ارزیابی تاثیر داروی FK506 (تاکرولیموس) بر سلولهای بنیادی خون ساز بند ناف

مریم نیک‌پور .M.Sc☆، یوسف مرتضوی .Ph.D☆★♦، مسعود سلیمانی .Ph.D☆، سعید کاویانی .Ph.D ☆

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی

★ دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده پزشکی گروه پاتولوژی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۵۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی

پست الکترونیک: Email:ymort@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۳/۹، پذیرش مقاله: ۸۴/۳/۱

* **هدف:** بررسی تاثیر داروی FK506 بر سلولهای تک‌هسته ای خون بند ناف

* **مواد و روشها:** در این مطالعه پس از جمع‌آوری خون بند ناف و جداسازی سلولهای تک‌هسته‌ای، درصد سلولهای زنده تعیین شد. سپس سلولها به مدت یک هفته در محیط DMEM و در حضور سایتوکاینهای IL-6، TPO، SCF، FL و دوزهای مختلف FK506 انکوبه شدند. پس از این مدت، شمارش سلولی انجام گرفت. سپس مورفولوژی سلولها مورد بررسی قرار گرفته و نسبت رده میلوییدی به اریتروییدی مشخص شد. همچنین درصد سلولهای $CD34^+$ به روش فلوسایتومتری تعیین گردید. در این تحقیق سنجش کلونی در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول، بلافاصله پس از جدا سازی سلولهای تک‌هسته‌ای (در حضور FK506) و در مرحله دوم، از سلولهایی که به مدت یک هفته در حضور دوزهای مختلف دارو و سایتوکاینها انکوبه شده بودند استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها آزمونهای کولموگراف – اسمیرنوف و آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) مورد استفاده قرار گرفت.

* **یافته‌ها:** پس از یک هفته تیمار سلولها در حضور FK506 و سایتوکاینها، شمارش سلولی در مقایسه با کنترل تغییر قابل ملاحظه‌ای نشان نداد ($p=0/126$). همچنین نسبت رده میلوییدی به رده اریتروییدی در مقایسه با کنترل تغییر معنی‌داری نشان نداد ($p=0/819$). با این وجود درصد سلولهای $CD34^+$ در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($p=0/018$). سنجش کلونی در مرحله اول در مقایسه با کنترل کاهش یافته ($p=0/000$) و در مرحله دوم در مقایسه با کنترل تغییری نشان نداد ($p=0/109$).

* **نتیجه گیری:** FK506 علاوه بر این که به عنوان داروی سرکوب‌گر ایمنی نقش مهمی در پیش‌گیری و درمان GVHD حاد دارد، در *in vitro* موجب ازدیاد سلولهای خون ساز و افزایش توانایی کلونی‌زایی آنها شده و در ضمن تاثیری نیز بر تمایز سلولهای خون ساز ندارد.

گل واژگان: خون بند ناف، FK506، کلونی زایی، ازدیاد سلولی

نشریه پزشکی یاخته، سال هفتم، بهار ۸۴، شماره ۲۵، صفحات ۲۴-۱۹

مقدمه

وجود سلولهای بنیادی خون ساز (HPC: Hematopotietic Progenitor Cella) نسبتا بالغ در خون بندناف انسان اولین بار توسط Knudtzon و همکاران، شرح داده شد (۱). در حدود ده سال بعد Ogawa و همکاران وجود سلولهای بنیادی خون ساز اولیه در خون بندناف را اثبات نمودند (۲، ۳). با این وجود اولین بار در سال ۱۹۸۴ مطالعات بالینی و آزمایشگاهی نشان دادند که می‌توان از خون بندناف استفاده بالینی نمود و در همین سال، اولین مورد پیوند سلولهای خون ساز بندناف توسط Gluckman و همکاران گزارش شد (۴). از آن زمان استفاده از خون بندناف به عنوان یک منبع جدید سلولهای بنیادی و خون ساز (HSPC: Hematopoietic Stem/ Progenitator Cells)، در موارد پیوند و دست‌کاریهای ژنتیکی ex vivo گسترش یافت.

یکی از اساسی‌ترین عوامل محدود کننده پیوند سلولهای بنیادی خون‌ساز، بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD: Graft Versus Host Disease) است (۵). دو روش عمومی که به منظور پیش‌گیری از GVHD حاد به کار می روند، عبارتند از استفاده از داروهای سرکوبگر ایمنی و برداشت سلولهای T از پیوند. با توجه به این که برداشت سلولهای T می‌تواند موجب کاهش کارآیی و عدم موفقیت پیوند شود در حال حاضر بهترین روش پیش‌گیری از بروز GVHD با استفاده از داروهای سرکوب‌گر ایمنی است. این داروها شامل کورتیکواستروییدها نظیر پردنیزولون، سموم متابولیک نظیر سیکلوفسفامید و داروهای متصل شونده به ایمونوفیلینها نظیر سایکلوسپورین A، FK506 وراپامایسین می‌باشند. داروهای متصل شونده به ایمونوفیلینها کاملا اختصاصی عمل نموده لذا بر سایر داروهای سرکوب‌گر ایمنی ارجحیت دارند (۶). سایکلوسپورین A برای همه پیوندها مناسب نبوده و دوز کافی دارو برای سرکوب ایمنی مطلوب می‌تواند آسیب کلیوی ایجاد نماید. به همین دلیل اخیرا، توجه زیادی به یک متابولیت قارچی به نام FK506 شده است.

