مجله علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷

CrossMark

[DOI: 10.29252/nkjmd-010028]

Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 13:43 IRST on Wednesday November 21st 2018

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و فاکتورهای رشد بر روی تکثیر سلولهای بنیادی خونساز بندناف در محیط آزمایشگاه

ناصر امیری زاده [۱]، فرهاد ذاکر [۲]، سامان سهرابی آخکند [۳*]

[۱] استادیار، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران
[۲] استاد، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۳] مربی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** سامان سهرابی آخکند، مربی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران، ایمیل: Sohrabi.s@umsu.ac.ir

DOI: 10.29252/nkjmd-010028

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۱۸

واژگان کلیدی:
سلول بنیادی خونساز
سلول بنیادی مزانشیمی
خون بند ناف

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی محفوظ است.

چکیده

مقدمه: خون بندناف یکی از مهمترین منابع سلولهای بنیادی خونساز(HSCs) است، اما متأسفانه تعداد محدود آنها در واحدهای خون بندناف استفاده از این منبع را در پیوند سلولهای بنیادی برای بزرگسالان محدود نموده است. یکی از روشهای بکار گرفته شده برای غلبه بر این مشکل ، تکثیر سلولهای بنیادی خونساز در محیط کشت است که میتوان علاوه بر فاکتورهای رشد افزودنی از عواملی مانند سلولهایی بنیادی مزانشیمی (MSCs) به عنوان لایه Feeder برای تکثیر ex vivo سلولهای بنیادی خونساز استفاده نمود.

روش کار: سلولهای CD34+ در دو شرایط مختلف کشت داده شدند شامل : ۱) کشت سلولهای CD34+ در محیط فاقد سرم (Stemspan) و در حضور فاکتورهای رشد ۲) کشت سلولهای CD34+ بر روی لایه فیدر سلولهای مزانشیمی در محیط حاوی فاکتورهای رشد. محیط های کشت پس از ۸ روز از لحاظ مارکر سطحی CD34، تعداد کل سلولهای هسته دار (TNCs) و آزمون کلونی زایی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: میانگین تعداد سلولهای $CD34^+$ و TNCs در محیط اول به ترتیب ۱/۹± ۱۰/۸ ، ۳± ۳۲/۲ برابر و در محیط دوم به ترتیب۷/۳± ۴۰/۹ ، ۸/۱± ۶۳/۵ برابر بود. اختلاف تعداد سلولها در دو محیط در روز پایانی کشت نسبت به تعداد سلولها در روز صفر (قبل از تکثیر) معنی دار بود (P<۰/۰۵).

نتیجه گیری: بکار گیری فاکتورهای رشد و و سلول های بنیادی مزانشیمی بصورت همزمان در محیط های کشت میتواند به ازدیاد HSCs در محیط آزمایشگاه کمک شایانی نماید.

مقدمه

امروزه خون بن ناف به عنوان یکی از منابع بسیار مهم سلول های بنیادی مورد توجه قرار گرفته است، که میتوان از آن به منظور پیوند سلول های بنیادی هماتوپویتیک استفاده کرد [۱-۴]. مزیت هایی مانند عدم وجود مشکلات اخلاقی ، عدم نیاز به سازگاری کامل HLA ، نداشتن ریسک برای دهنده ، کاهش احتمال انتقال عفونت ، قابلیت فریز کردن و دسترسی راحت موجب افزایش روز افزون استفاده از خون بند ناف جهت پیوند شده است [۴-۷]، اما تعداد کم پروژنیتورهای خونساز در خون بند ناف عامل محدود کننده استفاده از این منبع جهت پیوند در بالغین به حساب می آید و از آنجایی که تعداد سلولهای موجود در خون بند ناف مهم ترین عامل برای یک پیوند مطلوب به شمار می آید [۸-۱۰] باید راه حل هایی اتخاذ گردد تا بتوان بر این مشکل فایق آمد. یکی از راههای غلبه بر این مشکل ، تکثیر ex vivo سلول های بنیادی خونساز است که با فراهم کردن شرایط مطلوب در محیط کشت میتوان تعداد این سلولها را افزایش داد و در نتیجه پیوند سلولهای بنیادی هماتوپویتیک را بهبود بخشید [۱۱].سایتوکین ها و فاکتورهای رشد خونساز متعددی به منظور افزایش تکثیر HSCs در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفته اند، در این میان آنهایی که باعث القاء خود تجدیدشوندگی (self-renewal) در سلول های بنیادی خونساز می شوند مانند Stem Cell Factor [SCF] ، FLT3 ligand [FL] و Thrombopoietin [TPO] برای تکثیر سلول های خونساز ابتدایی و افزایش تعداد سلول های بنیادی خونساز در محیط آزمایشگاه ضروری هستند[۱۲,۱۳]. اما استفاده از سایتوکین هایی مانند IL-3 و GM-CSF در تولید سلول های پروژنیتور متعهد تاثیر مثبت دارد و به کار بردن M-CSF و EPO معمولا باعث تولید تعداد زیادی از سلول های بالغ در محیط کشت می شود و به نظر می رسد این سایتوکین ها فاقد نقش کلیدی در

[DOI: 10.29252/nkjmd-010028]
Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 13:43 IRST on Wednesday November 21st 2018

