc.*، مژده صالح‌نیا Ph.D.**، مسعود سلیمانی M.Sc.*

* کارشناس ارشد گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس

** دانشیار گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ وصول: بهمن ماه ۸۲، تاریخ پذیرش: فروردین‌ماه ۸۳

چکیده

هدف: سلولهای بنیادی خونساز کیسه زرده به علت توانایی تکثیر زیاد و عدم بروز آنتی‌ژنهای وابسته به سازگار نسجی MHC، بهترین کاندید برای پیوند، سلول درمانی و مطالعات تداخلات ژنی هستند. با توجه به اختلاف نظر در مورد اثرگذاری اریتروپوئیتین (EPO: Erythropoeitin) بر تمایز سلولهای کیسه زرده سعی شد تأثیر EPO بر تمایز آنها به رده اریتروئیدی در شرایط *In vitro* بررسی شود.

مواد و روشها: پس از تخلیه جنینهای ۱۰ روزه موش نژاد NMRI، کیسه زرده آنها با کمک استریومیکروسکوپ جدا شد و سلولهای آن ابتدا توسط روشهای مکانیکی و بعد با آنزیم کلاژناز ۰/۱ درصد یا تریپسین ۰/۲۵ درصد، ۰/۰۲ درصد اتیلن دی‌آمید تترااستیک اسید (EDTA) به سلولهای تک تبدیل شدند. سپس از این سلولها در حضور فاکتورهای اینترلوکین ۳، فاکتور سلول بنیادی و غلظتهای مختلف اریتروپوئیتین در دو مرحله سنجش کلونی در محیط نیمه جامد صورت گرفت. بعد از ۱۴ روز رنگ‌آمیزی بنزیدین صورت گرفت و کلونیهای بنزیدین مثبت به‌عنوان رده اریتروئیدی شمارش شدند. رنگ‌آمیزی بنزیدین و رایت گیمسا روی لامهای سیتواسپین آنها صورت گرفت. سپس برای بررسی اثر لایه پشتیبان برکشت سلولهای کیسه زرده، از هم‌کشتی این سلولها با سلولهای استرومای مغز استخوان استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تمایز این سلولها به رده اریتروئیدی در *In vitro* هم در حضور فاکتور EPO و هم در غیاب این فاکتور صورت می‌گیرد، ولی در حضور فاکتور EPO تعداد کلونیها بنزیدین مثبت بیشتر و اندازه کلونیها بزرگتر بود. میانگین تعداد کلونیها بنزیدین مثبت در گروه حاوی EPO با غلظت U/ml ۱ نسبت به گروه فاقد EPO، ۵۵/۴ درصد افزایش داشت اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. کشت این سلولها روی لایه پشتیبان هم نشان داد که در حضور EPO تمایز به رده اریتروئیدی بهتر صورت می‌گیرد.

نتیجه‌گیری: در مجموع با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که این سلولها در *In vitro* بدون نیاز به EPO به رده اریتروئیدی تمایز می‌یابند اما حضور EPO باعث بهبود شکل‌گیری کلونیها اریتروئیدی می‌شود. گرچه در این خصوص نیاز به تحقیقات بیشتری است.

کلید واژه‌ها: سلولهای کیسه زرده، اریتروپوئیتین، تمایز، سلولهای اریتروئیدی

مقدمه

جزایر خونی کیسه زرده (Yolk Sac) اولین مکان خونسازی و تشکیل عروق خونی طی تکامل پستانداران است. جزایر خونی کیسه زرده اولین بار در اوایل دهه ۱۹۰۰ مشاهده شدند و با مطالعات میکروسکوپ نوری و الکترونی در چندین گونه پستانداران از جمله موش و انسان جزئیات بیشتری در این خصوص به‌دست آمد [۱].

در موش احتمالاً جزایر خونی از سلولهای مزدورم

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵ Email: mogdeh@dr.com

پروکسیمال در احشای کیسه زرده بین ۷/۵-۷ روز ایجاد می‌شود. مدت کمی پس از تشکیل کیسه زرده در روز هفتم تکامل جنین موش، تجمعات سلولهای بنیادی درون کیسه زرده قابل مشاهده می‌شوند. طی ۷۲-۴۸ ساعت سلولهای درون جزایر خونی می‌توانند به‌عنوان اریتروسیت‌های هسته‌دار اولیه به واسطه محتوای هموگلوبین آنها شناسایی شوند و تقریباً در همان زمان رگ ایجاد می‌شود و گردش خون قابل مشاهده است. جنین‌شناسان مطرح کرده‌اند که یک سلول اجدادی مشترک می‌تواند هم سلولهای اندوتلیال و هم سلولهای بنیادی خونساز را ایجاد کند که همانژیوبلاست نام دارد [۲ و ۳]. در جنین ۱۰-۹ روزه موش دو پروسه تمایز اریتروسیت‌ها و سلولهای اندوتلیال درون کیسه زرده اتفاق می‌افتد [۱].

