

افزایش موفقیت کاریوتیپ: تأثیر محیط مهیاسازی بر تکثیر سلولی و آپوپتوز در نمونه‌های لنفوبینی

بنت الهدی کوهستانی دهقی^۱، مریم پناهی^۲، امیرعباس نویدی نیا^۳، حمیده رحمانی سراجی^۳، الهام جفایی^۴، مزگان امیرپور^۱، مهدی اله بخشیان فارسانی^{*۱}

۱. گروه خون شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳. گروه هماتولوژی و انکولوژی، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۴. مرکز تحقیقات پاتولوژی مولکولی سرطان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۱۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۳/۳۰

چکیده

مقدمه: ارزیابی کاریوتایپ استاندارد (CK)، اولین گام ارزیابی کل ژنوم و شناسایی تغییرات ساختاری و عددی کروموزوم‌ها می‌باشد. ارزیابی کاریوتایپ استاندارد اطلاعات بسیار مهمی را در زمینه تشخیص، پیش‌آگهی، طبقه‌بندی خطر و مدیریت بیماری ارائه می‌دهد. از جمله شروط لازم و اساسی برای یک ارزیابی کاریوتایپ استاندارد موفق، حضور تعداد کافی از سلول‌های زنده با قابلیت تکثیر بالا است. بنابراین این تکنیک در برابر نمونه‌هایی با تعداد کم سلول و کند رشد با محدودیت مواجه است. در این مطالعه اثر محیط مهیاسازی (CM) بر بقا، تکثیر و آپوپتوز نمونه‌های لنفوبینی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش: در این مطالعه کاربردی از CM برای شبیه‌سازی شرایط محیط کشت از ریز محیط مغز استخوان استفاده شد. نتایج مطالعه حاضر از ارزیابی تکثیر سلولی و ارزیابی آپوپتوز با استفاده از بررسی‌های فلوسیتومتری، همچنین ارزیابی شاخص میتوزی با میکروسکوپ نوری به دست آمد. برای آنالیز بیان ژن نیز از RT-qPCR استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که درصد بالایی از کشت‌ها در محیط کشت شبیه‌سازی شده موفق بوده است. در این مطالعه، در گروه مداخله (محیط کشت شبیه‌سازی شده) نسبت به گروه کنترل (محیط کشت استاندارد)، افزایش معنی‌داری در بقا، شاخص میتوزی ($P < 0.04$)، بیان Ki-67 ($P < 0.01$) و درصد سلول‌های فاز S چرخه سلولی ($P < 0.01$) مشاهده شد. همچنین، میزان آپوپتوز در گروه مداخله به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: از آنجایی که CM با فراهم‌آوردن احتیاجات سلولی در محیط کشت و با تنظیم برهم‌کنش‌های سلول به سلول و سلول به ماتریکس خارج سلولی در فرایندهای رشد سلولی، تمایز و بازسازی نقش اساسی دارد، یافته‌های این مطالعه پیشنهاد می‌کند که از CM به‌منظور بهبود شرایط رشد سلول‌ها به‌ویژه در مواردی که تعداد سلول اندک، یا ماهیت سلول کند رشد است و از تکثیر کافی برخوردار نمی‌باشد، استفاده شود.

کلیدواژه: لنفوبینی، محیط مهیاسازی، کاریوتایپ استاندارد

* نویسنده مسئول: مهدی اله بخشیان فارسانی، ایمیل: mbakhshian1360@gmail.com

ارجاع: کوهستانی دهقی، بنت الهدی، پناهی، مریم، نویدی نیا، امیرعباس، رحمانی سراجی، حمیده، جفایی، الهام، امیرپور، مزگان، اله بخشیان فارسانی، مهدی. افزایش موفقیت کاریوتیپ: تأثیر محیط مهیاسازی بر تکثیر سلولی و آپوپتوز در نمونه‌های لنفوبینی. مجله دانشکده علوم پزشکی ساوه، ۱۴۰۴؛ ۱(۱): ۱۲-۲۵.

doi: 10.22034/jsavhums.2025.225628

مقدمه

بررسی خصوصیات کمی و کیفی کروموزوم‌ها از دیرباز مورد توجه متخصصان ژنتیک بوده و باعث شده که خط اول بررسی‌های ژنتیکی، ارزیابی آن‌ها توسط کاربوتایپ استاندارد^۱ باشد. CK تصویری از کروموزوم‌ها را به منظور بررسی تغییرات ساختاری (≥ 3) (5 Mb) و عددی^۲ ارائه می‌دهد (۱-۳). ارزیابی کل ژنوم و شناسایی و توصیف دقیق ناهنجاری‌های کروموزومی توسط CK برای مدیریت بیماری، تعیین وجود کلون بدخیم، تشخیص^۳، پیش‌آگهی^۴، طبقه‌بندی خطر^۵، انتخاب رویکردهای درمانی مناسب، نظارت بر پاسخ به درمان، ارزیابی مدت‌زمان بهبودی، بررسی بقا^۶ و برای حمایت از تحقیقات بیشتر حیاتی است (۲-۴). حضور تعداد کافی از سلول‌های زنده و فعال با قابلیت تکثیر بالا^۷ از جمله شروط لازم و اساسی برای انجام CK است، بنابراین علی‌رغم پتانسیل و خصوصیات منحصربه‌فرد CK، این فن در برابر نمونه‌های هیپوسولولار نظیر نمونه خون نوزادان، کودکان و سندرم‌های میلودیس پلاستیک^۸ و نیز ناهنجاری‌های کند رشد که تکثیر و MI کمی دارند مثل لوسمی لنفوسیتی مزمن^۹ و مالتیپل میلوما^{۱۰} با محدودیت مواجه است (۵-۸). اصلاحاتی نظیر استفاده از کلسمید^{۱۱}، اتدیوم بروماید^{۱۲}، اکتینومایسین^{۱۳} D, Hoechst 33258 و موارد بسیار دیگری برای بهبود نتایج کاربوتایپ به کار گرفته شده است (۹). اگرچه که اصلاحات مذکور نقش به‌سزایی در بهینه شدن نتایج CK داشته است، اما این فن همچنان با محدودیت مواجه است چراکه هیچ‌یک از این اصلاحات به مسئله محرومیت سلول‌های خارج شده از بدن از شرایط به‌شدت پیچیده و مناسبی که در داخل بدن^{۱۴} برای سلول‌ها مهیاست، نظیر نقش ریز محیط مغز استخوان^{۱۵} در ماندگاری و تبدیل کلون‌های پیش‌لوکمیک به سلول‌های