تکثیر سلول های بنیادی خونساز هستند[۱۲]. سلولهای بنیادی خونساز در مغزاستخوان در محیط ویژه ای قرار دارند که شرایط مطلوبی را برای رشد و تکثیر و خودتجدیدشوندگی این سلولها فراهم می آورد که متشکل از فاکتورهای رشد ، سیتوکین و سلولهای مختلفی است[۱۴]. یکی از سلولهایی که نقش مهمی بر روی بقاء و تکثیر HSCs دارد ، سلولهای بنیادی مزانشیمی است که از طریق ترشح سیتوکین ها ، فاکتورهای رشد و تماس مستقیم سلول به سلول با واسطه ی مولکولهای چسبندگی میتواند بقاء و خودتجدیدشوندگی این سلولها را افزایش می دهد. استفاده از سلولهای مزانشیمی در ex vivo به عنوان لایه فیدر و بصورت همکشتی با سلولهای بنیادی و پروژنیتور هماتوپویتیک میتواند از رشد و تکثیر این سلولها حمایت نماید[۱۴, ۱۵]. با توجه به نکات گفته شده و به دلیل اهمیت تعداد HSCs در پیوند ما در این مطالعه بر آن شدیم تا اثرات سلولهای بنیادی مزانشیمی به عنوان لایه فیدر و فاکتورهای رشد SCF ، FL و TPO را بر میزان تکثیر سلولهای بنیادی خونساز بند ناف بررسی کنیم.

روش کار

جداسازی سلول های CD34+ از خون بندناف: خون بندناف با دریافت رضایت نامه کتبی از والدین نوزاد بلافاصله پس از زایمان جمع آوری گردید. به منظور رسوب گلبول های قرمز از هیدروکسی اتیل استارچ Stem Cell (Technologies, Canada) استفاده شد. پس از خارج کردن گلبول های قرمز ، با استفاده از فایکول (Amersham Bio Sciences, Sweden)سلول های تک هسته ای موجود در سوسپانسیون سلولی جدا شدند سپس به منظور جداسازی سلول های CD34+، از آنتی بادی علیه مارکر CD34نشاندار شده با ذرات Miltenyi (Microbead Biotec, USA)و روش (Magnetic-Activated Cell Sorting)MACS استفاده کردیم [۱۶]. سلول های CD34+ جدا شده با لام هماسیتومتر شمارش شده و درصد زنده بودن آنها با رنگ آمیزی تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت با استفاده از فلوسیتومتری و Monoclonal Antibody Anti Human CD34/FITC (Dako, Denmark) میزان خلوص سلول های CD34+ جدا شده ارزیابی شد[۱۱].

جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی از مغزاستخوان: نمونه مغزاستخوان به همراه ضد انعقاد هپارین از اهدا کننده سالم با دریافت رضایت نامه کتبی گرفته شد و با استفاده از فایکول و با روش شیب گرادیانت غلظت، سلول های تک هسته ای از نمونه جدا شدند و در فلاسک کشت ۲۵ cm^2 حاوی۵ سی سی محیط DMEM با غلظت کم گلوکز، آنتی بیوتیک های پنی سیلین(U/ml ۲۰۰۰۰۰) و استرپتومایسین(mg/ml ۲۰۰) (Invitrogen, USA) و ۱۰٪ FBS در ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار ۵٪ CO_2کشت داده شدند، پس از ۷۲ ساعت محیط رویی جهت حذف سلولهای غیر چسبنده تعویض گردید و پس از آن به مدت ۱۴ روز هر ۳ روز یکبار محیط کشت تعویض شد و هنگامی که confluecy سلول های مزانشیمی در ته فلاسک به ۸۰٪ رسید پاساژ سلول ها انجام شد. برای تأیید اینکه سلولهای جدا شده از مغزاستخوان ، سلولهای بنیادی مزانشیمی هستند یا خیر از فلوسیتومتری و تمایز دادن سلولها به سمت استئوبلاست استفاده گردید. از آنتی بادی علیه CD44 ، CD166 ، CD90 ، CD105 ، CD45 و(Dako, Denmark) CD34 برای ارزیابی MSCs و از محیط تمایز استئوژنیک شامل محیط کشت استریلDMEM (Sigma, USA) ، اسیدآسکوربیک ۰/۱ M(Chemicon, USA)، یک میکرولیتر دگزامتازون ۱۰ mM (Chemicon, USA)، یک سی سی FBS و ۱۰۰ میکرولیتر گلیسرول فسفات یکM (Chemicon, USA) برای تمایز سلولها به استئوبلاست و از رنگ آمیزی های اختصاصی آلیزارین رد و آلکالن فسفاتاز جهت تایید استئوبلاست ها استفاده گردید[۱۴-۱۷].

کشت سلولهای CD34+ جدا شده از خون بندناف در شرایط مختلف: به منظور بررسی تکثیر سلولهای CD34+ در ex vivo دو حالت مختلف کشت طراحی شد شامل:

حالت اول : کشت سلولهای CD34+ به تعداد ۲۰×۱۰^۳ در محیط فاقد سرم (Stemspan) و در حضور فاکتورهای رشدTPO ، Flt3-ligand و SCF (Stem Cell Technologies, Canada) با غلظت ۱۰۰ng/ml .(در حالت دوم نیز از فاکتورهای رشد ذکر شده با غلظت ۱۰۰ng/ml و محیط Stemspan و ۲۰×۱۰^۳ سلول CD34+ استفاده شده است).