FK506 برای اولین بار از یک سوش Streptomyces در ژاپن جدا شد. اولین استفاده بالینی از این دارو در سال ۱۹۸۹ انجام گرفت. FK506 یک ماکرولید قارچی با عنوان تاکرولیموس (Prograf) نیز نامیده می‌شود (۷). مهمترین عملکرد این دو دارو مهار نسخه‌برداری از ژنهای معینی است که مهمترین آنها ژن IL-2 است. علاوه بر مصرف این داروها به عنوان رایج ترین عوامل سرکوبگر ایمنی، سایکلوسپورین

Archive of SID

www.SID.ir

A و FK506در تحقیقات پزشکی نیز ارزشمند هستند. با بررسی‌هایی که در مورد نحوه عمل این داروها در سلولهای T انجام گرفت، اطلاعات با ارزشی در زمینه ارتباط بین سیگنالهای کلسیم و نسخه برداری از ژن IL-2 به دست آمد (۸، ۹).

اولین بار در سال ۱۹۹۳، اثر داروهای سایکلوسپورین A و FK506 بر رشد سلولهای خون‌ساز جدا شده از مغز استخوان، خون محیطی و خون بند ناف در حضور IL-3 بررسی شد. در این مطالعه مشاهده شد، سایکلوسپورین بر هیچ‌کدام از این سلولها تاثیری ندارد اما FK506 بر سلولهای خون‌ساز بندناف اثر تحریکی داشت (۱۰). در سال ۱۹۹۵ تاثیر سایکلوسپورین و FK506 بر کلونی‌زایی سلولهای خون‌ساز مغز استخوان موش بررسی و مشاهده شد: این دو دارو در دوز پایین باعث افزایش و در دوز بالا سبب کاهش کلونی‌زایی سلولهای فوق در کشتهای کوتاه مدت می شوند (۱۱). در سال ۱۹۹۹ Perry و همکاران نشان دادند: سایکلوسپورین A می‌تواند اثر تحریکی یا مهاری بر کلونی‌زایی سلولهای خون‌ساز مغز استخوان داشته باشد که این اثر وابسته به دوز است اما FK506 اثر تحریکی یا مهاری مداومی بر سلولهای فوق ندارد (۱۲).

با در نظر گرفتن این واقعیت که استفاده از خون بندناف به عنوان یک منبع جدید سلولهای بنیادی خون‌ساز در موارد پیوند در حال گسترش است و با توجه به این که، در حال حاضر FK506 به عنوان یکی از داروهای سرکوب‌گر ایمنی در پیش‌گیری و درمان GVHD در پیوند سلولهای خون‌ساز مورد استفاده قرار می گیرد؛ در این مطالعه اثر این دارو بر سلولهای خون‌ساز بندناف مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده با کنترل مقایسه گردید. با توجه به نتایج مطالعات انجام گرفته، در تحقیق حاضر از سه غلظت متفاوت FK506 (۱، ۲ و ۳ نانوگرم بر میلی‌گرم) استفاده شد. در تحقیقاتی که تاکنون انجام شده تنها تاثیر داروی FK506 بر توانایی کلونی‌زایی سلولها پس از تیمارهای کوتاه مدت مورد بررسی قرار گرفته است. به علاوه تاثیر این دارو بر توانایی ازدیاد سلولهای خون بند ناف نامشخص است. در این تحقیق توانایی ازدیاد (Expansion) و تکثیر (Proliferation) سلولهای تک‌هسته‌ای موجود در خون بندناف پس از یک هفته کشت در حضور چند دوز متفاوت داروی FK506 مورد بررسی قرار گرفته و نسبت سلولهای رده اریتروییدی ومیلوییدی نیز مشخص شد. همچنین تاثیر این دارو بر توانایی کلونی‌زایی سلولها در دو مرحله مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه های خون بندناف

نمونه‌های مورد نیاز در این تحقیق از بیمارستان مادران تهران طی زایمان به روش سزارین جمع‌آوری شد. روش جمع‌آوری نمونه، دوشیدن خون از بند ناف کلامپ و بریده شده در شرایط استریل بود. نمونه‌ها درون لوله‌های درپیچ‌دار استریل حاوی ماده نگهدارنده سیترات فسفات دکستروز آدنین (CPDA: Citrate Phosphate Dextrose Adenine) جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند (یک حجم CPDA و هفت حجم خون).