لوکمیک، تعاملات متقابل بین سلول‌های لوکمیک و BME، حضور سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها، فاکتورهای رشد، وزیکول‌های خارج سلولی، هورمون‌ها، ویتامین‌ها و مسیرهای مولکولی که بر بقا، رشد، مقاومت به ترکیبات شیمیایی، خواص مهاجرتی و تهاجمی سلول‌های لوکمیک تأثیرگذارند توجه نکرده‌اند (۱۰، ۱۱). از طرفی دیگر استرس وارده به سلول‌ها در حین خروج از بدن باعث آسیب به برخی از سلول‌ها می‌شود. سلول‌های آسیب‌دیده بایستی برای زنده ماندن و ازسرگیری رشد قادر به ترمیم آسیب‌های وارده به خود باشند و بتوانند طی فرایند مهیاسازی خود را با تغییرات محیطی جدید منطبق سازند این در حالی است که محیط‌های کشت مورد استفاده در مقایسه با *in vivo* بسیار ناکارآمد^{۱۶} می‌باشند و توانایی حمایت همه‌جانبه از سلول‌ها را ندارد (۱۲، ۱۳). سلول‌های کشت‌شده گاهی به افزودن فاکتورهای رشد خاص نیاز دارند تا تکثیر، تمایز یا بقا را از سر گیرند. باین حال، استفاده از برخی پروتئین‌های نو ترکیب امکان‌پذیر نیست چراکه ساخت آن‌ها دشوار و پرهزینه است و یا در مقادیر زیاد مورد نیازند. فاکتورهای مهیاسازی^{۱۷} فاکتورهای مهمی هستند که توسط سلول‌های فعال و در حال رشد ترشح می‌شوند و باعث بهبود رشد سایر سلول‌ها، افزایش تعاملات بین سلولی و نیز اتصال آن‌ها به بستر می‌شوند. وجود این فاکتورها در زمانی که تعداد سلول‌ها اندک است یا سلول‌ها دچار آسیب و استرس ناشی از نمونه‌گیری شده‌اند اهمیت بسزایی دارد. محیط مهیاسازی^{۱۸} از برداشت مایع رویی محیط کشت سلول‌هایی که در فاز رشد لگاریتمی هستند حاصل می‌شود. فاکتورهای موجود در این محیط با فراهم کردن احتیاجات سلولی در محیط کشت نظیر آگروزوم‌ها، آنزیم‌ها، فاکتورهای رشد، سایتوکاین‌ها، هورمون‌ها و سایر مدیاتورهای محلول و از طریق

¹⁰ Multiple Myeloma, MM

¹¹ Colcemid

¹² Ethidium Bromide

¹³ Actinomycin D

¹⁴ In Vivo

¹⁵ Bone Marrow Micro Environment, BME

¹⁶ Insufficient

¹⁷ Conditioning Factors

¹⁸ Conditioning Media, CM

¹ conventional karyotype, CK

² numerical and structural aberrations

³ Diagnosis

⁴ Prognosis

⁵ Risk Stratification, RS

⁶ Survival

⁷ Highly Proliferative

⁸ Myelodysplastic Syndrome, MDS

⁹ Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL

جدول ۱ خصوصیات جمعیت شناختی شرکت کنندگان در مطالعه بر اساس سن و جنس

Subjects	Sex	(years) Age
1	M	60
2	M	55
3	F	65
4	M	49
5	M	78
6	F	64
7	F	56
8	M	73
9	M	66
10	F	69
11	M	53
12	F	49
13	F	50
14	M	78
15	M	65
16	F	63
17	F	52
18	M	68
19	F	50
20	M	43

Abbreviations: M: Male, F: Female

روش تهیه CM

تعداد ۱۰ داوطلب به ظاهر سالم با شمارش طبیعی گلبول‌های سفید خون^۲ انتخاب شدند و از هر داوطلب ۵ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی در لوله‌های ونوجکت^۳ سبز تهیه شد. نمونه‌ها با محیط RPMI1640 و توسط سانتریفیوژ (8/1800 rpm/37°C) شست‌وشو داده شدند و باقی‌کوت جدا شد. سپس به ۲ لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتر، ۹.۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل و ۵۰۰ میکرولیتر باقی‌کوت اضافه شد و لوله‌ها با زاویه مورب به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور مرطوب (5% CO₂/37°C) قرار داده شدند و در انتها جمع‌آوری محیط کشت نمونه‌ها با سانتریفیوژ (8/1800 rpm/37°C) صورت گرفت، محلول رویی^۴ برداشت شد و پس از فیلتراسیون در ۲۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تنظیم برهمکنش‌های سلول به سلول و سلول به ماتریکس خارج سلولی در فرآیندهای رشد سلولی، تمایز، بازسازی، تهاجم و رگزایی نقش اساسی دارند (۱۰، ۱۱، ۱۳-۱۷). از آنجایی که محیط کشت مورد استفاده در کاربوتایپ در برابر نمونه‌های کم سلول^۱، کند رشد و آسیب‌دیده بسیار ناکارآمد است، ما در این مطالعه از CM برای بهینه‌سازی مرحله کشت کاربوتایپ استفاده کردیم تا با شبیه‌سازی شرایطی مشابه آنچه در بدن مهباست، احتیاجات سلولی را برای بقا، رشد و تکثیر سلولی فراهم آوریم.

روش

نمونه‌ها

مطالعه‌ی کاربردی حاضر بر روی خون محیطی ۱۰ داوطلب مبتلا به لکوپنی و ۱۰ داوطلب به ظاهر سالم با شمارش طبیعی گلبول‌های سفید، که به بیمارستان شهدای تجریش (تهران، ایران) مراجعه کرده بودند، از گروه‌های مختلف سنی و هر دو جنس انجام شد (کد اخلاق: IR.SBMU.RETECH.REC.1402.014). از هر داوطلب، ۵ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی در لوله‌های ونوجکت حاوی هپارین تهیه گردید (جدول ۱).

روش تهیه محیط کشت کامل

برای هر بیمار دو کشت استاندارد (A & B) و دو کشت مداخله (C & D) توسط CM انجام شد. برای ساخت ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل برای هر بیمار، ۲۴ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI1640 (Gibco, USA) با ۶ میلی‌لیتر FBS (Fetal bovine serum, Gibco, USA) مخلوط شد و ۷۵۰ میکرولیتر PHA (Phytohemagglutinin, Gibco, USA) و ۱ درصد pen/strep (Penicillin/streptomycin, Gibco, USA) به محیط کشت اضافه شد (۱۲).

⁴ Supernatant

¹ Hypo Cellular

² White Blood Cells, Wbcs

³ Venoject

روش انجام CK

به‌طور کلی مراحل اصلی انجام CK شامل نمونه‌گیری^۱، کشت^۲، برداشت^۳، آماده‌سازی اسلاید^۴، آگیری^۵، رنگ‌آمیزی با گیمسا-نواربندی^۶ و آنالیز^۷ کروموزومی است (۱۲، ۱۸).

نمونه‌گیری

از ۱۰ داوطلب مبتلا به لنفوبنی^۸ و ۱۰ داوطلب به‌ظاهر سالم مراجعه‌کننده به بیمارستان شهدای تجریش از گروه‌های مختلف سنی و از هر دو جنس ۵ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی در لوله‌های ونوجکت سبز تهیه شد.

کشت

نمونه‌های هپارینه با RPMI1640 و سانتریفیوژ (8 rpm/1800 min/37°C) شست‌وشو و سپس بافی کوت آن‌ها جدا شد. به لوله‌های فالكون کشت استاندارد (A & B)، ۹.۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل و ۵۰۰ میکرولیتر بافی کوت و به لوله‌های فالكون کشت مداخله (C & D) (intervention cultures)، ۴.۷۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل، ۴.۷۵ میلی‌لیتر CM و ۵۰۰ میکرولیتر بافی کوت اضافه شد. سپس لوله‌ها به شکل مورب به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور مرطوب (5% CO₂/ 37°C) قرار داده شدند و پس از گذشت مدت‌زمان کشت، ۱۰۰ میکرولیتر کلسمید^۹ (Gibco, USA) به نمونه‌ها اضافه شد و پس از گذشت ۲۱ دقیقه انکوباسیون در انکوباتور، مرحله برداشت شروع شد.

