بررسی بهترین شرایط کشت برای تکثیر سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ خون بند ناف جهت استفاده در پیوند به بیماران

میترا خلیلی M.Sc.[1]، کامران علی مقدم M.D.[1]*، مسعود سلیمانی Ph.D.[2]، پانتهآ قدسی B.Sc.[1]، پریسا حیات B.Sc.[3]، لیلا معزی M.Sc.[1]، علی ارجمند M.Sc.[1]، ماندانا محی الدین Ph.D.[1]، اردشیر قوام زاده M.D.[1]

۱. دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان شریعتی، مرکز تحقیقات هماتولوژی – انکولوژی و پیوند مغز استخوان

۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی

۳. دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سلولی – مولکولی

* آدرس مکاتبه: تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۴، بیمارستان شریعتی، مرکز تحقیقات هماتولوژی – انکولوی و پیوند مغز استخوان

پست الکترونیک: Email: alimgh@ams.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۱۱/۲، پذیرش مقاله: ۸۵/۲/۳۱

* **هدف:** ارزیابی محیط‌های مختلف برای دست‌یابی به بهترین شرایط کشت جهت تکثیر سلول‌های پایه خونساز $CD34^+/CD38^-$ خون بند ناف

* **مواد و روش‌ها:** سلول‌های مونونوکلئار (MNCs) از خون بند ناف جداسازی و در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) و یا ۱۰درصد پلاسمای خون بند ناف (CBP) و همچنین محیط فاقد سرم (SF) در حضور ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از ترکیب سایتوکاینی اینترلوکین ۶ (IL-6)، اینترلوکین ۳ (IL-3)، ترمبوپوئتین (TPO)، فاکتور رشد سلول‌های پایه (SCF) و لیگاند تیروزین کیناز کبد جنینی(Flt3-L) به مدت دو هفته کشت داده شدند. درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ و تعداد کل سلول‌های MNC در روز اول، هفتم و چهاردهم به دست آمد.

* **یافته‌ها:** در کشت دو هفته‌ای میانگین افزایش درصد سلول‌های $CD34^+$ و سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ به ترتیب در محیط FCS، ۲۰/۴ و ۵۷/۴ برابر، در محیط SF ۵/۶ و ۱۰/۳ برابر و در محیط CBP ۱۰/۸ و ۴/۷ برابر روز اول به دست آمد.

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به تکرارپذیری و قابل پیش‌بینی بودن نتایج، سلامت کشت از نظر عدم ایجاد آلرژی ویا آلودگی‌های میکروبی مربوط به استفاده از سرم حیوانی و مقدار کافی افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در محیط SF جهت استفاده در پیوند (تا بیش از ۵ برابر)، این محیط نسبت به دو محیط‌های حاوی FCS و CBP جهت استفاده در کلینیک مناسب‌تر است.