جداسازی سلولهای تک هسته‌ای

خون به نسبت ۴ به ۱ با هیدروکسی اتیل استارچ (sigma) مخلوط و ۱ ساعت بدون حرکت در دمای اتاق قرار گرفت. پس از رسوب گلبولهای قرمز ۱۰-۸ میلی‌لیتر از محلول رویی (گلبولهای سفید) برداشت شده و به یک لوله که حاوی ۳میلی‌لیتر فایکول (سازمان انتقال خون ایران) بود، اضافه شد. پس از سانتریفوژ لایه حاوی سلولهای تک هسته‌ای (لایه بین فایکول و پلاسما) برداشت و ۲ تا ۳ مرتبه توسط محیط RPMI(Sigma) شستشو شد. سلولها توسط لام نیوبار شمارش شد.

تعیین درصد زنده بودن سلولها (Viability Test)

به منظور بررسی اثر دارو بر سلولها باید قبل از شروع آزمایش بیش از ۹۰درصد سلولها زنده باشند چرا که درصد زنده ماندن (Viability) پایین‌تر از ۹۰درصد صحت و دقت آزمایش را کاهش می‌دهد. تریپان‌بلو (sigma) از رنگهایی است که به دلیل وجود پمپهای غشایی سلولی وارد سلول زنده نمی‌گردد و فقط در سلولهای مرده نفوذ می‌نماید. لذا سلولهای مرده رنگ آبی را به خود می‌گیرند که با شمارش آنها و استفاده از فرمول زیر درصد زنده بودن سلولها تعیین می‌شود.

$$\text{درصد زنده بودن سلولها} = \frac{\text{تعداد سلولهای زنده}}{\text{مجموع سلولهای زنده و مرده}} \times ۱۰۰$$

برای انجام آزمایش ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی یکنواخت برداشته و با ۱۰۰ میکرولیتر تریپان‌بلو ۴درصد مخلوط شد. پس از گذشت چند ثانیه یک قطره از محلول برداشته و با استفاده از لام نیوبار و در خانه‌های مربوط به شمارش گلبولهای سفید شمارش و با استفاده از فرمول فوق درصد زنده بودن سلولها تعیین شد.

کشت سلولها و تاثیر دادن داروها

در ابتدا محیط DMED (Sigm)، FBS (۱۵درصد) (Gibco) و فاکتورهای رشد شامل: SCF، FL، IL-6، TPO (هر کدام با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میلی لیتر) (Stem cell Technologies) به یک لوله فالکون استریل اضافه شده و سپس با یکدیگر مخلوط شدند. برای هر نمونه سه غلظت مختلف FK506 (۱، ۲ و ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد و یک چاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. حجم نهایی در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای ۱۵۰ میکرولیتر و تعداد سلولها در هر چاهک پلیت $۱۰^۵$ سلول بود. پلیتها به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند.

بررسی مورفولوژی سلولها

از سلولهای خون بندناف پس از یک هفته کشت در شرایط مذکور گستره تهیه نموده و رنگ‌آمیزی رایت-گیمسا انجام گرفت. مورفولوژی

Archive of SID
www.SID.ir

این سلولها مورد بررسی و نسبت سلولهای رده میلوییدی به اریتروییدی تعیین شد.

سنجش کلونی (Colony Assay)

در این تحقیق سنجش کلونی در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول بلافاصله پس از جداسازی سلولهای تک‌هسته‌ای سنجش کلونی در حضور دوزهای مختلف داروی FK506 انجام گرفت. در مرحله دوم از سلولهایی که به مدت یک هفته در حضور دوزهای مختلف FK506 انکوبه شده بودند برداشت نموده و سنجش کلونی انجام گرفت.

روش انجام مرحله اول سنجش کلونی

در ابتدا محیط DMEM حاوی سلولهای تک‌هسته‌ای جدا شده (۳۳۰میکرولیتر)، FBS ۳۳۰ میکرولیتر و فاکتورهای GM-CSF (Stem Cell Technologies) با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میلی لیتر(۱۰ میکرولیتر) در یک لوله فالکون با یکدیگر مخلوط شدند. برای هر نمونه خون بندناف ۴ چاهک در نظر گرفته شد و سپس مقدار مورد نظر دارو FK506 (۱، ۲ و ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و در مرحله آخر آگار ۱درصد (۳۳۰میکرومولار) (Sigma) به هر چاهک اضافه شد. حجم نهایی در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه ای ۱میلی لیتر و تعداد سلولها در هر چاهک ۲۰۰۰۰ در نظر گرفته شد. پلیتها به مدت دو هفته در انکوباتور با دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. پس از گذشت این مدت، کلونیها در هر یک از چاهکهای پلیت با استفاده از میکروسکوپ معکوس شمارش شدند. تجمعات سلولی که حاوی بیش از ۵۰ سلول هستند به عنوان کلون در نظر گرفته می‌شوند. تجمعات سلولی پراکنده با تعداد کمتر از ۵۰ سلول به عنوان Cluster در نظر گرفته می‌شوند.