برداشت

دو رکن اساسی در مرحله برداشت یعنی متورم کردن سلول‌ها^{۱۰} با استفاده از محلول هیپوتون، KCL (0.075 M, Merck)

(Germany) و سخت کردن غشای سیتوپلاسمی سلول‌ها^{۱۱} با استفاده از محلول فیکساتیو کارنوی متشکل از ۳ واحد متانول (Merck, Germany) و یک واحد اسید استیک (Merck, Germany) انجام شد. بدین منظور بر روی لوله‌های کشت استاندارد و کشت مداخله سانتریفیوژ اول (8 rpm/1500 min/37°C) انجام شد. سپس محلول رویی خارج گشت و ۱۲ میلی‌لیتر محلول KCL (0.56 gr, 37°C) به آرامی به نمونه‌ها اضافه شد. مخلوط حاصله^{۱۲} با سر و ته کردن نمونه‌ها به‌خوبی یکنواخت شد و به مدت ۱۴ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گشت. سپس به هر لوله ۱۴-۱۲ قطره فیکساتیو تازه و خنک کارنوی اضافه شد و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۲- درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ دوم (5°C/-8 min/1600 rpm) انجام شد. محلول رویی دور ریخته شد، نمونه‌ها به آرامی مخلوط شدند و ۶ میلی‌لیتر فیکساتیو خنک به آن‌ها اضافه شد. نمونه به‌خوبی مخلوط شد و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در ۲۲- درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ سوم (5°C/-8 min/1700 rpm) انجام شد. سپس محلول رویی خارج گشت و مجدداً ۶ میلی‌لیتر فیکساتیو به نمونه‌ها اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۲- درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ چهارم (5°C/-8 min/1800 rpm) انجام شد. تکرار مرحله آخر تا زمان حذف گلبول‌های قرمز خون^{۱۳} و شیری شدن سوسپانسیون ادامه داشت. سپس به نمونه‌ها ۶ میلی‌لیتر فیکساتیو اضافه شد و یک‌شب تا صبح^{۱۴} انکوباسیون در دمای ۲۲- درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

آماده‌سازی اسلاید

سه رکن اساسی موردتوجه و مناسب برای ساخت اسلایدها، دمای محیط زیر ۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰-۳۵ درصد و زاویه مورب لام‌ها بود. در این مرحله لام‌هایی که از چند

⁹ Colcemid

¹⁰ Swelling

¹¹ Hardens Membrane

¹² Mixture

¹³ Red Blood Cells, Rbcs

¹⁴ Overnight

¹ Sampling

² Culture

³ Harvest

⁴ Slide Making

⁵ Aging

⁶ G-Banding

⁷ Analysis

⁸ Lymphopenia

سنجش تکثیر سلولی^۳ با رنگ آمیزی Ki-67

آنتی‌ژن هسته‌ای Ki-67 به‌عنوان نشانگری برای تکثیر سلولی عمل می‌کند. در این مطالعه به‌منظور بررسی تأثیر CM بر تکثیر لنفوسیت‌ها، سنجش تکثیر سلولی با رنگ‌آمیزی Ki-67 صورت گرفت. بدین ترتیب که پس از گذشت مدت‌زمان کشت سلولی، سلول‌های گروه کشت استاندارد و کشت مداخله شست‌وشو داده شدند و سپس با ۱۰ میکرولیتر آنتی-بادی Ki-67 FITC مجاور شدند و در آخر پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، توسط فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار فلوجو (v.10.5.3) تجزیه و تحلیل شدند.

ارزیابی چرخه سلولی

برای بررسی تأثیر CM بر تکثیر سلول‌های گروه کشت استاندارد و کشت مداخله، ارزیابی چرخه سلولی با اندازه‌گیری محتوای DNA سلولی و با استفاده از روش فلوسیتومتری صورت گرفت. بدین ترتیب که پس از گذشت ۷۲ ساعت از زمان کشت، شست‌وشو با PBS و مجاورت با ۵۰ میکرولیتر PBS سرد، 3×10^5 سلول از هر دو گروه کشت استاندارد و کشت مداخله توسط ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد تثبیت شدند. پس از سانتریفیوژ، حذف اتانول و شست‌وشو با PBS، ۱ میلی‌لیتر محلول مستر میکس PI به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. نتایج با نرم‌افزار فلوجو تجزیه و تحلیل شدند.

ارزیابی آپوپتوز^۴

میزان آپوپتوز سلولی توسط کیت Annexin V FITC apoptosis detection (Bioscience annexin V apoptosis detection kit) ارزیابی شد. بدین ترتیب که پس از گذشت ۷۲ ساعت از زمان کشت، 3×10^5 سلول از هر دو گروه کشت استاندارد و کشت مداخله با استفاده از سانتریفیوژ برداشت

روز قبل داخل فیکساتیو و داخل فریزر نگهداری شده بودند توسط دستمال نانو کاملاً پاک شدند. سپس پس از رسیدن دمای محیط به زیر ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت به ۳۵-۴۰ درصد، از سوسپانسیون شیری‌رنگ هر بیمار ۳-۵ قطره بر روی لام‌های مورب چکانده شد و لام‌ها به‌صورت افقی خشک شدند.

آبگیری و رنگ‌آمیزی با گیمسا

برای آبگیری، لام‌ها به مدت سه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یک‌شب در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد باقی ماندند تا آماده مرحله نواربندی^۱ شوند. در مرحله G-banding از آنزیم تریپسین (Gibco, USA) برای هیدرولیز محتویات پروتئینی کروموزوم‌ها، FBS برای خنثی کردن تریپسین، نرمال سالین برای خاصیت ایزوتونیسیته آن و مخلوط Gurr buffer (Gibco, USA) و رنگ گیمسا (Merck, Germany) برای رنگ‌آمیزی استفاده شد.

آنالیز

لام‌های مونت شده گروه کشت استاندارد و گروه کشت مداخله در زیر میکروسکوپ نوری از لحاظ تعداد کل سلول‌ها، تعداد سلول‌های میتوتیک و کمیت و کیفیت متافازها مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی شاخص میتوزی^۲

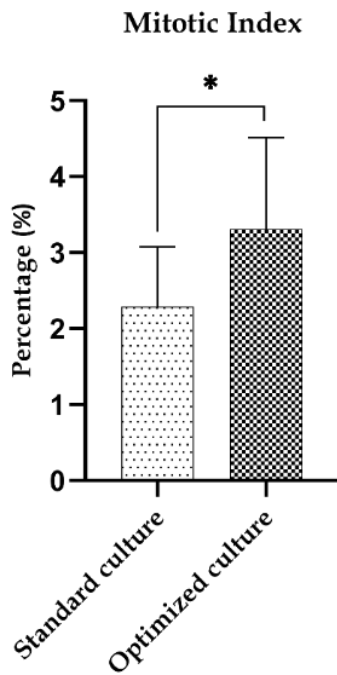
شاخص میتوزی پارامتری برای بررسی تکثیر سلولی است. پس از سپری شدن ۷۲ ساعت از کشت سلولی، برای ارزیابی MI در هر دو گروه کشت استاندارد و کشت مداخله، تعداد سلول‌هایی که در حال میتوز بودند بر تعداد کل سلول‌ها تقسیم شدند و نتیجه به‌صورت درصد گزارش شد.