کلیدواژگان: سلول‌های پایه خون‌ساز، خون بند ناف، تکثیر سلولی در ex vivo

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۱، بهار ۸۵، صفحات ۴۴-۳۹

مقدمه

تمامی سلول‌های خونی از جمعیت اندک سلول‌های پایه خون‌ساز (Hematopoietic Stem Cells: HSCs) منشا می‌گیرند. این سلول‌ها قابلیت تبدیل به خود (Self renewing) و قدرت تمایز به رده‌های مختلف سلول‌های خونی را دارا هستند (۱، ۲). امروزه استفاده از این سلول‌ها در بسیاری از بیماری‌های خونی و غیرخونی از جمله درمان بیماری‌های لنفومای میلوییدی مزمن (Cronic Myeloid Lymphoma: CML) و نقص‌های ایمنی مورد توجه قرار گرفته است (۳، ۴). در گذشته مغزاستخوان (Bone Marrow: BM) و خون محیطی تنها منبع مورد استفاده جهت پیوند سلول‌های HSC به بیماران بودند. اما در دهه گذشته خون بند ناف (Umbilical Cord Blood: UCB) به عنوان منبع دیگری از سلول‌های HSC جهت پیوند آلوژنیک در بیماران فاقد دهنده با HLA مشابه مطرح شده است. تاکنون بیش از ۸۰۰ پیوند در کودکان توسط UCB صورت گرفته است (۵، ۶، ۷). استفاده از UCB باعث کاهش بیماری پیوند علیه میزبان (Graft Versus Host Diseases: GVHD) و شانس موفقیت بالاتر در پیوند در مقایسه با پیوند BM می شود (۳). پتانسیل تکثیر HSCs در UCB بالاتر از BM است (قابلیت تکثیر تا ۳۰ هفته در برابر ۱۰ هفته BM) (۸). از مزایای دیگر UCB این است که دسترسی به آن بسیار راحت‌تر از BM بوده و برای دهنده خطری ندارد. این سلول‌ها می‌توانند به راحتی از افراد خویشاوند یا غیرخویشاوند جمع‌آوری و در بانک خون ذخیره شوند (۳). اما مشکل عمده در استفاده از UCB حجم اندک خون (~۱۰۰میلی‌لیتر) و تعداد کم سلول‌های هسته‌دار و HSCs لازم جهت پیوند به فرد بالغ و تاخیر در زمان بازیافت مجدد پلاکت‌ها و نوتروفیل‌ها در مقایسه با BM است که منجر به مرگ و میر در بیماران می‌شود (۹). حداقل تعداد سلول‌های هسته‌دار و $CD34^+$ مورد نیاز برای فرد بالغ به ترتیب $۳/۷\times۱۰^۷$ NC/Kg و $۲-۴\times۱۰^۶$ $CD34^+$/kg سلول می‌باشد. در حالی که تعداد کل سلول‌های شمارش شده در نمونه‌های UCB به طور متوسط ۱۱×۱۰^۸ است که فقط برای کودک ۳۰ کیلوگرمی کافی است (۳). بنابراین برای پیوند سلول‌های HSC خون بند ناف به بیماران بزرگسال لازم است که این سلول‌ها قبل از استفاده در محیط in vitro تکثیر شوند، بدون اینکه قابلیت پیوند و مولتی پتانسیل

Archive of SID
www.SID.ir

بودن آنها تغییر کند. در مطالعات متعدد، از ترکیبات سایتوکاینی مختلفی برای این منظور استفاده شده است (۱۵-۱۰). در این مطالعه از ترکیب سایتوکاین‌های نوترکیب اینترلوکین ۶ (IL-6)، اینترلوکین ۳ (IL-3)، ترمبوپوئتین (TPO) فاکتور رشد سلول‌های پایه (SCF)، لیگاند تیروزین کیناز کبد جنینی (Flt3-L) استفاده شد. Flt3-L و SCF برای تکثیر و بقا HSCs ضروری هستند و مانع آپوپتوزیز آنها می‌شوند.

IL-3 در خون‌سازی نقش دارد. IL-6 یک فاکتور رشد غیراختصاصی است که در مراحل اولیه خون‌سازی باعث تکثیر HSCs می شود. TPO باعث ایجاد رده‌های مگا کاریوسیتی می‌شود (۱۲). علاوه بر سایتوکاین‌ها حضور سرم نیز در محیط کشت باعث پشتیبانی از رشد و تکثیر سلول‌های HSC می‌شود ولی از نظر قوانین GMP بهتر است از محیط‌های فاقد سرم برای تکثیر HSCs جهت پیوند به بیماران استفاده شود. زیرا FCS و ترکیبات مشتق از حیوان ممکن است باعث آلرژی در انسان شوند و یا منبع آلودگی‌های مختلف باشند. به همین دلیل در برخی از مطالعات به جای سرم حیوان از ترکیبات جایگزین سرم مانند BSA و انسولین (۱۱) و یا کشت همزمان HSCs بروی لایه‌ای از سلول‌های استرومای BM انسانی استفاده شده است (۱۴، ۱۵). این مطالعه نیز جهت مقایسه میزان تکثیر و بقای سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در محیط فاقد سرم (SF)، نسبت به محیط‌های حاوی پلاسمای خون بند ناف (CBP) و سرم جنین گاوی (FCS) در حضور ترکیب سایتوکاینی مشترک و همچنین ارزیابی توانایی CBP در جایگزینی با FCS انجام شد تا بهترین شرایط جهت تکثیر HSCs تعیین شود و نتایج این مطالعه در کلینیک مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه خون بند ناف و جداسازی سلول‌های مونونوکلئار