روش انجام مرحله دوم سنجش کلونی

در مرحله دوم سنجش کلونی، روش ذکر شده برای مرحله اول بر روی سلولهایی که به مدت یک هفته در پلیت حاوی DMEM و FBS و فاکتورهای رشد شامل SCF، IL-6، TPO و FL (هر کدام با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میلی لیتر) و غلظتهای مورد نظر دارو (۱، ۲ و ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر) انکوبه شده بودند، انجام شد. از آنجایی که سلولها از قبل در معرض دوزهای مختلف دارو قرار گرفته بودند در این مرحله FK506 به چاهکها اضافه نشد.

بررسی مارکر CD34 ازطریق فلوسایتومتری

از آنجایی که مشخصه سلولهای بنیادی وجود آنتی ژن CD34 است در این تحقیق درصد سلولهای $CD34^+$ نیز تعیین گردید. به این منظور ابتدا سوسپانسیون سلولهایی را که به مدت یک هفته تحت تاثیر دوزهای مختلف FK506 قرار گرفته بودند، برداشت نموده و شمارش سلولی انجام گرفت. سلولهای مذکور دو مرتبه با بافر PBS (با PH=۷/۲-۷/۴) شستشو شدند. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی که حاوی ۱×۱۰^۶ سلول بود با ۷/۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی مونوکلونال علیه CD34 به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. یک آنتی‌بادی مونوکلونال غیر واکنش‌دهنده (کونژوگه با RPE) با ایزوتایپ مشابه به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از این مرحله سلولها دو مرتبه با بافر PBS شستشو و توسط پارافرمالدیید ۱درصد فیکس شدند. نمونه‌ها به دستگاه فلوسایتومتری ارایه شد.

آنالیز آماری

قبل از انجام آزمونهای آماری به منظور آنالیز اختلاف میانگینها، می‌بایستی نحوه توزیع داده‌ها از لحاظ نرمال یا غیرنرمال بودن بررسی شود. به منظور بررسی نرمال بودن توزیع متغیر مورد نظر در گروههای مختلف (۴ گروه) از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف (Kolmogorov Smirnov Test) (نرم افزار SPSS، نگارش ۹، کمپانی SPSS Inc) استفاده شد. در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها، آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرف (ANOVA: Analysis of Variance) انجام شد.آزمون آماری ANOVA برآوردی کلی از اختلاف میانگین گروههای مختلف ارایه می‌دهد.

یافته‌ها

نتایج شمارش سلولها پس از یک هفته تیمار با دارو در مقایسه با کنترل در جدول و نمودار یک مشاهده می‌گردد (کلیه اعداد به صورت Mean±SD می‌باشند). آزمون ANOVA اختلاف معنی‌داری را بین گروههای مورد بررسی نشان نداد (P=۰/۱۲۶). نتایج بررسی نسبت رده میلوییدی به رده اریتروییدی پس از یک هفته تیمار با داروها در مقایسه با کنترل در جدول و نمودار دو مشاهده می‌گردد. نتایج به دست آمده تفاوتی را در نسبت رده میلوییدی به رده اریتروییدی در گروههای مورد بررسی نشان نمی‌دهد (P=۰/۸۱۹).

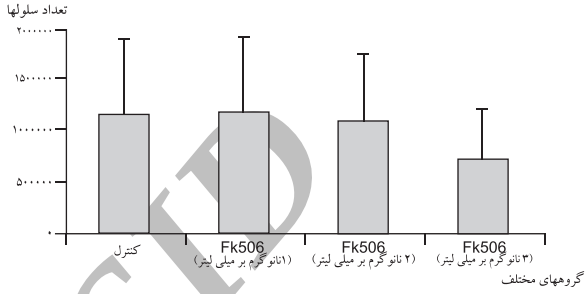
نتایج شمارش تعداد کلونیها در مرحله اول سنجش کلونی، در جدول و نمودار سه مشاهده می‌گردد. نتایج به دست آمده نشان دهنده کاهش توانایی کلونی‌زایی سلولها در حضور این دارو در مقایسه با کنترل می‌باشد (P=۰/۰۰۰). نتایج شمارش تعداد کلونیها در مرحله دوم سنجش کلونی در جدول و نمودار چهار مشاهده می‌گردد. آزمون ANOVA اختلاف معنی‌داری را بین گروههای مورد بررسی نشان نمی‌دهد (P=۰/۱۰۹). نتایج مقایسه شمارش تعداد کلونیها در مرحله اول سنجش کلونی و مرحله دوم آن در جدول و نمودار پنج مشاهده می‌گردد. نتایج بررسی درصد مارکر CD34 پس از یک هفته تیمار سلولها با FK506 در مقایسه با کنترل در جدول و نمودار شش مشاهده می‌گردد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد یک هفته تیمار سلولها با این دارو در حضور سایتوکاینها، درصد سلولهای CD34 را در مقایسه با کنترل (بدون دارو) افزایش می‌دهد (P=۰/۰۱۸).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: نتایج شمارش سلولی پس از یک هفته تیمار با FK506 در مقایسه با کنترل