³ Proliferation Assay

⁴ Apoptosis Assay

¹ Banding

² Mitotic Index (Mi) Assay



شدند. سپس ۵ میکرولیتر از محلول رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC به نمونه‌ها اضافه شد و مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در

دمای اتاق و تاریکی انکوبه شد. پس از آن نمونه‌ها با PI^1

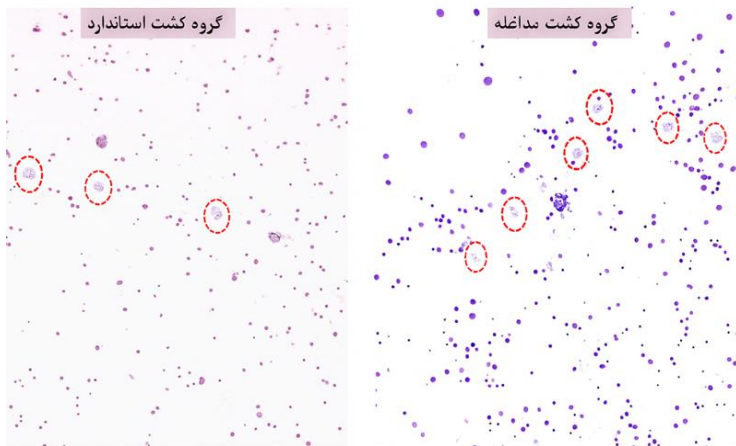
رنگ‌آمیزی شدند و در انتها برای پایان دادن به واکنش، ۴۰۰ میکرولیتر از 1X binding buffer به هر لوله اضافه شد و مخلوط بلافاصله توسط فلوسیتومتری آنالیز گشت. نتایج با نرم‌افزار فلوجو تجزیه و تحلیل شدند.

آنالیز آماری

همه آزمون‌ها به‌طور مستقل سه بار تکرار شدند تا از پایداری یافته‌ها اطمینان حاصل شود. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) (نسخه ۸.۴.۲) انجام شد. داده‌ها با Unpaired t test ارزیابی و سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

باعث تغییر شاخص میتوزی در گروه کشت مداخله شد:



شکل ۱. ارزیابی MI (A and B). افزایش میزان MI در گروه کشت مداخله در مقایسه با گروه کشت استاندارد. * مقدار $p < 0.05$

برای ارزیابی تأثیر CM بر تکثیر سلولی، MI با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. میزان MI در گروه کشت مداخله نسبت به گروه کشت استاندارد بالاتر بود و آنالیز آماری با Unpaired t test با گزارش $P = 0.04$ این افزایش را معنی‌دار نشان داد (جدول ۲، شکل ۱، A and B).

جدول ۲. اندازه‌گیری شاخص میتوزی در گروه کشت استاندارد و کشت مداخله

Mitotic Index	Groups	Mean \pm SD	P-value
	Standard culture	2.3 \pm 0.79	
	Intervention (optimized) culture	3.3 \pm 1.21	0.04

¹ Propidium Iodide

جدول ۲. توالی‌های primers برای تجزیه و تحلیل بیان ژن

Groups	Mean \pm SD	Pvalue
Ki-67	Standard culture	1.4 \pm 0.30
	Intervention (optimized) culture	1.8 \pm 0.33

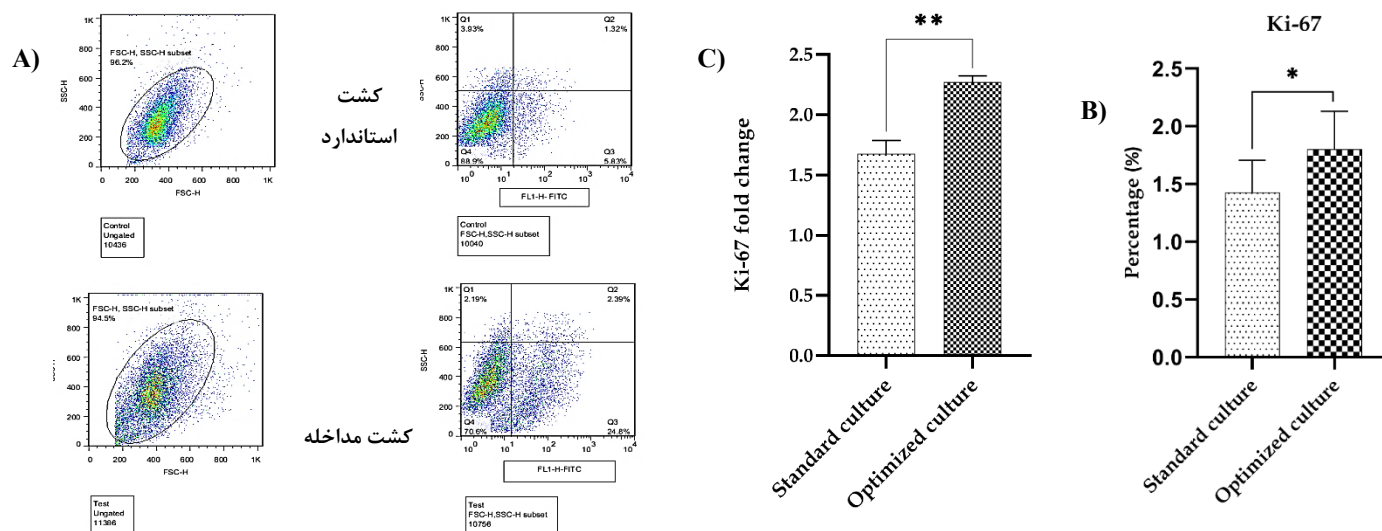
Abbreviations: F: Forward, R: Reverse, GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Bcl2: B-cell lymphoma 2, Bax: Bcl-2-associated X-protein

CM باعث تغییر در سطح Ki-67 در گروه کشت مداخله شد:

برای بررسی تأثیر CM بر ظرفیت تکثیر سلول‌ها، بیان Ki-67 با استفاده از آنالیز فلوسیتومتری مطالعه شد. در این ارزیابی سطح Ki-67 در گروه کشت مداخله، 1.8 ± 0.33 و در گروه کشت استاندارد (1.4 ± 0.30) بود. آنالیز آماری با گزارش $P=0.01$ ، این افزایش را معنی‌دار نشان داد. همچنین داده‌های RT-qPCR نیز نشان داد که سلول‌های گروه کشت مداخله نسبت به گروه کشت استاندارد با $P=0.01$ افزایش معنی‌دار در سطح بیان Ki-67 را نشان می‌دهند (جدول ۲) (شکل ۲).

جدول ۳. آنالیز فلوسیتومتری بیان Ki-67 در گروه‌های مختلف کشت استاندارد و کشت مداخله

No.	Gene NCBI ID	Primer (length) location	Amp Lth	> NM_
1	GAPDH Gene ID: 2597	F: TGTTGCCATCAATGACCCCTT R: CTCCACGACGTACTCAGCG	202	>NM_002046.7
2	Ki-67 Gene ID: 4288	F: TCCTTTGGTGGGCACCTAAGACCTG R: TGATGGTTGAGGTCGTTTCCTTGATG	156	>NM_002417.5
3	Bcl2 Gene ID: 596	F: GATAACGGAGGCTGGGATGC R: GCAGGCATGTTGACTTCACTTG	165	>NM_000633.3
4	Bax Gene ID: 581	F: GGAGCGCGGTGATGGAC R: CGATCCTGGATGAAACCCTGAAG	113	>NM_001291428.2



شکل ۲. ارزیابی سطح Ki-67. افزایش سطح Ki-67 در گروه کشت مداخله در مقایسه با گروه کشت استاندارد. (A and B) آنالیز فلوسیتومتری.