حالت دوم : کشت سلول های CD34+ بر روی لایه فیدر سلولهای بنیادی مزانشیمی با Confluency ۸۰٪ (برای توقف تکثیر سلولهای مزانشیمی از میتومایسین C استفاده گردید) در محیط Stemspan و در حضور فاکتورهای رشد.

سلولها در هر دو حالت ذکر شده به صورت تریپلیت مورد بررسی قرار گرفتند و به مدت ۸ روز در ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار ۵٪ CO_2انکوبه شدند و در روزهای ۳ و ۶ تعویض محیط انجام گرفت. در روز هشتم محیط ها از نظر تعداد کل سلولهای هسته دار ، تعداد سلولهای CD34+ و سنجش کلونی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

سنجش کلونی (CFU-assay) : ۱×۱۰۳ سلول تک هسته ای قبل از کشت (روز صفر) و بعد از کشت (روز هشتم) در دو شرایط کشت مختلف ذکر شده را با ۳ سی سی از محیط Methocult H4435 (Stem Cell Technology, Canada) مخلوط کرده و به وسیله سرنگ به پلیت های ۳۵ mm به صورت دوپلیکیت اضافه کردیم[۱۵]. پس از ۱۴ روز انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار ۵٪ CO_2به وسیله استرئومیکروسکوپ از لحاظ میزان تشکیل کلونی ارزیابی و تجمعات سلولی بیش از ۴۰ عدد سلول به عنوان کلونی تلقی شدند[۱۸, ۱۹].

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSSانجام شد. به منظور مقایسه تعداد و میزان چند برابرشدن کل سلول‌های هسته دار , درصد و میزان چند برابر شدن سلولهای CD34+ و همچنین تعدادکلونی ها از تست پارامتریک Anovaاستفاده شد.

یافته ها

درجه خلوص و درصد زنده ماندن سلولهای CD34+ جدا شده از خون بند ناف : پس از جدا کردن سلولهای تک هسته ای از ۳ نمونه خون بند ناف با استفاده از هیدروکسی اتیل استارچ و فایکول و عبور این سلولها از ستون MACS ، بطور میانگین در سه نمونه درجه خلوص سلولهای CD34+، ۲/۵± ۸۹/۶ ٪ و درصد زنده بودن این سلولها با استفاده از تریپان بلو نشاندهنده ۳± ۹۱ ٪ Viability بود.

تأیید سلولهای بنیادی مزانشیمی : سلولهای مزانشیمی پس از ۱۴ روز کشت جهت آنالیز مارکرهای CD44، CD166، CD90، CD105، CD45 و CD34 به وسیله فلوسیتومتری ، تریپسینه شده و نتایج بررسی مارکرهای

[DOI: 10.29252/nkjmd-010028]
Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 13:43 IRST on Wednesday November 21st 2018

ذکر شده به ترتیب ۰/۴± ۹۹/۴ ٪ ، ۱/۵± ۹۸ ٪ ، ۱/۴± ۹۷/۲٪ ، ۲/۶± ۹۵/۷ ٪ ، ۱± ۳/۱ ٪ و ۱/۸± ۲/۹ ٪ بود و جهت حذف واکنش های غیراختصاصی از آنتی بادیهای ایزوتیپ کنترل استفاده گردید (تصویر ۱) . سلولهای مزانشیمی پس از ۱۷ روز کشت در محیط استئوژنیک به سلولهای استئوبلاست تمایز یافتند که رنگ آمیزی آلکالن فسفاتاز و آلیزارین رد این سلولها را تایید نمود (نتایج نشان داده نشده است).

نتایج حاصل از تکثیر سلولی: ۸ روز پس از اضافه کردن ۲۰×۱۰^{۳} سلول CD34+ به محیط های کشت و تکثیر این سلولها در دو حالت کشت گفته شده که به صورت تریپلیکیت انجام شد تعداد TNCs ، میزان چند برابر شدن آنها ، درصد سلولهای CD34+ و میزان چند برابر شدن تعداد آنها مورد ارزیابی قرار گرفت.