چاهک	شمارش سلولها
شماره ۱ (کنترل)	۱۱۴۷۵۰۰ ± ۷۲۹۰۸۶
شماره ۲ (۱نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۱۱۶۷۵۰۰ ± ۷۳۴۹۰۳
شماره ۳ (۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۱۰۸۱۰۰۰ ± ۶۵۴۶۹۸
شماره ۴ (۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۷۲۵۴۰۰ ± ۴۸۴۸۷۲

کلیه اعداد به صورت Mean±SD می‌باشند.

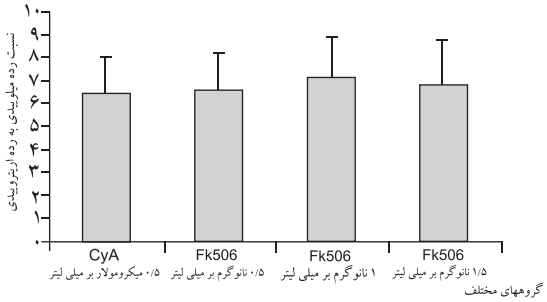


نمودار ۱: نتایج شمارش سلولی پس از یک هفته تیمار با FK506 در مقایسه با کنترل. نتایج به صورت Mean±SD نشان داده شده است.

جدول ۲: نتایج بررسی نسبت رده میلوییدی به رده اریتروییدی پس از یک هفته تیمار با FK506 در مقایسه با کنترل

چاهک	M/E
شماره ۱ (کنترل)	۶/۳۷ ± ۱/۷۷
شماره ۲ (۱نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۶/۵۸ ± ۱/۶۳
شماره ۳ (۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۷/۱ ± ۱/۸۱
شماره ۴ (۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۶/۸۱ ± ۱/۹۱

کلیه اعداد به صورت Mean±SD می‌باشند.

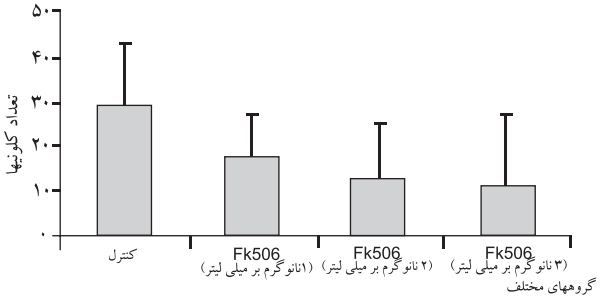


نمودار ۲: نتایج بررسی نسبت رده میلوییدی به رده اریتروییدی پس از یک هفته تیمار با FK506 در مقایسه با کنترل. نتایج به صورت Mean±SD نشان داده شده است.

جدول ۳: نتایج شمارش تعداد کلونیها در مرحله اول سنجش کلونی

چاهک	تعداد کلونیها
شماره ۱ (کنترل)	۲۹/۳۵ ± ۱۴/۱۱
شماره ۲ (۱نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۱۷/۸۵ ± ۹/۷۹
شماره ۳ (۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۱۲/۶ ± ۱۳/۱۶
شماره ۴ (۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۱۱/۵ ± ۱۵/۶۶

کلیه اعداد به صورت Mean±SD می‌باشند.

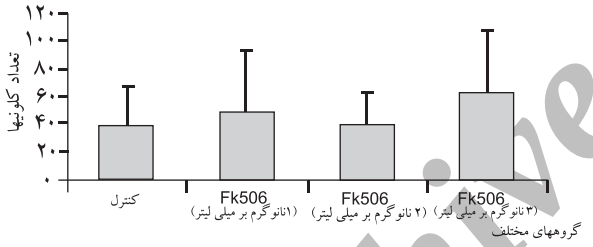


نمودار ۳: نتایج شمارش تعداد کلونیها در مرحله اول سنجش کلونی. کلیه اعداد به صورت Mean±SD نشان داده شده است.

جدول ۴: نتایج شمارش تعداد کلونیها در مرحله دوم سنجش کلونی

چاهک	تعداد کلونی
شماره ۱ (کنترل)	۳۹/۲ ± ۲۸/۷۱
شماره ۲ (۱نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۵۰/۲ ± ۴۲/۱۹
شماره ۳ (۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۳۸/۱ ± ۲۵/۹۶
شماره ۴ (۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۶۳/۵ ± ۴۵/۸۹

کلیه اعداد به صورت Mean±SD می‌باشند.