سلولهای بنیادی خونساز کیسه زرده (YS-HSC) توانایی تکثیری بیشتری نسبت به سلولهای HSCs (Hematopoietic Stem Cells) به‌دست آمده از کبد جنینی، خون بندناف و مغز استخوان بالغین دارند و آنتی‌ژنهای وابسته به MHC در آنها بیان نمی‌شود [۱]. این سلولها می‌توانند کاربردهای متفاوتی داشته باشند از جمله مدلی برای تمایز به انواع رده‌های سلولهای خونساز [۳ و ۴] ، برای شناخت هماتوپوئز در شرایط *In vitro* [۵]، به‌عنوان یک لایه پشتیبان برای بهبود شرایط کشت طولانی مدت سلولهای خونساز [۶]، برای ژن درمانی [۲ ، ۴ و ۹-۷] و همچنین به‌عنوان بهترین کاندید برای پیوند به علت عدم بیان آنتی‌ژنهای سازگار بافتی [۲ و ۴] هستند.

درون کیسه زرده تنها اریتروپوئز اولیه (Primitive) مشاهده می‌شود (اریتروسیتهای هسته‌دار)، در حالی که پروژنیتورهای قطعی (Definitive) میلوئیدی و اریتروئیدی و مولتی پوتنت نیز از کیسه زرده منشاء می‌گیرند [۱ و ۱۰] و ظاهراً به این دلیل است که این سلولهای پروژنیتور برای تمایز به سلولهای غیر از اریتروسیتهای اولیه به ریز محیط متفاوتی نیاز دارند یا اینکه به‌وسیله فاکتورهای محلی تولید شده درون کیسه زرده، تمایز به سایر رده‌ها مهار می‌شود [۲].

تمایز اختصاصی سلولهای بنیادی خونساز کیسه زرده به رده‌های مختلف خونی در *In vitro* صورت گرفته است [۱۴-۱۱]. شرایطی که منجر به تمایز هر رده سلولی می‌شود متفاوت است. برای مثال تمایز به سلول T فقط با فراهم کردن یک ریز محیط تیموسی انجام می‌گیرد [۶ و ۱۱]. تمایز به سلول B به یک لایه از سلولهای استرومایی (معمولاً رده سلولی S17) نیاز دارد [۱۲ و ۱۳]. تمایز میلوئیدی در محیط کشت نمیه جامد (معمولاً متیل سلولز) بهتر اتفاق می‌افتد و اریتروپوئز در محیطهای کشت حاوی اریتروپوئیتین به‌عنوان فاکتور رشد اساسی بهتر صورت می‌گیرد [۱۴].

به علت قدرت تمایز سلولهای بنیادی کیسه زرده به رده‌های مختلف در *In vitro* در این تحقیق سعی شد تمایز این سلولها به رده اریتروئیدی در محیط کشت، تحت تأثیر عامل القاکننده EPO بررسی شود و جواب مناسبی به سؤالات زیر داده شود:

۱- آیا سلولهای حاصل از کیسه زرده در شرایط *In vitro* توانایی تمایز به رده اریتروئیدی را به شکل خودبه‌خودی دارند؟

۲- آیا اضافه کردن دوزهای متفاوت از اریتروپوئیتین، باعث افزایش تمایز رده اریتروئیدی خواهد شد.

به علت اینکه بررسی مکانیسم تمایز سلولی در شرایط داخل رحمی امکان‌پذیر نیست؛ بنابراین کشت این سلولها و بررسی روند تمایز آنها در شرایط خارج رحمی برای شناخت بسیاری از مکانیسمهای دخیل در تمایز آنها می‌تواند مؤثر باشد، پس کشت این سلولها در شرایط *In vitro* برای ارزیابی فرضیه‌های فوق ضرورت داشت.

مواد و روشها

به‌منظور به‌دست آوردن موشهای باردار، موشهای ماده نژاد NMRI به‌صورت یک‌به‌یک به‌مدت یک شب در کنار موشهای نر قرار گرفتند. برای تعیین بارداری، صبح روز بعد موشهای ماده از نظر وجود پلاک واژن بررسی شدند و موشهای دارای پلاک واژینال، به‌عنوان موشهای باردار (روز صفر بارداری) در نظر گرفته شدند. برای جداسازی کیسه‌های زرده از جنین ابتدا موشهای باردار در روز دهم با جابه‌جایی مهرهٔ گردنی کشته شدند. سپس با قیچی و پنس استریل، شاخهای رحمی جدا شده و به پلیت یکبار مصرف حاوی محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute) دارای ۵ درصد سرم

جنین گاو (FBS) انتقال داده شدند و بعد با استفاده از استریومیکروسکوپ با قدرت پایین، جنینهای شامل کیسه زرده از دیگر بافتهای خارج جنینی و رحم جدا شدند. سپس کیسه‌های زرده از جنینها جدا شده و۵-۳ بار در محیط RPMI حاوی ۵ درصد FBS شسته شدند و به پلیت حاوی محیط DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) دارای ۲۰ درصد FBS منتقل شدند.