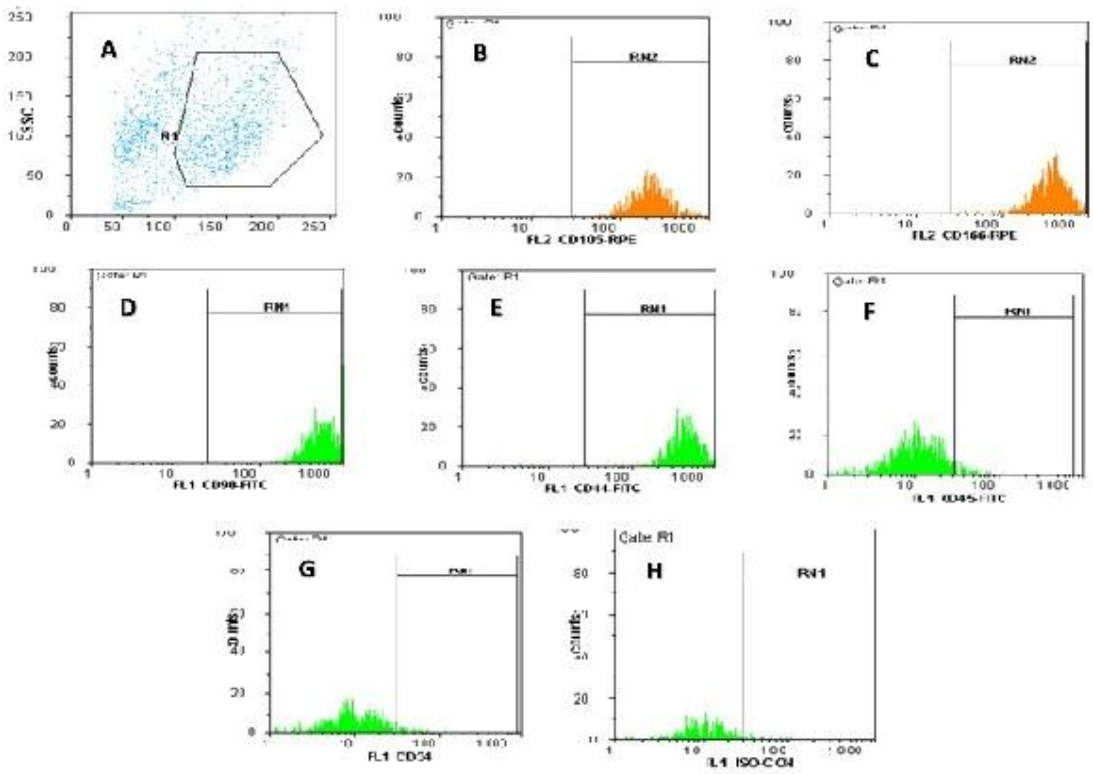
سلولهای تکثیر یافته در روز هشتم از نظر تعداد TNCs با استفاده از لام هماسیتومتر شمارش شدند که نسبت به روز اول (۲۰×۱۰^{۳} سلول) از نظر تعداد سلول های هسته دار (تصویر. ۲) و میزان چند برابر شدن آنها (تصویر. ۳) ، در دو شرایط کشت مختلف تفاوت معنی داری ($p<۰/۰۵$) را نشان دادند. همچنین فلوسیتومتری جهت ارزیابی فراوانی سلول های CD34+ قبل از در نمونه ای بندناف و پس از تکثیر در دو شرایط کشت مختلف انجام گردید (تصویر ۴). میزان چند برابر شدن سلول های CD34+ در دو شرایط کشت ذکر شده تفاوت معنی داری با هم داشتند (تصویر. ۵).

حالت کشت اول : میانگین میزان چند برابر شدن TNCs و سلول های CD34+ و میانگین درصد سلول های CD34+ در حضور فاکتورهای رشد به ترتیب ۳± ۳۲/۲ ، ۱/۹± ۱۰/۸ و ۶/۴± ۳۵/۷٪ بود.

حالت کشت دوم: در این حالت تاثیر همکشتی سلول های بنیادی مزانشیمی همراه با فاکتورهای رشد بر تکثیر سلول های بنیادی خونساز بررسی شد. میانگین میزان چند برابر شدن TNCs و سلول های CD34+ و میانگین درصد سلول های CD34+ به ترتیب ۸/۱± ۶۳/۵ ، ۷/۳± ۴۰/۹ و ۵/۸± ۶۶/۹ ٪ بود.

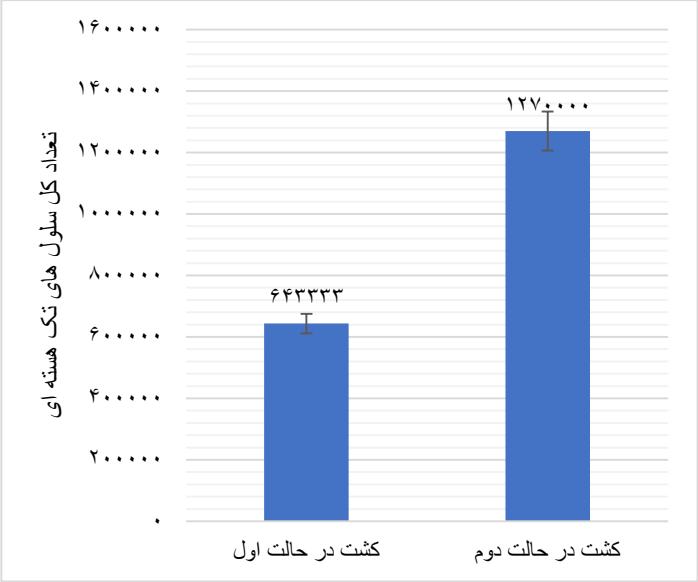
میانگین درصد زنده ماندن سلول ها قبل از تکثیر (روز صفر) و بعد از تکثیر (روز هشتم) با تریپان بلو مورد سنجش قرار گرفت که نتایج عبارت بودند از ۳± ۹۱ ٪ در روز صفر و برای محیط کشت اول و دوم به ترتیب ۶/۲± ۸۲ ٪ و ۳±۹۰ ٪. تفاوت معنی داری بین دو محیط کشت با همدیگر یا با نمونه قبل از تکثیر مشاهده نشد.