(C) آنالیز RT-qPCR. مقدار $p < 0.05$. مقدار $p < 0.01$

CM باعث تغییر در آپتوز در گروه کشت مداخه شد:

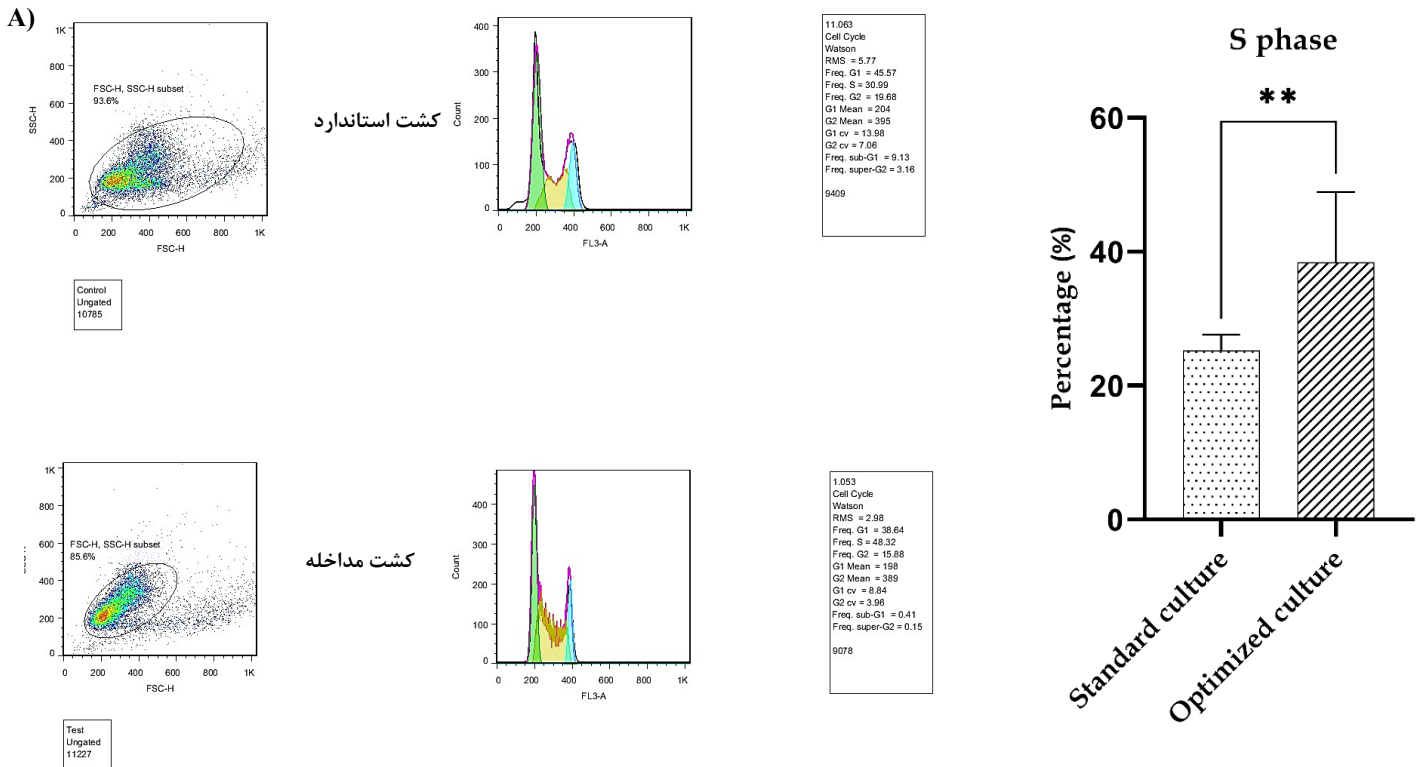
برای ارزیابی اثر CM بر آپتوز سلولی، رنگ‌آمیزی Annexin V FITC/PI انجام شد. نتایج فلوسیتومتری کاهش آپتوز دیررس را در گروه کشت مداخه نسبت به گروه کشت استاندارد نشان داد. آنالیز آماری با $P < 0.001$ این کاهش را معنی‌دار گزارش کرد. به‌منظور تأیید میزان آپتوز، میزان بیان ژن‌های BCL2 و BAX با استفاده از RT-qPCR بررسی شد. هم‌راستا با نتایج فلوسیتومتری، نتایج تجزیه‌وتحلیل RT-qPCR نیز افزایش در سطح بیان BCL-2 ($P=0.025$) همراه با کاهش بیان BAX را در گروه کشت مداخه نسبت به گروه کشت استاندارد نشان داد ($P=0.014$) (جدول ۳، جدول ۶، شکل ۴)

CM باعث تغییر در فاز S چرخه سلولی در گروه کشت مداخه شد:

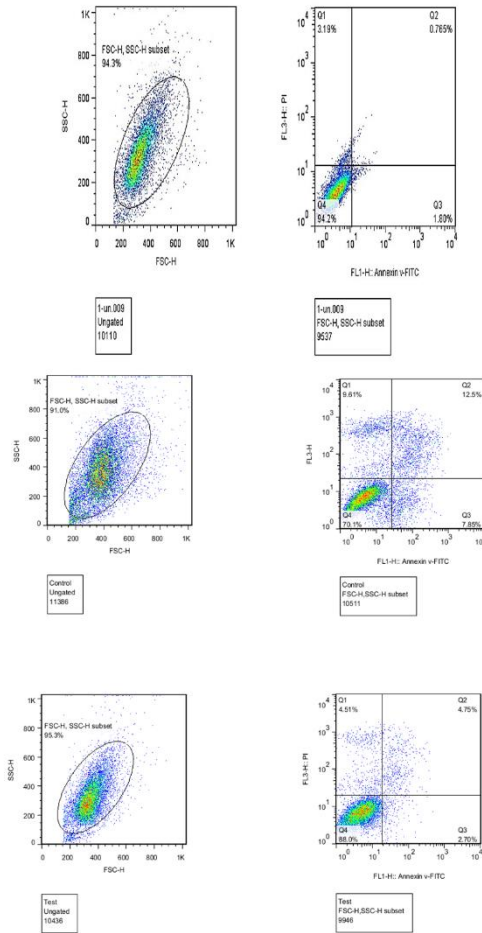
پس از بررسی محتوای DNA سلول‌ها با استفاده از فلوسیتومتری، افزایش در فاز S چرخه سلولی در گروه کشت مداخه نسبت به گروه کشت استاندارد دیده شد ($P=0.001$) (جدول ۴، شکل ۳).