روش جداسازی سلولهای کیسه زرده

برای این‌کار ابتدا کیسه‌های زرده به‌صورت مکانیکی به‌وسیله پنس قطعه قطعه شدند. سپس از میان سرسوزن‌های سرنگ آسپیره شدند. (در اینجا ابتدا از سرسوزن شمارهٔ G19 و سپس G23 و بعد از آن از سرسوزن شمارهٔ G27 استفاده شد.) سپس کیسه‌های زردهٔ تکه‌تکه شده در آنزیم ۰/۱ درصد کلاژناز به همراه ۲۰ درصد FBS به مدت یکساعت یا در تریپسین ۰/۲۵ درصد دارای ۰/۲۰ درصد EDTA به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند که با این کار سلولهای تک کیسه زرده به‌دست آمدند. بعد از آن سلولها به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰ g سانتریفوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد. سپس سلولها در محیط تازه DMEM دارای ۲۰ درصد FBS سوسپانسیه شدند. بعد از آنکه سلولهای تک کیسه زرده به‌دست آمدند، شمارش سلولی انجام شد.

سنجش کلونی (Colony Assay)

سنجش کلونی به‌منظور بررسی تمایز سلولهای کیسه زرده به ردهٔ اریتروئیدی در *In vitro* صورت گرفت. همچنین برای بررسی تأثیر اریتروپوئیتین بر تمایز این سلولها به ردهٔ اریتروئیدی و تعیین دوز مناسب EPO نیز از این آزمایش استفاده شد. انجام سنجش کلونی در دو مرحله صورت گرفت. محیط سنجش کلونی از مخلوط کردن ۳۰ درصد FBS، ۴۰ درصد محیط DMEM و ۳۰ درصد آگار ۱ درصد و ۵۰ هزار سلول در هر میلی لیتر به همراه فاکتورهای رشد IL-3 به مقدار ۲۰ng/ml [۱۵]، فاکتور سلول بنیادی (SCF: Stem Cell Factor) به مقدار ۵۰ng/ml [۱۶] غلظتهای مختلف EPO بود. غلظت هایی از EPO که در مرحله اول به‌کار برده شدند شامل ۱U/ml ، ۲U/ml ، ۴U/ml بود. در مرحله دوم برای تعیین دوز مناسب و مؤثر EPO روی تمایز سلولهای کیسه زرده به ردهٔ اریتروئیدی، علاوه بر غلظتهایی از EPO که در مرحلهٔ اول به‌کار برده شده بودند، از دو غلظت ۰/۵ U/ml و ۸U/ml نیز استفاده شد.

سپس پلیتها به مدت ۱۴ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO2 قرار داده شدند. پس از گذشت زمان فوق تعداد کلونی‌ها در هر چاهک شمارش شدند.به‌طور کلی تجمعات سلولی که حاوی بیش از ۵۰ سلول بودند به‌عنوان کلونی در نظر گرفته شدند.

برای بررسی تمایز خودبه‌خودی سلولهای کیسه زرده به ردهٔ اریتروئیدی همراه‌کار، یک گروه کنترل بدون EPO نیز گذاشته شد.

تستهای تشخیصی در تأیید کلونیها

از رنگ‌آمیزی بنزیدین و رنگ‌آمیزی رایت گیمسا استفاده شد. بدین ترتیب که بعد از ۱۴ روز رنگ‌آمیزی بنزیدین روی پلیت انجام شد و کلونیها بنزیدین مثبت به عنوان رده اریتروئیدی شمارش شدند. بنزیدین با هموگلوبین رنگ می‌گیرد و برای تشخیص رده‌های اریتروئیدی به‌کار می‌رود. همچنین پس از تهیه لام سیتواسپین از سلولهای کلونی‌ها، رنگ‌آمیزی بنزیدین و رایت گیمسا نیز روی لام صورت گرفت و مورفولوژی سلولها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

کشت سلولهای کیسه زرده روی لایه پشتیبان

به‌دلیل اینکه در کشت سلولهای کیسه زرده بدون لایه پشتیبان نتیجه‌ای به‌دست نیامد به بررسی کشت این سلولها روی لایه پشتیبان پرداخته شد. چون سلولهای استرومایی مغز استخوان منبعی از فاکتورهای رشد و مولکولهای چسبنده برای حمایت سلولهای بنیادی است، از کشت سلولهای کیسه زرده روی استرومای مغزاستخوان استفاده شد. برای این‌کار سلولهای کیسه زرده روی استرومای غیرفعال شده مغز استخوان در حضور فاکتورهای رشد مناسب و غلظتهای ۰/۵U/ml و

EPO ۱U/ml کشت داده شد. همچنین یک گروه کنترل فاقد EPO نیز در نظر گرفته شد.