نتایج حاصل از کلونی سنجی (CFU-assay): جهت سنجش توان کلونی زایی سلولهای تکثیر یافته و مقایسه آن با میزان کلونی زایی سلولها قبل از تکثیر، روش کلونی سنجی با استفاده از محیط Methocult به کار گرفته شد. برای انجام این کار $۱۰^{۳}$ TNCs جدا شده در روز صفر و هم چنین سلولهای حاصل از تکثیر در روز ۸ کشت از دو محیط کشت مختلف به صورت دوتایی(Duplicate) به محیط Methocult اضافه شد و پس از ۱۴ روز انکوباسیون تعداد کلونی ها شمارش شد (تصویر. ۶). میانگین تعداد کلونی های به دست آمده از سه نمونه بندناف قبل از تکثیر ۴/۵± ۴۶ به ازای ۱۰۰۰ TNCs بود. تعداد کلونی در شرایط کشت دوم تفاوت معنی داری ($p<۰/۰۵$) با تعداد کلونی در شرایط کشت اول و نمونه قبل از تکثیر دارد اما از لحاظ تعداد کلونی بین نمونه روز صفر و محیط کشت اول (روز هشتم) تفاوت معنی داری مشاهده نگردید.

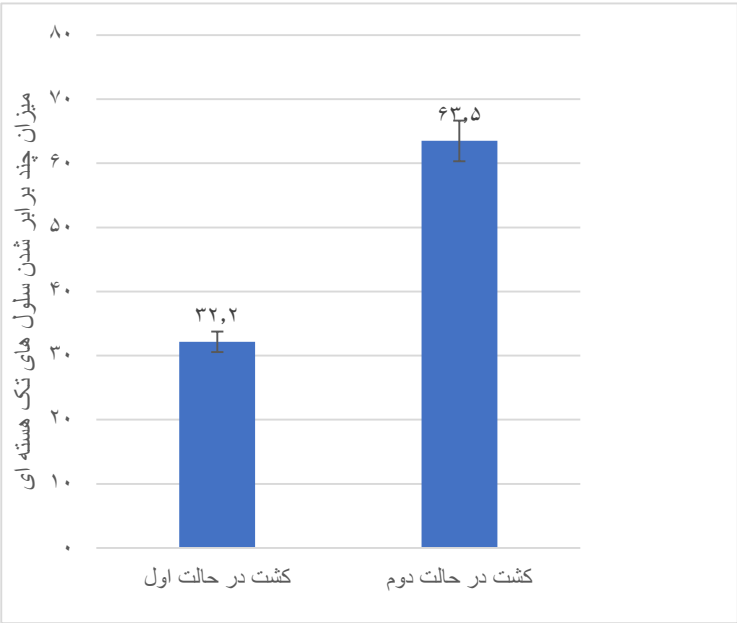


تصویر ۱: ایمو نوفنوتیپینگ سلول های مزانشیمی مغز استخوان با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری . (A) گیت سلول های تک هسته ای، (B) بیان آنتی ژن CD105، (C) بیان آنتی ژن CD166، (D) بیان آنتی ژن CD90، (E) بیان آنتی ژن CD44، (F) بیان آنتی ژن CD45، (G) بیان آنتی ژنCD34، (H) نمودار کنترل منفی را نشان می دهند.

[DOI: 10.29252/nkjmd-010028]
Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 13:43 IRST on Wednesday November 21st 2018

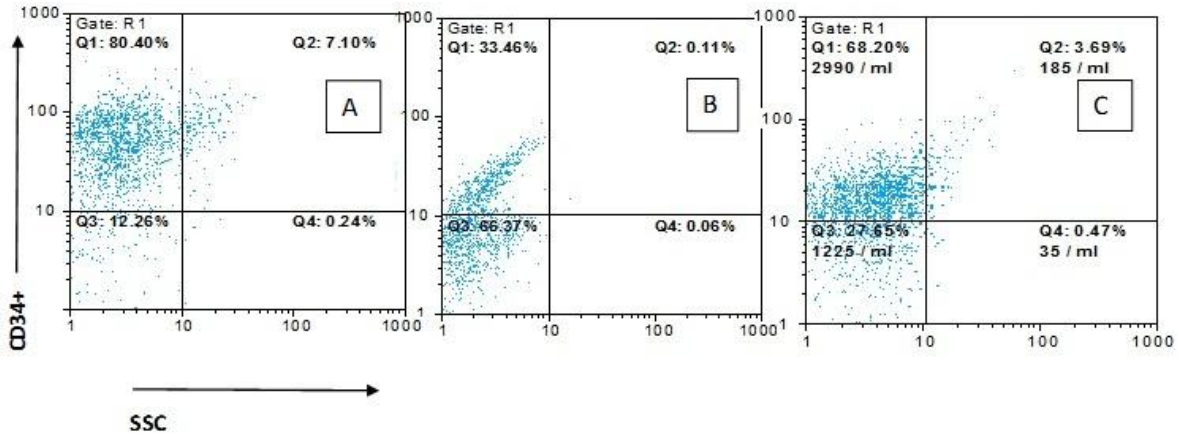


تصویر ۲: میانگین تعداد کل سلولهای هسته دار (TNC) در روز هشتم پس از تکثیر در حالت های مختلف کشت(Mean±SD) . حالت کشت اول: سلول های CD34+ + فاکتورهای رشد، حالت کشت دوم: سلول های CD34+ + MSCs + فاکتورهای رشد. در روز صفر به هر دو محیط ۲۰×۱۰^{۳} سلول CD34+ اضافه شده بود.