جدول ۴. آنالیز فلوسیتومتری چرخه سلولی با تأکید بر فاز S در گروه‌های مختلف کشت استاندارد و کشت مداخه

S phase	Groups	Mean ± SD	P
	Standard culture	25.2 ± 2.38	0.001
	Intervention (optimized) culture	38.4 ± 10.50	



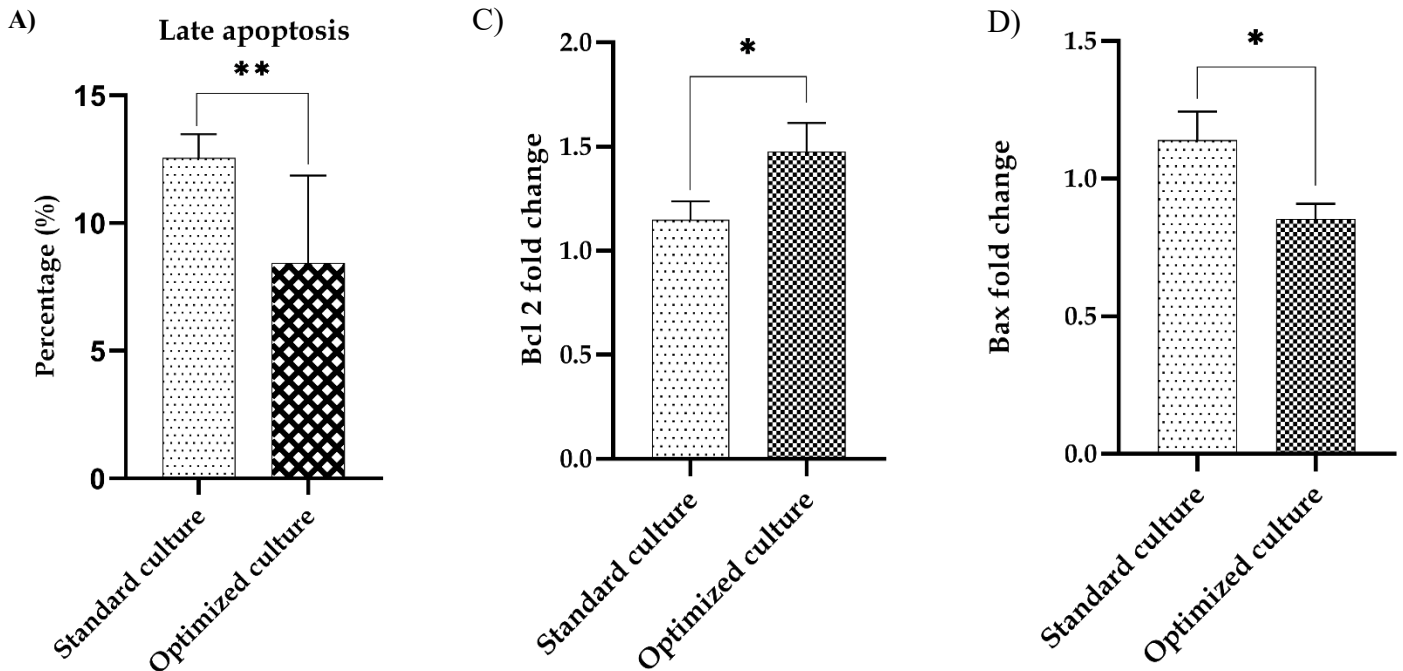
شکل ۳. ارزیابی چرخه سلولی. (A and B) افزایش فاز S چرخه سلولی در گروه کشت مداخه در مقایسه با گروه کشت استاندارد با آنالیز فلوسیتومتری. **: مقدار $p < 0.01$



جدول ۵. آنالیز جامع آپوپتوز از طریق فلوسیتومتری و RT-qPCR

Late apoptosis	Flow cytometry analysis		
	Groups	Mean ± SD	Pvalue
Bcl2	Standard culture	12.55 ± 0.93	< 0.001
	Intervention (optimized) culture	8.4 ± 3.43	
Bax	Standard culture	1.14 ± 0.09	0.025
	Intervention (optimized) culture	1.48 ± 0.14	
Bax	Standard culture	0.10 ± 0.06	0.014
	Intervention (optimized) culture	0.05 ± 0.03	

Abbreviation: Bcl2: B-cell lymphoma 2, Bax: Bcl-2-associated X-protein



شکل ۴. آنالیز آپوپتوز. A and B) کاهش آپوپتوز در گروه کشت مداخله در مقایسه با گروه کشت استاندارد با آنالیز فلوسیتومتری. C) افزایش سطح بیان Bcl2 در گروه کشت مداخله در مقایسه با گروه کشت استاندارد با آنالیز RT-qPCR. D) کاهش سطح بیان Bax در گروه کشت مداخله در مقایسه با گروه کشت استاندارد با آنالیز RT-qPCR. * مقدار $p < 0.05$, ** مقدار $p < 0.01$

بحث

وابستگی فن کاربوتایپ به حضور تعداد کافی از سلول‌های زنده با قابلیت تکثیر بالا باعث شده است که این فن ارزشمند که خط اولیه تشخیص را به خود اختصاص می‌دهد با محدودیت مواجه باشد زیرا در مواردی که تعداد سلول‌ها به علل مختلف فیزیولوژیکی و یا پاتولوژیکی کم است و به تبع آن تعاملات لازم بین سلول‌های موجود در محیط کشت برقرار نمی‌شود و یا به علت عدم حضور سلول‌های استرومایی و فاکتورهای محلول حامی رشد، با کاهش تکثیر و یا افزایش آپوپتوز همراه می‌باشند (۱۰، ۱۱) و نیز در مواردی که ماهیت سلول مورد بررسی کند رشد است و از تکثیر مورد نیاز برای CK برخوردار نمی‌باشند، این فن با شکست مواجه شود (۲، ۶-۸) و در نتیجه از بررسی کل ژنوم و ارائه اطلاعات فوق‌العاده مهم ژنتیکی که در تشخیص، پیش‌آگهی و طبقه‌بندی خطر نقش مهمی را دارند ناکام بماند (۳). از آنجایی که مطالعات گسترده‌ای بر اهمیت تعاملات سلول‌ها با یکدیگر و بر ظرفیت فاکتورهای محلول مترشحه از سلول‌ها جهت حمایت از حفظ بقا، افزایش تکثیر و کاهش آپوپتوز تأکید کرده‌اند (۱۰، ۱۱) ما در این مطالعه سعی کردیم تا با شبیه‌سازی محیط کشت سلول‌ها به ریز محیط مغز استخوان، رشد سلول‌ها را به منظور یک کاربوتایپ موفق بهبود بخشیم، بنابراین از CM برای بهینه کردن شرایط محیط کشت بیماران مبتلا به لنفوبنی که هم شرط کافی بودن تعداد سلول و در نتیجه تکثیر کافی را نقض می‌کردند و هم احتمال وقوع آپوپتوز ناشی از عدم وجود تعاملات لازم و کافی را در پی داشتند و در نتیجه CK را در معرض خطر شکست قرار می‌دادند استفاده کردیم. نتایج پژوهش درصد بالایی از کشت‌های موفق همراه با افزایش بقا، افزایش MI، افزایش تکثیر و کاهش آپوپتوز که به یک کاربوتایپ موفق منجر می‌شود را در گروه کشت مداخله نسبت به گروه کشت استاندارد نشان داد که احتمالاً علت آن