بعد از گذشت یک هفته از سلولهایی که رشد کرده بودند، سنجش کلونی به‌عمل آمد. سنجش کلونی مشابه روشهای بیان شده قبلی انجام شد ولی غلظت به‌کار برده شدهٔ EPO در اینجا ۱U/ml بود و یک سری هم بدون EPO انجام شد. بعد از ۱۴ روز تعداد کلونیهای بنزیدین مثبت شمارش شدند و دو گروه دارای EPO و فاقد آن با آنالیز آماری Student's *t*-test مقایسه شدند.

یافته‌ها

نتایج مربوط به کشت سلولهای کیسه زرده در محیط کشت نیمه جامد (سنجش کلونی) در حضور و غیاب EPO

این آزمایش در دو مرحله انجام شد: در مرحله اول برای تعیین دوز مناسب برای القای تمایز سلولهای کیسه زرده به ردهٔ اریتروئیدی از غلظتهای ۱U/ml ، ۲U/ml ، ۴U/m اریتروپوئیتین در محیط حاوی فاکتورهای رشد مناسب استفاده شد. همچنین یک گروه کنترل فاقد EPO نیز در نظر گرفته شد. ۱۴ روز بعد، تعداد کلونیها بنزیدین مثبت شمارش و نتایج به‌دست آمده بررسی شد. مرحله اول سنجش کلونی ۴ بار تکرارشد (جدول ۱) و به‌طور اختصار میانگین تعداد کلونیها بنزیدین مثبت شکل گرفته در گروه فاقد EPO گروههای حاوی EPO با غلظتهای ۱U/ml، ۲U/ml و۴U/ml به ترتیب ۳۹، ۵۶، ۴۶ و ۵۰ است.

جدول ۱. تعداد کلونیها بنزیدین مثبت پس از ۱۴ روز کشت سلولهای کیسه زرده در محیط نیمه جامد (مرحله اول سنجش کلونی)

تکرار آزمایش	غلظتهای متفاوت اریتروپوئیتین			
	–	۱U/ml	۲U/ml	۴U/ml
۱	۷۰	۸۲	۷۴	۷۸
۲	۲۵	۳۳	۲۸	۳۱
۳	۳۶	۵۹	۴۴	۴۹
۴	۲۴	۴۹	۳۸	۴۴
جمع کل	۱۵۵	۲۲۳	۱۸۴	۲۰۲
SD±میانگین	۳۹±۲۱/۵۳	۵۶±۲۰/۵۲	۴۶±۱۹/۸۰	۵۰±۱۹/۸۴

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد کلونی بنزیدین مثبت در غلظت EPO ۱U/ml و کمترین تعداد آن در گروه فاقد EPO ایجاد شده بود و بیشترین میانگین کلونیها نسبت به کمترین میانگین کلونی‌ها ۴۳.۶ درصد افزایش داشت. با این حال آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری در خصوص میانگین تعداد کلونی‌ها نشان نداد ($p=0.3$). به‌دلیل اینکه در مرحله اول در غلظت EPO ۱ U/ml بیشترین تعداد کلونیها بنزیدین مثبت تشکیل شده بود و همچنین در غلظت EPO ۴U/ml مجدداً تعداد کلونیها نسبت به غلظت ما قبل خود (۲U/ml) افزایش پیدا کرده بود.

جدول ۲. تعداد کلونیها بنزیدین مثبت پس از ۱۴ روز کشت سلولهای کیسه زرده در محیط نیمه جامد (مرحله دوم سنجش کلونی)

تکرارآزمایش	غلظتهای متفاوت اریتروپوئیتین					
	–	۰/۵ U/ml	۱ U/ml	۲ U/ml	۴ U/ml	۸ U/ml
۱	۷۸	۸۳	۱۲۴	۸۸	۹۶	۱۰۴
۲	۷۳	۱۰۲	۱۰۹	۷۷	۸۵	۹۸
۳	۱۰۲	۱۴۵	۱۶۷	۱۱۴	۱۳۷	۱۵۲
۴	۲۰	۴۴	۵۶	۲۴	۲۸	۴۲
۵	۱۱۱	۱۲۸	۱۵۶	۱۱۵	۱۳۱	۱۴۸
۶	۲۲	۳۵	۳۸	۲۴	۳۲	۳۶
جمع کل	۴۰۶	۵۳۷	۶۵۰	۳۴۲	۵۰۹	۵۸۰
SD±میانگین	۶۸±۳۸/۸۶	۹۰±۴۴/۲۷	۱۰۸±۵۲/۲۴	۷۴±۴۱/۱۹	۸۵±۴۶/۹۰	۹۷±۴۹/۸۴