نمودار ۴: نتایج شمارش تعداد کلونیها در مرحله دوم سنجش کلونی. کلیه اعداد به صورت Mean±SD نشان داده شده است.

جدول ۵: مقایسه نتایج شمارش کلونیها در مرحله اول و دوم سنجش کلونی

چاهک	تعداد کلونیها در مرحله اول	تعداد کلونیها در مرحله دوم
شماره ۱ (کنترل)	۲۹/۳۵ ± ۱۴/۱۱	۳۹/۲ ± ۲۸/۷۱
شماره ۲ (۱نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۱۷/۸۵ ± ۹/۷۹	۵۰/۲ ± ۴۸/۱۹
شماره ۳ (۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۱۲/۶ ± ۱۳/۱۶	۳۸/۱ ± ۲۵/۹۶
شماره ۳ (۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۱۱/۵ ± ۱۵/۶۶	۶۳/۵ ± ۴۵/۸۹

کلیه اعداد به صورت Mean±SD می‌باشند.

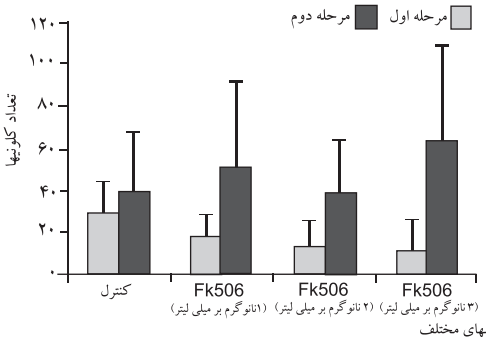
جدول ۶: نتایج بررسی درصد سلولهای $CD34^+$ پس از یک هفته تیمار با FK506 در مقایسه با کنترل

چاهک	درصد سلولهای $CD34^+$
شماره ۱ (کنترل)	۴/۷ ± ۲/۲
شماره ۲ (۱نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۸/۱ ± ۳/۴
شماره ۳ (۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۱۰/۲ ± ۲/۸
شماره ۴ (۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر FK506)	۱۲/۸ ± ۴/۳

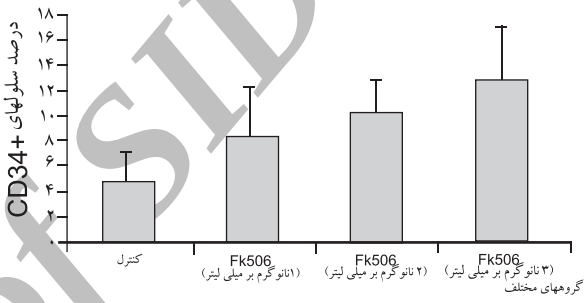
کلیه اعداد به صورت Mean±SD می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۵: مقایسه نتایج شمارش تعداد کلونیها در مرحله اول و دوم سنجش کلونی. کلیه اعداد به صورت Mean±SD نشان داده شده است.



نمودار ۶: نتایج بررسی درصد سلولهای $CD34^+$ پس از یک هفته تیمار با FK506 در مقایسه با کنترل. کلیه اعداد به صورت Mean±SD نشان داده شده است.