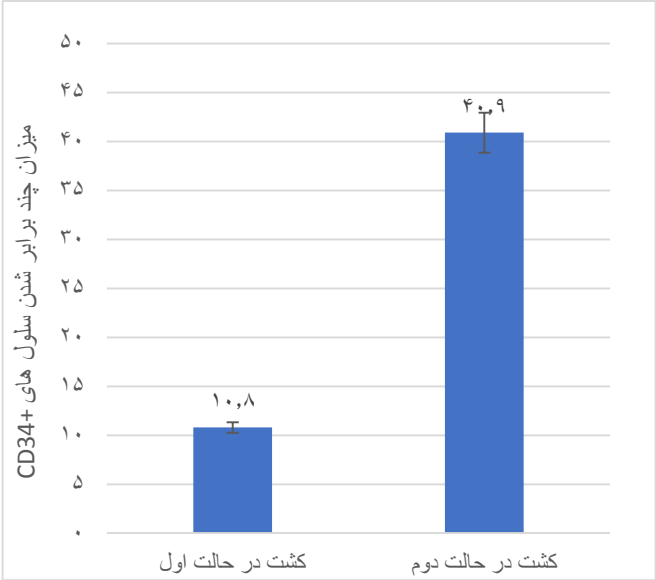


تصویر ۳: میانگین میزان چند برابر شدن کل سلولهای هسته دار (TNC)هشت روز پس از تکثیر در محیط کشت های مختلف (Mean±SD).

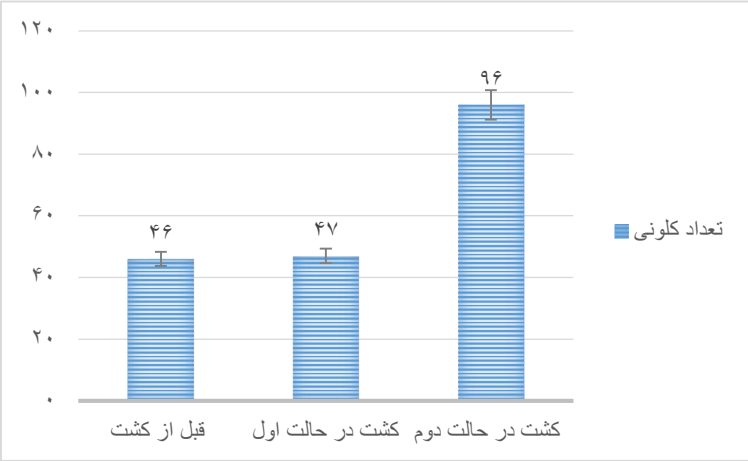
[DOI: 10.29252/nkjmd-010028]
Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 13:43 IRST on Wednesday November 21st 2018



تصویر ۴ . فلوسایتومتری .A) سلولهای بنیادی خونساز قبل از کشت در روز صفر در یکی از نمونه های خون بند ناف. B) HSCsدر روز هشتم کشت در محیط اول (سلول های CD34+ + فاکتورهای رشد). C) HSCsدر روز هشتم کشت در محیط دوم (سلول های CD34+ + MSCs + فاکتورهای رشد).



تصویر ۵ : میانگین میزان چند برابر شدن سلولهای CD34+ در محیطهای مختلف، ۸ روز پس از تکثیر نسبت به قبل از کشت (Mean±SD) .



تصویر ۶ : میانگین تعداد کلونی های تشکیل شده به ازای ۱۰۰۰ TNCs .

[DOI: 10.29252/nkjmd-010028]
Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 13:43 IRST on Wednesday November 21st 2018

بحث

بر طبق یافته های ما افزودن فاکتورهای رشد TPO ، FL و SCF به محیط های کشت به تنهایی موجب افزایش ۱/۹± ۱۰/۸ برابری در تعداد سلولهای CD34+ و افزایش TNCs به میزان ۳± ۳۲/۲ میگردد در مطالعه ای که توسط Kelly و همکارانش انجام شد تکثیر ex vivo سلولهای CD34+ خون بند ناف در سیستم کشت مایع به مدت ۱۰ روز در حضور سایتوکین های SCF ، G-CSF و TPO باعث افزایش TNCs و پروژنیتورهای CD34+ به ترتیب به میزان ۵۶ برابر و ۴ برابر گردید[۲۰]. همچنین مطالعات Piacibello و همکارانش نشان داد که استفاده همزمان از FL و TPO باعث می شود تولید سلول های پروژنیتور به مدت بیشتر از ۶ ماه در محیط کشت ادامه یابد اما در صورت استفاده از FL یا TPO به تنهایی ، این زمان به ترتیب به ۱۰ و ۴ هفته کاهش می یابد. ترکیب FL و TPO در کشت طولانی مدت (LTC) موجب افزایش ۱۰۰۰ برابری تعداد سلول های تک هسته ای در طی ۵ هفته می گردد[۲۱] اما تکثیر سلولها با سیتوکین به تنهایی موجب از دست رفتن پروژنیتورهای CD34+ می شود[22] ، به این دلیل علاوه بر فاکتورهای رشد TPO ، FL و SCF از سلولهای مزانشیمی مغزاستخوان به عنوان لایه فیدر جهت تکثیر سلولهای CD34+ استفاده کردیم که پس از ۸ روز تکثیر در محیط کشت شاهد افزایش۷/۳± ۴۰/۹ برابری در تعداد پروژنیتورهای CD34+ و ۸/۱± ۶۳/۵ برابری در تعداد TNCsبودیم که این افزایش در مقایسه با محیط کشت های فاقد لایه فیدر ، بر اهمیت سلولهای مزانشیمی در تکثیر و خودتجدیدشوندگی سلولهای بنیادی و پروژنیتور خونساز تاکید می کند. Robinson و همکارانش در مورد ضرورت وجود لایه سلولهای استرومایی در تکثیر سلولهای خون بند ناف مطالعاتی انجام دادند. آنها به این نتیجه دست یافتند که پروژنیتورهای خون بند ناف در غیاب لایه سلولهای چسبنده قادر به انجام هماتوپوئز بیش از ۲ هفته نبودند اما در حضور چنین لایه ای هماتوپوئز در محیط کشت طولانی تر و قوی تر خواهد بود.