در نتیجه در مرحله دوم از سنجش کلونی، از غلظتهای کمتر از ۱U/ml (۰/۵U/ml) و بیشتر از ۴U/ml (۸U/ml) EPO نیز استفاده شد. تکرار آزمایش در این مرحله ۶ بار بود (جدول۲) و به‌طور اختصار میانگین تعداد کلونیها بنزیدین مثبت شکل گرفته در گروه فاقد EPO گروههای دارای EPO با غلظتهای ۰/۵U/ml ، ۱U/ml ، ۲U/ml ، ۴U/ml و ۸U/ml به ترتیب ۶۸، ۹۰، ۱۰۸، ۷۴، ۸۵ و ۹۷ بود و آنالیز آماری که توسط تست Student's *t*-test و در سطح ۰/۰۵ انجام گرفت، نشان داد که تفاوت در خصوص میانگین تعداد کلونیهای بنزیدین مثبت معنی‌دار نبوده است ($p=0.16$). در این مرحله نیز مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد کلونیهابنزیدین مثبت در غلظت EPO ۱U/ml و کمترین تعداد آن در غیاب

EPO ایجاد شده و درصد افزایش میانگین کلونی ها از کمترین تا بیشترین مقدار ۵۸/۸ درصد بود. در غلظت U/ml ۸ نیز میانگین تعداد کلونیها بنزیدین مثبت نسبت به غلظت ما قبل خود (۴U/ml) افزایش پیدا کرده بود ولی به‌دلیل کمبود وقت، غلظتهای بعد از ۸U/ml بررسی نشد.

نتایج مربوط به تأیید کلونیها

رنگ‌آمیزی بنزیدین روی کلونی‌ها انجام گرفت، سپس کلونیهای بنزیدین مثبت شمارش شدند. اکثریت قریب به اتفاق کلونیهای تشکیل شده در این آزمایشهای، بنزیدین مثبت بودند یعنی مربوط به ردهٔ ارتیروئیدی بودند. شکل ۱ نمایی از کلونیها بنزیدین مثبت را در روز ۱۴ کشت سلولهای کیسه زرده در محیط نیمه جامد نشان می‌دهند.

همچنین از کلونیها سلولهایی برداشته و توسط سیتواسپین لام تهیه شد و رنگ‌آمیزی بنزیدین روی آن انجام گرفت و سلولهای بنزیدین مثبت که تقریباً تمامی سلولها را تشکیل می‌دادند، زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند که تأییدی بر تمایز سلولهای کیسه زرده به ردهٔ اریتروئیدی است.

شکل ۲ نمایی از رنگ‌آمیزی رایت گیمسا روی سلولهای برداشته شده از کلونیها محیط نیمه جامد را نشان می‌دهد که به خوبی سلولهای ردهٔ اریتروئیدی به‌خصوص یک سلول پلی‌کروماتوفیلیک در آنها دیده می‌شوند.

نتایج مربوط به کشت سلولهای کیسه زرده روی لایه پشتیبان حاصل از استرومای مغز استخوان (BM)

کشت سلولهای کیسه زرده روی استرومای غیرفعال شده BM در حضور فاکتورهای رشد مناسب و غلظتهای ۰/۵U/ml و ۱U/ml EPO انجام شد. همچنین یک گروه کنترل فاقد EPO نیز در نظر گرفته شد.

تعداد کلونیها بنزیدین مثبت سلولهای کیسه زرده (که قبلاً روی استرومای BM دارای ۰/۰۵ U/ml EPO کشت داده شده بودند) در محیط نیمه جامد فاقد EPO و دارای غلظت ۱ U/ml EPO به‌ترتیب ۱۷/۵ و ۲۳/۵ بود.

مقایسه میانگین این گروه نشان می‌دهد که تعداد کلونیها در غلظت ۱ U/ml EPO نسبت به گروه فاقد EPO ۳۴/۳ درصد افزایش پیدا کرده است ولی آنالیز آماری که با استفاده از آزمون Mann-Whitney و در سطح ۰/۰۵ صورت گرفت، تفاوت معنی‌داری را در خصوص میانگین تعداد کلونیها بنزیدین مثبت نشان نداد.

تعداد کلونیها بنزیدین مثبت سلولهای کیسه زرده (که قبلاً روی استرومای BM دارای ۱ U/ml EPO کشت داده شده بودند) در محیط نیمه جامد فاقد EPO و دارای ۱ U/ml EPO به‌ترتیب ۳۶/۵ و ۴۵ بود.