بحث

خون بندناف حاوی سلولهای بنیادی خون‌ساز است که از آنها سلولهای بالغ و عملکردی مشتق می‌شوند (۱۳). تکثیر(توانایی تقسیم دوتایی و ایجاد سلولهای جدید از یک جمعیت سلولی مشخص) و ازدیاد (افزایش تولید سلولهای بنیادی و اجدادی) سلولهای اجدادی خون‌ساز در آزمایشگاه به تمایز یا عدم تمایز این سلولها و در صورت متمایز شدن این سلولها بستگی به رده و مرحله بلوغ آنها دارد. تکثیر و ازدیاد سلولهای خون‌ساز همچنین به عواملی نظیر نوع محیط کشت، حضور یا فقدان سرم در محیط کشت، دما و تعداد سلولهای کشت شده در هر محیط مرتبط است (۱۴، ۱۵). به عنوان مثال استفاده از فاکتورهای early acting (سایتوکاینهایی که بر سلولهای بنیادی و اجدادی اولیه تاثیر دارند) نظیر SCF و FL باعث ازدیاد سلولهای خون‌ساز می گردد، در حالی که استفاده از فاکتورهای late acting (سایتوکاینهایی که بر سلولهای تمایز یافته‌تر تاثیر دارند) نظیر اریتروپویتین موجب تکثیر این سلولها می گردد. مطالعات نشان می‌دهند استفاده از ترکیبی از سایتوکاینهای early acting باعث ازدیاد مناسب سلولهای $CD34^+$ می‌گردد. با توجه به مطالعات انجام گرفته، در تحقیق حاضر از چهار سایتوکاین SCF، FL، TPO و IL-6 (هر کدام با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از شمارش سلولها پس از یک هفته تیمار با FK506 در حضور سایتوکاینهای early acting؛ می‌توان نتیجه گرفت که این دارو بر تکثیر سلولهای خون‌ساز بندناف تاثیر قابل ملاحظه‌ای ندارد که با توجه به ترکیب سایتوکاینهای استفاده شده قابل انتظار بود. اگرچه میانگین شمارش سلولهای تیمار شده با داروها در مقایسه با کنترل افزایش نشان نمی‌دهد اما تعداد کل سلولهای تک هسته‌ای موجود در سوسپانسیون سلولی، مقیاس مستقیمی از تعداد سلولهای بنیادی خون‌ساز نیست. با توجه به تعریف توانایی ازدیاد سلولی (توانایی تولید بالاتر سلولهای بنیادی) و با توجه به افزایش درصد سلولهای $CD34^+$ (مارکر مشخصه سلولهای بنیادی و اجدادی) پس از یک هفته تیمار با دارو در مقایسه با کنترل می‌توان نتیجه گرفت این دارو باعث ازدیاد سلولهای خون‌ساز بندناف می گردد. مشخصه سلولهای بنیادی وجود آنتی ژن CD34 است. این آنتی‌ژن یک گلیکوپروتیین سطحی است که در اتصال سلولهای بنیادی به سلولهای استروما نقش دارد (۱۶). دقیق‌ترین آزمون پیشگویی کننده تعداد سلولهای بنیادی خون‌ساز که وجود آنها برای انجام پیوند ضروری است، سنجش کلونی است. نتایج حاصل از انجام سنجش کلونی بدون تیمار قبلی سلولها با دارو و سایتوکاینهای early acting، کاهش کلونی‌زایی را نشان می‌دهد، در حالی که انجام سنجش کلونی پس از یک هفته تیمار با دارو و سایتوکاینهای early acting افزایش کلونی زایی را نشان می‌دهد. این تفاوت در رفتار دو گانه سلولها در دو مرحله، می‌تواند به علت حضور سایتوکاینهای early acting (SCF، FL، TPO، IL-6) در مرحله دوم و یا به عبارت دیگر به علت تفاوت در ترکیب محیط کشت سنجش کلونی در طی دو مرحله باشد. البته به نظر می‌رسد داروی FK506 با این سایتوکاینها اثر هم افزایی نیز دارد به طوری که تعداد کلونیها در مرحله دوم درچاهکهای حاوی دارو، در مقایسه با کنترل افزایش بیشتری را نشان می‌دهد. هر چند افزایش حاصل معنی‌دار نبود اما این امکان وجود دارد که در صورت استفاده از غلظتهای بالاتر دارو تفاوت مشاهده شده معنی‌دار شود. تفاوت مشاهده شده در نتایج مرحله اول و دوم سنجش کلونی می‌تواند به علت تفاوت در طول مدت تیمار سلولها با این دارو باشد. در تنها مطالعه‌ای که در آن پیش از انجام سنجش کلونی، تیمار سلولها با داروها (سایکلوسپورین، FK506 و KM2210) انجام گرفت، یافته‌های به دست آمده هم در تیمار ۴ ساعته و هم در تیمار ۲۴ ساعته با یکدیگر مطابقت داشتند (۱۱). البته در مدت زمان تیمار سلولهای هدف با داروها پیش از انجام سنجش کلونی، نوع سایتوکاینها ی مورد استفاده در محیط کشت در زمان انجام تیمار، و نوع سلولهای هدف در تحقیق مذکور و تحقیق موجود تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده می گردد. پس به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت تفاوت در رفتار دو گانه سلولها در دو مرحله می‌تواند به علت تفاوت در ترکیب محیط کشت طی دو مرحله یا به علت تفاوت در طول مدت تیمار سلولها با این دارو یا هر دو عامل باشد.

با توجه به تفاوتهای موجود در روش انجام سنجش کلونی در مطالعات قبلی و در مطالعه حاضر، از جمله تفاوت در مدت زمان تیمار سلولهای هدف با داروها پیش از انجام سنجش کلونی، تفاوت در نوع سایتوکاینها ی مورد استفاده در محیط کشت در زمان انجام تیمار، یا عدم تیمار و افزودن مستقیم داروها به محیط نیمه جامد، تفاوت در نوع سایتوکاینهای افزوده شده به محیط نیمه جامد و نوع سلولهای هدف (سلولهای جدا شده از مغز استخوان انسان یا موش، خون محیطی و خون