غنی شدن محیط کشت سلول‌ها به واسطه حضور فاکتورهای مؤثر در سازگار شدن لنفوسیت‌ها با شرایط محیطی جدید، فاکتورهای دخیل در ترمیم سلول‌های آسیب‌دیده و فاکتورهای محرک رشد و بقا و مهار آپوپتوز در CM بوده است. در همین راستا در مطالعه‌ای که از پلاسما غنی از پلاکت^۱ جهت بهینه‌سازی کشت سلول‌های لنفوسیتی برای انجام کاربوتایپ استفاده شد، کیفیت بهتر کروموزوم‌ها و کمیت بیشتر آن‌ها در تصاویر نهایی اسلایدهای کشت بهینه‌شده نسبت به کشت استاندارد مشاهده شد (۵). به علاوه Pawitan et al. با حذف FBS از محیط کشت سلول‌های انسانی و افزودن پلاکت‌های حاصل از روش PRP به محیط کشت توانست کشت سلول‌های بنیادی مشتق‌شده از مغز استخوان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی و بافت چربی را بهبود بخشد و به تعداد بیشتری از سلول‌های کشت‌شده دست یابد (۱۷). همچنین نتایج مطالعه Frutos et al. برای بهبود رشد سلولی در شرایط آزمایشگاهی و به منظور افزایش تشخیص انحرافات کروموزومی در مالتیپل میلوما^۲ نشان داد که در کشت‌های تحریک‌شده با IL-2/IL-10/DSP30 نسبت به کشت‌های استاندارد، میزان موفقیت کشت، تشخیص ناهنجاری‌های کروموزومی، تعداد سلول‌های میتوتیک و تفکیک‌پذیری باندهای کروموزومی^۳ به‌طور قابل‌توجهی بالاتر است (۶). Qdiasat et al. نشان دادند که در بیماران لوسمی مزمن لنفوسیتی^۴ شاخص میتوزی در کشت‌های BM تحریک‌شده با IL-2/CPG هفت برابر بیشتر از کشت استاندارد BM با LPS بود، این در حالی بود که در G-banding و نتایج SKY تفاوت معنی‌داری بین کشت‌های تحریک‌شده و کشت مغز استخوان با LPS^۵ دیده نشد (۷). به علاوه کارگر و همکاران جهت بهینه‌سازی محیط کشت سلول‌های استرومایی مزانشیمی^۶ از وزیکول‌های خارج سلولی مشتق از لوسمی حاد میلو بلاستی^۷ استفاده کردند. نتایج این مطالعه افزایش بقا و تکثیر سلولی و کاهش آپوپتوز را در MSCs تیمار شده با

^۱ LPS BM culture

^۲ Mesenchymal Stromal Cells, Mscs

^۳ Acute Myeloblastic Leukemia (AML)-Derived Extra Cellular Vesicles, AML-Evs

^۱ Platelet Rich Plasma, PRP

^۲ Multiple Myeloma, MM

^۳ Banding Resolution

^۴ Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL

تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در تهران، ایران پشتیبانی شد. همچنین ما صمیمانه از حمایت های بی دریغ جناب آقای دکتر محسن احسان و تیم حرفه ای ایشان در آزمایشگاه ژنتیک پزشکی مجتمع پزشکی تخصصی جواد الائمه در دانشگاه علوم پزشکی کرمان قدردانی می کنیم. ما صمیمانه از افرادی که با اهدای خون خود در این تحقیق مشارکت داشتند، سپاسگزاریم.

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (IR.SBMU.RETECH.REC.1402.014) تأیید شده است.

کد اخلاق

پژوهش حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (IR.SBMU.RETECH.REC.1402.014) تأیید شده است.

تضاد منافع و منابع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

حمایت مالی

این مطالعه تحت حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (تهران، ایران) انجام شد.

سهم نویسندگان

مهدی اله بخشیان فارسانی: طرح ایده، پاسخ به داوری، ب.ک.د: طرح ایده، گردآوری اطلاعات، تجزیه و تحلیل آماری، نگارش مقاله، ارسال مقاله، پاسخ به داوری.

AML-EVs (40µg/mL, 48h) نشان داد و EVs های ایزوله شده از پلاسمای بیماران مبتلا به AML را به عنوان فاکتوری کلیدی در افزایش پرولیفراسیون، کاهش آپوپتوز، القای مقاومت به شیمی درمانی و عود در بیماران AML معرفی کرد (۱۹). همچنین در مطالعه مولودی ززرگر و همکاران مشخص شد که myeloma-EVs با انتقال mir-21 و mir146a باعث افزایش پرولیفراسیون MSCs، تولید IL-6 و تبدیل فیبروبلاست مرتبط با سرطان^۱ می شوند (۲۰). ما نیز در مطالعه قبلی مان، افزایش بقا، رشد و تکثیر و نیز کاهش آپوپتوز BM-MSc های تیمار شده با اگزوزوم های مشتق از رده سلولی HL-60 در لوسمی حاد پرومیلوسیتیک^۲ و رده سلولی NALM-6 در لوسمی حاد لنفوبلاستیک^۳ را در مقایسه با گروه کنترل مشاهده کردیم (۲۱-۲۳).

نتیجه گیری

توسعه روش هایی که می توانند محیط کشت را بهینه کنند، در ابعاد مختلف پزشکی و داروسازی بسیار مهم است. مطالعات بسیاری سعی کرده اند تا شرایطی مشابه آنچه در بدن رخ می دهد را در شرایط آزمایشگاهی فراهم آورند؛ اما نکته قابل توجه اینجاست که مداخله در محیط کشت نباید باعث برهم زدن هماهنگی کاملاً تنظیم شده بین تعداد کلون های نرمال و بدخیم شود و بنابراین نباید با تحریک تولید کلونی خاص، موجب پنهان شدن کلونی دیگر شود. نتایج مطالعه ما CM را که حاوی فاکتورهای فوق العاده مهم مترشحه از سلول ها با همان تعادل موجود در بدن است گزینه مناسبی معرفی می کند؛ چراکه با شبیه سازی in vivo در in vitro هم منجر به حمایت از رشد و تکثیر و بقا سلول ها می شود و همچون فاقد سلول است نیازی به تطبیق دهنده و گیرنده نیست. استفاده از آن آسان و مقرون به صرفه است و سهولت در تولید، خشک کردن (freeze-dried)، بسته بندی و حمل و نقل از دیگر مزایای آن است.

³ acute lymphoblastic leukemia, ALL

¹ cancer-associated fibroblast (CAF) transformation

² acute promyelocytic leukemia, APL

الهام جفایی: گردآوری اطلاعات، ویرایش.
مژگان امیرپور: گردآوری اطلاعات، ویرایش.

مریم پناهی: گردآوری اطلاعات، ویرایش.
امیرعباس نویدی نیا: نگارش مقاله، ویرایش.
حمیده رحمانی سراجی: طرح ایده، گردآوری اطلاعات.