مقایسه میانگینهای این گروه نیز نشان می‌دهد که در این گروه نیز میانگین تعداد کلونی‌ها در غلظت ۱ U/ml EPO نسبت به گروه فاقد EPO افزایش داشته است و این افزایش ۲۳/۳ درصد است ولی آنالیز آماری که با استفاده از تست Mann-Whitney و در سطح ۰/۰۵ صورت گرفت، تفاوت معنی‌داری را در این خصوص نشان نداد.

بحث

در این تحقیق تمایز سلولهای خونساز کیسه زرده در *In vitro* به ردهٔ اریتروئیدی بررسی شد و اثر EPO بر افزایش و یا تغییر درصد کلونیهای حاصل سنجیده شد و مشاهده شد که میانگین تعداد کلونیهای بنزیدین مثبت در گروه دارای EPO نسبت به گروه فاقد EPO ۵۵/۴ درصد افزایش داشت که نشان‌دهنده نقش EPO در افزایش تمایز سلولهای کیسه زرده به رده اریتروئیدی است. شاید اگر تکرار آزمایشها بیشتر بود این تفاوتها معنی دار می شد.

در سال ۱۹۹۷ نیز مک گان (MC Gann) و همکارانش نشان دادند که سیگنال‌دهی EPO/EPOR از لحاظ عملکردی طی شروع تکثیر و تمایز اریتروبلاستهای اولیه کیسه زرده فعال است. آنها گزارش کردند که EPO اگزوژن هم تعداد اریتروسیتها و هم تجمع گلوبین βH1 را در کیسه زرده افزایش می‌دهد و نتیجه گرفتند که اریتروبلاستهای اولیه کیسه زرده به طور مستقیم به EPO پاسخ می‌دهند و EPO/EPOR از لحاظ عملکردی طی شروع تکثیر و تمایز اریتروبلاستهای اولیه کیسه زرده فعال است [۱۷].

همچنین وجود کلونیها بنزیدین مثبت موجود در گروه فاقد EPO در تحقیق حاضر نشان‌دهنده این بود که در کیسه زرده تمایز خودبه‌خودی به ردهٔ اریتروئیدی، مشابه *In vivo* صورت می‌گیرد. در حضور EPO کلونیها بنزیدین مثبت افزایش داشته، همچنین تعداد سلولهای تشکیل دهنده هر کلونی نیز بیشتر شده بود. علاوه بر این به نظر می‌رسد که کلونیها حاوی سلولهای تیره (مرده) در گروه دارای EPO در مقایسه با گروه فاقد EPO کمتر بود. شاید بتوان چنین نتیجه گرفت که EPO باعث بقای بیشتر سلولهای موجود در کلونیها سلولی شده است.

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۰ انجام گرفت مشاهده شد که اریتروسیتهای اولیه نابالغ، هم در *In vivo* و هم در *In vitro* به تحریک EPO پاسخ می‌دهند و در فقدان EPO دچار آپوپتوز می‌شوند و نتیجه گرفتند که EPO به عنوان یک فاکتور حیاتی برای اریتروسیتهای اولیه جنینی مانند پیش‌سازهای قطعی اریتروئیدی است [۱۸].

مقایسه نسبی بین اندازه و سایز کلونیها بنزیدین مثبت به ترتیب در گروه دارای EPO و گروه فاقد آن نشان می‌دهد که کلونیها گروه دارای EPO بزرگتر بوده و از تعداد سلولهای بیشتری تشکیل شده است.

تمایز کیسه زرده به رده اریتروئیدی با رنگ‌آمیزی بنزیدین روی لامهای تهیه شده از سیتواسپین کلونیهای حاصل مشخص و مشاهده شد که اکثریت سلولها بنزیدین مثبت و متعلق به رده اریتروئیدی هستند.

همچنین اختلاف در شدت رنگ مشاهده شده در سلولهای موجود در لامهای مذکور پس از رنگ‌آمیزی بنزیدین می‌تواند نشان‌دهنده انواع سلولهای رده اریتروئیدی باشد. چرا که هر چه سلول بالغ‌تر می‌شود به تدریج مقدار ذخیره هموگلوبین آن افزایش یافته و شدت رنگ آن بیشتر می‌شود.