Archive of SID
www.SID.ir

بـندناف)؛ در نـتایج به دست آمـده از ایـن مـطالعه و مـطالعات قـبلی اختلافاتی مشاهده می گردد. به عنوان مثال در تنها مطالعه‌ای که در آن پیش از انجام سنجش کلونی، تیمار سلولها با داروها انجام گرفت (البته مدت زمان تیمار و نوع سایتوکاینهای مورد استفاده در محیط کشت تفاوت داشت.)؛ تاثیر داروهای سرکوب گر سایکلوسپورین، FK506 و KM2210 بر توانایی کلونی‌زایی سلولهای بنیادی خون‌ساز موش بررسی شد. در این تحقیق سلولها به مدت ۴ ساعت و ۲۴ ساعت در مجاورت غلظتهای متفاوت این سه دارو قرار گرفتند. پس از آن آزمایش سنجش کلونی در مورد آنها انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان دادند که FK506 در دوزهای پایین‌تر از ۱۰۰-۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر، تشکیل کلونی را افزایش و دوزهای بالاتر از این مقادیر ایجاد کلونی را کاهش می‌دهند و این یافته‌ها هم در تیمار ۴ ساعته و هم در تیمار ۲۴ ساعته صدق می کند (۱۱). با توجه به این که توانایی کلونی‌زایی مشخصه سلولهای بنیادی است، می توان گفت تیمار سلولهای تک هسته‌ای خون بـندناف بـا FK506 در حـضور سـایتوکاینهای early acting بـاعث افزایش سلولهای بنیادی و اجدادی خون‌ساز می گردد. نتایج به دست آمـده از مـقایسه مـیانگین نـسبت رده مـیلوییدی به رده اریـتروییدی در گـروههای مـختلف نـشان مـی‌دهد تـفاوت مـعنی‌داری در بـین آنـها وجـود نـدارد. پس مـی‌توان نـتیجه گـرفت ایـن دارو مـوجب تـمایز سـلولهای خون‌ساز به سمت یک رده خاص نمی گردد. FK506 علاوه بر این که به عنوان داروی سرکوب گر ایـمنی نقش مـهمی در پیش گیری و درمان GVHD حـاد دارد، مـی‌تـوانـد در *in vitro* مـوجب ازدیـاد سـلولهای خون‌ساز و افزایش توانایی کلونی‌زایی آنها شود و در ضمن تاثیری نیز بر تمایز سلولهای خون‌ساز نداشته باشد. بررسی تاثیرFK506، سایکلوسپورین و راپـامایسین(داروی سـرکوب گر ایـمنی مـتصل شـونده به ایـمونوفیلین FKBP) بر سلولهای $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف، مغزاستخوان و خون محیطی پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

در این تحقیق از کمکها ومساعدتهای سرکار خانم ابراهیمی، سرکار خانم دکتر ذنوبی، پرسنل محترم بیمارستان مادران تهران و سرکار خانم نیکوگفتار بهره مند شدیم که بدینوسیله از زحمات و مساعدتهای این عزیزان سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Knudtzon S: In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. Blood, 1974; 43: 357-361
2. Nakahata T, Ogawa M: Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. J Clin Invest, 1982; 70: 1324
3. Leary AG, Ogawa M: Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. Blood, 1987; 69: 953-956
4. Gluckman E, Broxmeyer H, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P: Hematopoietic reconstitution of a patient with Fanconi anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. N. Engl. J. Med., 321: 1174-1178, 1989.
5. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL: Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. N Engl J Med, 1990; 323: 570
6. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps U, Seligsohn U:: Williams Heamatology, Sixed Edition, McGraw-Hill, 2001; 229-231
7. Drews J: Immuno-pharmacology. Springer-Verlag, 1990; 158-160
8. Almawi WY, Melemedjian OK: Clinical and mechanistic differences between FK506 (Tacrolimus) and cyclosporine A. Nephrol. Dial Transplant, 2000; 15: 1916-1918
۹. وجـگانی م، ایـمونولوژی. جـلد دوم، چـاپ اول، تـهران، انـتشارات مـعاونت پژوهشی وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشکی، صفحات۲۲۴-۲۲۱
10. Hirao A, kawano Y, Takaue Y: Effects of Immunosuppressants FK506, Deoxyspergualin and CSA on immature human hematopoies. Blood, 1993; 81: 1179-1183
11. Zhu X, Imamura M, Hashino S, Tanaka J, Kobuyashi S: Enhancing and suppressive effects of immunosuppressants CSA, FK506, and KM2210 on the colony formation of murine bone marrow cells. Ann Hematol, 1995; 71(6): 301-306
12. Perry SS, Kim M, Spangrude GJ: Directs effects of cyclosporin A on proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells. cell Transplant, 1999; 8(4): 339-344
13. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA: Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc Natl Acad Sci, 1989; 86: 3828-3832
14. Flores-Guzman P, Gutierrez-Rodriguez M, Mayani H: In vitro proliferation, expansion and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. Archives of Medical Research, 2002; 33: 107-114
15. Mayani H, Gilbert LJ, Janowska –Wieczorek A: Biology of the hemopoietic microenvironment. Eur J Haematol, 1992; 49: 225-233
16. Sutherland DR, Keating A: The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. J Hematother, 1992; 1:115-129

Archive of SID
www.SID.ir