References:

1. Kato TA. Metaphase chromosome preparation and classification of chromosomal aberrations. *Chromosome Analysis: Methods and Protocols*: Springer; 2022. p. 9-15.
2. Zneimer SM. Cytogenetic abnormalities: chromosomal, FISH, and microarray-based clinical reporting and interpretation of result: John Wiley & Sons; 2014.
3. Arsham MS, Barch MJ, Lawce HJ. *The AGT cytogenetics laboratory manual*: John Wiley & Sons; 2017.
4. Prakash G, Kaur A, Malhotra P, Khadwal A, Sharma P, Suri V, et al. Current role of genetics in hematologic malignancies. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2016;32:18-31.
5. Shams A, Ayat H, Ahadi AM. Optimization of Lymphocyte Cell Culture for Karyotype Using a Platelet-rich Plasma Method. *Navid No*. 2019;22(70):45-58.
6. López de Frutos L, Álvarez Y, Armengol G, Caballín MR. New mitogens in cultures for multiple myeloma cytogenetic analysis. *Leukemia & Lymphoma*. 2013;54(11):2548-50.
7. Qdaisat S, Zhao M, Qdaisat A, Allen EH, Qdaisat T, Gu J, et al. Bone marrow cultures stimulated with IL-2/CpG oligonucleotide benefits chromosomal aberration detection of CLL patients when compared with standard culture. *J Assoc Genet Technol*. 2014;40:219-22.
8. Heerema NA. Cytogenetic analysis of hematologic malignant diseases. *The AGT cytogenetics laboratory manual*. 2017:499-575.
9. Rønne I. Chromosome preparation and high resolution banding techniques. A review. *Journal of dairy science*. 1989;72(5):1363-77.
10. Pinho S, Zhao M. Hematopoietic Stem Cells and Their Bone Marrow Niches. *Hematopoietic Stem Cells: Keystone of Tissue Development and Regenerative Medicine*: Springer; 2024. p. 17-28.
11. Omatsu Y. Cellular niches for hematopoietic stem cells in bone marrow under normal and malignant conditions. *Inflammation and Regeneration*. 2023;43(1):15:(
12. Freshney R. *A manual of basic techniques. Culture of animal cells* Wiley-Liss Inc. 1994:255-65.
13. Sriramulu S, Banerjee A, Di Liddo R, Jothimani G, Gopinath M, Murugesan R, et al. Concise review on clinical applications of conditioned medium derived from human umbilical cord-mesenchymal stem cells (UC-MSCs). *International journal of hematology-oncology and stem cell research*. 2018;12(3):230.
14. Dowling P, Clynes M. Conditioned media from cell lines: A complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics*. 2011;11(4):794-804.
15. Shen C, Lie P, Miao T, Yu M, Lu Q, Feng T, et al. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Molecular medicine reports*. 2015;12(1):20-30.
16. Ghiasi M, Hashemi M, Salimi A, Jadidi K, Tavallaie M, Aghamollaei H. Combination of natural scaffolds and conditional medium to induce the differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into keratocyte-like

cells and its safety evaluation in the animal cornea. *Tissue and Cell*. 2023;82:102117.

17. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *BioMed research international*. 2014;2014(1):965849.

18. Allahbakhshian-Farsani M, Abdian N, Ghasemi-Dehkordi P, Sadeghiani M, Saffari-Chaleshtori J, Hashemzadeh-Chaleshtori M, et al. Cytogenetic analysis of human dermal fibroblasts (HDFs) in early and late passages using both karyotyping and comet assay techniques. *Cytotechnology*. 2014;66:815-22.

19. Kargar-Sichani Y, Mohammadi MH, Amiri V, Barzegar M, Keshavarz A, Bashash D, et al. Effect of acute myeloid leukemia-derived extracellular vesicles on bone marrow mesenchymal stromal cells: expression of poor prognosis genes. *Archives of medical research*. 2023;54(2):95-104.

20. Moloudizargari M, Abdollahi M, Asghari MH, Zimta AA, Neagoe IB, Nabavi SM. The emerging role of exosomes in

multiple myeloma. *Blood Reviews*. 2019;38:100595.

21. Amirpour M, Kuhestani-Dehaghi B, Kheyrandish S, Hajipirloo LK, Khaffafpour Z, Keshavarz F, et al. The impact of exosomes derived from B-cell acute lymphoblastic leukemia as a growth factor on bone marrow mesenchymal stromal cells. *Molecular Biology Reports*. 2024;51(1):749.

22. Dehaghi BK, Amirpour M, Karami N, Shafiei M, Noorazar L, Keshavarz A, et al. The Impact of Acute Myeloblastic Leukemia-Derived Small Extracellular Vesicles on the Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Expression of G1 Cell Cycle Progression Genes. *International Journal of Cancer Management*. 2024;17.(۱)

23. Kuhestani-Dehaghi B, Amirpour M, Nabigol M, Keshavarz A, Vazifeh Shiran N, Rahmani-Seraji H, et al. Evaluating the effect of acute myeloblastic leukemia-derived exosomes on the human bone marrow mesenchymal stromal cell proliferation. *Molecular Biology Reports*. 2025;52(1):62.

Introduction: Enhancing Karyotyping Success: The Role of Conditioning Media in Modulating Cell Proliferation and Apoptosis in Lymphopenic Samples

Bentolhoda Kuhestani Dehaghi¹, Maryam Panahi², Amir Abbas Navidinia¹, Hamide Rahmani Seraji³, Elham Jafaei⁴, Mozhgan Amirpour¹, Mehdi Allahbakhshian Farsani^{1*}

1. Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of allied medical sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
3. Department of Hematology and Oncology, Taleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran.
4. Cancer Molecular Pathology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Received : 01/06/2025

ePublished: 20/06/2025

ABSTRACT:

Introduction: Conventional karyotyping (CK) fundamentally relies on a sufficient quantity of viable and highly proliferative cells, a requirement that frequently leads to culture failure—particularly under conditions of reduced cellularity due to physiological or pathological lymphopenia. In such cases, inadequate cell interactions and suboptimal proliferation within the culture medium compromise diagnostic yield. This study investigated the impact of Conditioning Media (CM) on cell survival, proliferation, and apoptosis in lymphopenic samples.

Methods: To closely emulate in vivo microenvironmental conditions, CM was employed to optimize the in vitro culture system. Data were obtained through mitotic index (MI) assessments, proliferation assays, and apoptosis analyses, supplemented by RT-qPCR to examine dynamic changes in gene expression associated with cell cycle regulation and survival pathways.

Results: The incorporation of CM into the culture system significantly improved culture success rates. This was demonstrated by enhanced cell survival, increased mitotic indices, elevated Ki-67 expression—indicative of heightened proliferative activity—and a pronounced progression into the S phase of the cell cycle. Concurrently, a marked reduction in apoptosis was observed, suggesting improved cellular viability and resilience.

Conclusion: Our findings support the integration of CM into standard culture protocols to improve growth conditions, particularly in specimens with low cell counts or limited proliferative capacity—factors that traditionally impede successful karyotypic analysis. These improvements highlight the transformative potential of CM in refining CK methodologies, thereby broadening their reliability and applicability in clinical genetic diagnostics.

Keywords: conventional karyotype ,conditioning media ,Lymphopenia

*Corresponding Author: Mehdi Allahbakhshian Farsani, e-mail: mbakhshian1360@gmail.com

CITATION: Kuhestani dehaghi,B.,panahi,M.,Navidinia,A. A.,Rahmani

seraji,H.,Jafaei,E.,amirpour,M.,Allahbakhshian farsani,M. Enhancing Karyotyping Success: The Role of Conditioning Media in Modulating Cell Proliferation and Apoptosis in Lymphopenic Samples. Saveh University of Medical Sciences Journal, 2025; 1(1): 12-25. doi: [10.22034/jsavehums.2025.225628](https://doi.org/10.22034/jsavehums.2025.225628)