حتی تعدادی سلول گلبول قرمز نرموبلاستیک دیده شد که در حال از دست دادن هسته خود هستند و به نظر می‌رسد که مربوط به رده اریتروئیدی قطعی باشند و شکل ۲ نیز یک سلول پلی‌کروماتوفیلیک مگالوبلاست را نشان می‌دهد که احتمالاً مربوط به رده اریتروئیدی اولیه است. این یافته‌ها نشان می دهد که در تمایز سلولهای کیسه زرده به رده اریتروئیدی، هم رده اریتروئیدی اولیه و هم قطعی دیده می‌شود ولی مشخص نیست که چه تعداد از کلونی‌ها مربوط به رده اریتروئیدی اولیه و چه تعداد از آنها مربوط به رده اریتروئیدی قطعی است و همچنین معلوم نیست که اضافه کردن EPO تمایز سلولهای کیسه زرده را به کدام نوع اریتروپوئز بیشتر سوق می‌دهد. در این خصوص با انجام تحقیقات تکمیلی مثل استفاده از RT-PCR روی این سلولها می‌توان نوع هموگلوبین و نیز بروز برخی از ژنهای اختصاصی را مشخص کرد و پاسخ مناسبی را برای سؤالات مذکور یافت.

اگر چه سیگنال‌دهی EPO در تولید اریتروپوئز قطعی نقش اصلی را ایفا می‌کند، اما نقش آن در اریتروپوئز اولیه جنین (کیسه زرده) کمتر شناخته شده است و نظرات متفاوتی در مورد تأثیر آن بر اریتروپوئز اولیه وجود دارد [۱۹].

بیان EPO و رسپتور EPO (EPOR) در دو زمان مختلف و جدا از هم صورت می‌گیرد. رسپتور EPO در جزایر خونی کیسه زرده اولیه بیان می‌شود در حالی که هیچ بیانی از ژن EPO در بافت خارج جنینی دیده نمی‌شود. در مرحله بعد بیان EPO در جنین دیده می‌شود که شروع بیان EPO با شروع اریتروپوئز قطعی همراه است [۲۰].

مطالعات اولیه نشان داده است که پیش‌سازهای اریتروئیدی کیسه زرده موشی به EPO در *In vitro* پاسخ نمی‌دهند [۲۱] ولی در مطالعات بعدی که توسط همان گروه محققین صورت گرفت نشان داده شد که EPO تشکیل کلونی اریتروئیدی از سلولهای کیسه زرده را تحریک می‌کند و زمانی که EPO اگزوژن به کشت سلولهای جدا شده جنینی اضافه می‌شود سنتز "هم" افزایش می‌یابد.

این یافته‌ها نشان می‌دهد که سلولهای اریتروئیدی کیسه زرده به EPO پاسخ می‌دهند و EPO به عنوان فاکتور حیاتی برای مراحل اولیه بلوغ اریتروبلاستهای اولیه عمل می‌کند [۲۲].

محققین دیگر نیز اریتروپوئز اولیه را در موشی که اختلال هدفمند در EPO یا EPOR آن صورت گرفته است، بررسی کردند و برخلاف آنها، مشاهده کردند که در کیسه زرده موش موتاسیون یافته فاقد سیگنال‌دهی EPO، تعداد اریتروسیت

اولیه تا روز ۹/۵ جنینی طبیعی بوده اما بعد از آن تولید آنها به شدت با تأخیر و کندی صورت می‌گیرد؛ با توجه به این داده‌ها نتیجه گرفتند که سیگنال‌دهی EPO در *In-vitro* فقط در مراحل انتهایی اریتروبلاستهای اولیه ضروری است [۲۳ و ۲۴].

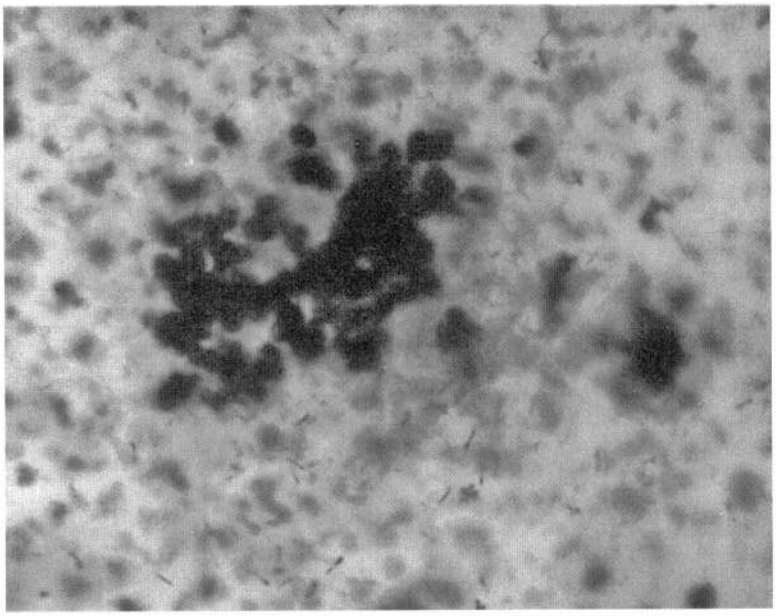
در مجموع با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که این سلولها در *In vitro* بدون نیاز به EPO به رده اریتروئیدی تمایز می‌یابند اما حضور EPO باعث بهبود شکل‌گیری کلونیها اریتروئیدی می‌شود، گرچه در این خصوص تحقیقات بیشتری نیاز است.