آنها نشان دادند که همکشتی سلولهای تک هسته ای جدا شده از خون بند ناف با سلولهای بنیادی مزانشیمی در یک بازه زمانی ۱۴ روزه و در حضور فاکتورهای رشد SCF ، G-CSF و TPOمنجر به ۱۰ تا ۲۰ برابر افزایش در TNCs ، ۱۶ تا ۳۷ برابر افزایش در سلولهای CD34+ می شود [۱۵]، همچنین Lobato dasilva و همکاران در سال ۲۰۰۵ افزایش ۳۵ برابری در تعداد سلولهای CD34+ که همراه با لایه سلولهای استرومایی جفت انسانی کشت داده شده بودند را گزارش کردند[۲۳].

در سال ۲۰۰۶ Na Li و همکاران نقش سلولهای بنیادی مزانشیمی در کشت سلولهای بنیادی به دست آمده از خون محیطی را مورد مطالعه قرار دادند . به منظور انجام این کار سلولهای CD34+ جدا شده از خون محیطی را بر روی سلولهای مزانشیمی به عنوان لایه سلولهای استرومایی هم به صورت مستقیم و هم به صورت غیر مستقیم و با استفاده از غشا (Transwell) کشت دادند. نتایج نشان داد که افزودن سلولهای مزانشیمی به عنوان یک لایه سلول استرومایی سبب بهبود تکثیر استم سلهای خون محیطی در محیط کشت می شود .همچنین به این نتیجه دست یافتند که تماس مسقیم با سلولهای مزانشیمی نقش بسزایی در افزایش تکثیر سلولها خواهد داشت[۲۴]. در بررسی ما بر روی میزان تشکیل کلونی از ۱۰۰۰ سلول تک هسته ای کشت داده شده در شرایط مختلف، نشان داده شد که کشت سلولهای CD34+ بر روی لایه فیدر MSCs تعداد کلونی ها را به مقدار قابل توجهی افزایش میدهد و تعداد آنها پس از ۱۴ روز به ۶± ۹۶ رسید اما در محیطی که فقط فاکتورهای رشد به آن اضافه شده بود تعداد کلونی ها ۴۷±۴ بود که در مقایسه با سلولهای CD34+ تازه جدا شده که تعداد کلونی های حاصل از آنها ۴۶±۴/۵ بود تغییر بسیار اندکی وجود داشت و تفاوت معنی داری بین دو گروه اخیر مشاهده نشد. ما در این مطالعه سعی کردیم تا با بکارگیری عوامل ارتقا دهنده تکثیر HSCs مانند سلولهای استرومایی که می توانند باعث افزایش قدرت خودتجدیدشوندگی و جلوگیری از تمایز سلولهای پیش ساز خونی شوند روش مناسبی برای افزایش تکثیر HSCs خون بند ناف به منظور پیوند سلولهای بنیادی خونساز در بالغین پیدا کنیم. از موانع و مشکلات انجام تحقیق می توان به ناکافی بودن بودجه برای انجام کشت طولانی مدت (LTC) و آلوده شدن محیط های کشت اشاره کرد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان میدهد که استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی به عنوان لایه فیدر تاثیر قابل ملاحظه ای بر روی افزایش تعداد سلولهای CD34+ ، TNCs و تعداد کلونی ها در ex vivo خواهد داشت.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون کمال تشکر را داریم.

References

1. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989;86(10):3828-32. PMID: PMC287234
2. Gordon MY. Stem cells for regenerative medicine—Biological attributes and clinical application. Experimental Hematology. 2008;36(6):726-32. DOI: 10.1016/j.exphem.2008.01.013
3. Hofmeister CC, Zhang J, Knight KL, Le P, Stiff PJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. Bone Marrow Transplant. 2007;39(1):11-23. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705538 PMID: 17164824
4. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. N Engl J Med. 2001;344(24):1815-22. DOI: 10.1056/nejm200106143442402 PMID: 11407342

[DOI: 10.29252/nkjmd-010028]
Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 13:43 IRST on Wednesday November 21st 2018

5. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. Experimental Hematology. 2000;28(11):1197-205. DOI: 10.1016/S0301-472X(00)00540-3
6. Gluckman E, Rocha V, Chevret S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplant. Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine. 2001;8(3):146-54. DOI: 10.1016/s1246-7820(01)00132-x PMID: 11499955
7. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. Blood. 2002;100(5):1611-8.
8. Gilmore GL, DePasquale DK, Lister J, Shadduck RK. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34(+) hematopoietic stem cells. Exp Hematol. 2000;28(11):1297-305. PMID: 11063878
9. Kelly SS, Sola CBS, de Lima M, Shpall E. Ex vivo expansion of cord blood. Bone marrow transplantation. 2009; 44(10):673-81. DOI: 10.1038/bmt.2009.284 PMID: PMC 4157906
10. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. Blood. 2000;96 (8):2717-22. PMID: 11023503
11. Tung SS, Parmar S, Robinson SN, De Lima M, Shpall EJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood for transplantation. Best Pract Res Clin Haematol. 2010;23(2):245-57. DOI: 10. 1016/j.beha.2010.06.004 PMID: 20837337
12. Flores-Guzman P, Fernandez-Sanchez V, Mayani H. Concise review: ex vivo expansion of cord blood-derived hematopoietic stem and progenitor cells: basic principles, experimental approaches, and impact in regenerative medicine. Stem Cells Transl Med. 2013;2(11):830-8. DOI: 10.5966/sctm.2013-0071 PMID: 24101670
13. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine. 2010;2(6):640-53.
14. Jing D, Fonseca AV, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, et al. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells--modeling the niche compartments in vitro. Haematologica. 2010;95(4):542-50. DOI: 10.3324/haematol.2009.010736 PMID: 20145267
15. Robinson S, Ng J, Niu Te, Yang H, McMannis J, Karandish S, et al. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Bone marrow transplantation. 2006;37(4):359.
16. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. Stem cells. 2004;22(3):377-84.
17. Yang S, Cai H, Jin H, Fan J, Tan W-s. Hematopoietic reconstitution of CD34+ cells derived from short-term cultured cord blood mononuclear cells. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2009;14(4):429-35.
18. Almeida-Porada G, Brown RL, MacKintosh FR, Zanjani ED. Evaluation of serum-free culture conditions able to support the ex vivo expansion and engraftment of human hematopoietic stem cells in the human-to-sheep xenograft model. J Hematother Stem Cell Res. 2000;9(5):683-93.
19. Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KH, Sung KW, et al. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. Annals of hematology. 2006;85(4):212-25.
20. McNiece I, Kubegov D, Kerzic P, Shpall EJ, Gross S. Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture. Experimental hematology. 2000;28(10):1181-6.
21. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. Blood. 1997;89(8):2644-53.
22. Noort WA, Kruisselbrink AB, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood–derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. Experimental hematology. 2002;30(8):870-8.
23. da Silva CL, Gonçalves R, Crapnell KB, Cabral JM, Zanjani ED, Almeida-Porada G. A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/ progenitor cells. Experimental hematology. 2005;33(7):828-35.
24. Li N, Feugier P, Serrurrier B, Latger-Cannard V, Lesesve J-F, Stoltz J-F, et al. Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human CD34+ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity. Experimental hematology. 2007;35(3):507-15.

[DOI: 10.29252/nkjmd-010028]
Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 13:43 IRST on Wednesday November 21st 2018

North Khorasan Journal of Medical Sciences
Volume 10, Issue 2, Summer 2018

Research Article

Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Growth Factors on Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Proliferation in ex vivo

Naser Amirizadeh [1], Farhad Zaker [2], Saman Sohrabi Akhkand [3*]

[1] Blood Transfusion Research Center, High Institute for Education and Research in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2] Cellular and Molecular Research Center, Department of Hematology, School of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Faculty of Allied Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
*** Corresponding author:** Saman Sohrabi Akhkand, Faculty of Allied Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

DOI: 10.29252/nkjmd-010028

How to Cite this Article:
Amirizadeh N, Zaker F , Sohrabi Akhkand S. Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Growth Factors on Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Proliferation in ex vivo. JNKUMS. 2018; 10 (2): 57-64
URL: http://journal.nkums.ac.ir/article-1-1521-fa.html

Received: 12 Oct 2017
Accepted: 08 May 2018

Keywords:
Hematopoietic stem cell
Mesenchymal stem cell
Cord blood

© 2018 North Khorasan Medical Sciences

Abstract
Introduction: Umbilical cord blood (UCB) is one of the most important sources of hematopoietic stem cells (HSCs). However, the limited amount of HSCs in UCB has been an obstacle for transplantation of adult hematopoietic stem cell. One of the applied methods to overcome this problem is the proliferation of HSCs in culture medium, so beside the additive growth factors, some other factors such as Mesenchymal stem cells (MSCs) as feeder layer can be used for the proliferation of Hematopoietic stem cells in ex vivo.
Methods: CD34+ cells were cultured in two different media including; 1) culturing CD34+ cells in serum- free medium (Stemspan) and in the presence of growth factors, 2) culturing CD34+ cells on feeder layer of Mesenchymal stem cells (MSCs) in media including the growth factors. These culture media were evaluated in terms of the number of total nucleated cells (TNCs), CD34 surface marker and CFU assay eight days after the culture.
Results: The mean of CD34+ cells and TNCs in the first medium was 10.8 ± 1.9 and 32.2 ± 3.0 and in the second medium was 40.9 ± 7.3 and 63.5 ± 8.1, respectively. The difference between the number of cells in two culture media in the last day of culture and before the proliferation (0 day) was statistically significant ($P<0.05$).
Conclusions: The simultaneous application of growth factors and MSCs in culture media could largely contribute to the proliferation of HSCs in ex vivo.