References

1. **Palis J, Yoder MC.** Yolk sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. Exp Hematol 2001; 29: 927-36.
2. **Auerbach R, Huang H, Lu L.** Hematopoietic stem cells in the mouse embryonic yolk sac. Stem Cells 1996; 14: 269-80.
3. **Choi KE, Kennedy M.** A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. Development 1998; 125: 725-32.
4. **Lu LS, Wang SJ, Auerbach R.** In vitro and in vivo differentiation into B cells, T cells and myeloid cells of primitive yolk sac hematopoietic precursor cells expanded 100 - fold by coculture with a clonal yolk sac endothelial cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 14782-7.
5. **Huang H, Auerbach R.** Indentification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 10110-4.
6. **Yoder M.** Murine embryonic youlk sac cells promote in vitro prolifereation of bone marrow high proliereative potential colony-forming cells. Blood 1995; 86: 1322-30.
7. **Wei YZ, Quertermous T,Wagner TE.** Directed endothelial differentiation of cultured embryonic yolk sac cells in vivo provides a novel cell - based system for gene therapy. Stem Cells 1995; 13: 541-7.
8. **Wei YZ, Li J.** Human growth hormone antagonist (G 120 R) delivered by a murine yolk sac cell- derived mini organ decrease the growth rate of mouse. Stem Cells 1997; 15: 364-7.
9. **Wei YZ, Li J, Wanger AE.** Long term expression of human growth hormone hGH in mice containing Allogenic Yolk sac cell derived neovascular implants expressing hGH. Stem Cells 1996; 14: 232-8.
10. **Auerbach R.** Role of endothelium in the control of mouse yolk sac stem cell differentiation. Develop Comparative Immunol 1998; 22: 333- 8.
11. **Dieterlen-lievre F, Godin IE, Garcia-porrero JA, Marcos MA.** Initiation of hemopoiesis in the mouse embryo. Ann NY Acad Sci 1994; 718: 140-6.
12. **Cumano A, Dorshkind K, Gillis S, Paige CJ.** The influence of S17 stromal cells and IL-7 on B cell development. Eur J Immunol 1990; 20: 2183-9.
13. **Dorshkind K.** Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. Annu Rev Immunol 1990; 8: 111-37.
14. **Spooner E, Eliason J, Dexter TM.** Long-term mouse bone marrow cultures. In: Testa NG, Molineux G, eds. Haemopoiesis. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press 1993; 55-73.
15. **Xu MJ, Matsuoka S, Yang FC, Ebihara Y, Manabe A, Tanaka R, Eguchi M, et al.**Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. Blood 2001; 97: 2016-22.
16. **Huyhn A, Dommergues M, Izac B, Croisille L, Katz A, Vainchenker W, et al.** Characterization of hematopoietic progenitors from human yolk sacs and embryos. Blood 1995; 86: 4474-85.
17. **Mc Gann JK, Silver L, Liesveld J.** Epo-receptor and function during the initiation of murine yolk sac erythropoiesis. Exp Hematol 1997; 25: 1149-57.
18. **Kimura T, Sonoda Y, Iwai N, Satoh M,Yamaguchi-Nakano T.** Proliferation and cell death of embryonic primitive erythrocytes. Exp Hematol 2000; 28: 635-41.
19. **Koury M, Bondurant M.** The molecular mechanism of EPO action. Eur J Biochem 1992; 210: 649-63.
20. **Lee R, Kertesz N, Joseph SB, Jegalian A, Wu H.** Epo and EPOR expression and 2 waves of erythropoiesis.

Blood 2001; 98: 1408-15.

21. **Cole RJ, Paul J.** The effects of EPO on haem synthesis in mouse yolk sac and cultured foetal liver cells. J Emb Exp Morphol 1966; 15: 245-260.
22. **Sasaki K, Matsamura G.** Hematopoietic cells of yolk sac and liver in the mouse embryo: a light and electron microscopical study. J Anat 1986; 148: 87-97.
23. **Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF.** Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. Cell 1995; 83: 59-67.
24. **Lin C-S.** Differential effects of an EPO receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. Gene Dev 1996; 10: 154-64.



شکل ۱. نمایی از رنگ‌آمیزی بنزیدین روی کلونیها حاصل از کشت سلولهای کیسه زرده در محیط نیمه جامد پس از ۱۴ روز. بزرگنمایی: ۱۰۰ ×

شکل ۲. رنگ‌آمیزی رایت گیمسا روی سلولهای برداشته شده از کلونیها محیط نیمه جامد در روز ۱۴ یک سلول پلی‌کروماتوفیلیک مگالوبلاستیک را نشان می‌دهد. بزرگنمایی: ۱۰۰۰ ×