پس از دریافت فرم رضایت تحقیق از بیماران بخش زایمان بیمارستان شریعتی و میلاد، خون بند ناف (UCB) نوزاد تازه متولد شده تهیه (به طور متوسط ۷۰ میلی‌لیتر) و در کیسه‌های ۴۵۰ میلی‌لیتری حاوی ماده ضد انعقاد CPDA (JMS) جمع‌آوری شد. UCB با نسبت ۵ به ۱ با اتیل استارچ (Sigma) مخلوط و به مدت ۲-۱ ساعت باقی ماند تا گلبول‌های قرمز رسوب کنند.

سپس ۷ میلی‌لیتر از محلول رویی به آرامی روی ۳ میلی‌لیتر فایکول (GiBco) قرار گرفت و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس سلول‌های مونونوکلئار (MNCs) از لایه وسط جداسازی و دو بار با محیط کشت RPMI 1640(GiBco) شستشو داده شد. پلیت سلولی با ۱ میلی لیتر محیط کشت RPMI 1640 سوسپانس شد و جمعیت سلولی حاصل توسط لام نئوبار و رنگ آمیزی تریپان بلو شمارش شد.

انواع محیط های کشت و مخلوط سایتوکاینهای مورداستفاده

در این مطالعه از ۲ محیط کشت RPMI 1640 (GiBco) همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (GiBco) و یا ۱۰ درصد پلاسمای خون بند ناف و محیط فاقد سرم (SF) برای سلول‌های خون‌ساز (Stem span^{TM}, Stem cell) و از ترکیب سایتوکاینی F1t3 Ligand، TPO، SCF، IL-6 و IL-3(R&D) به مقدار ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد.

کشت و تکثیر سلولهای HSC

تعداد ۵×۱۰^۵ سلول MNC در یک میلی‌لیتر محیط کشت به هر ول از پلیت ۲۴ خانه (Nunc) افزوده شد. سلول‌ها در محیط‌های کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰ درصد FCS (FCS)،RPMI 1640 همراه با ۱۰ درصد CBP (CBP) و محیط فاقد سرم (Serum Free: SF) و ۵۰ نانوگرم از سایتوکاین‌های مختلف ذکرشده به مدت ۲ هفته در Co_2 انکوباتور با ۱۰۰ درصد رطوبت انکوبه شدند. برای هر نمونه ۲ چاهک (ول) اختصاص داده شد. در پایان هفته اول نیمی از محیط قبلی با محیط حاوی فاکتور تازه تهیه شده تعویض شد و سلول‌ها در روز اول، روز هفتم و روز چهاردهم شمارش شدند.

فلوسایتومتری

تعداد ۱×۱۰^۵ سلول از هر نمونه در روزهای اول، هفتم و چهاردهم با آنتی بادی‌های ضد CD34 کونژوگه با FITC و ضد CD38 کونژوگه با PE (Dako) و آنتی‌بادی‌های IgG1 موشی کونژوگه با FITC و PE (Dako) به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از شستشو با PBS حاوی ۰/۱درصد BSA، درصد سلول‌های $CD34^+/38^-$ توسط دستگاه فلوسایتومتری (Partec, PASIII) آنالیز شد.

آنالیز داده ها

برای مقایسه محیط‌های مختلف با یکدیگر از نظر میزان افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ و سلول‌های $CD34^+$ در روزهای ۷ و ۱۴ از نرم افزار SPSS 11.5 استفاده شد و ماکزیمم، میانگین و میانه افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/38^-$ و سلول‌های $CD34^+$ در روزهای ۷ و ۱۴ به دست آمد.

جهت مقایسه میزان تکثیر سلول‌ها در محیط‌های مختلف در روز هفتم و یا چهاردهم و همچنین جهت مقایسه میزان تکثیر سلول‌ها در هر محیط در روزهای هفتم و چهاردهم نسبت به روز اول از آزمون non parametric test- Wilcoxon استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه تعداد ۱۴ نمونه UCB مورد استفاده قرار گرفت. میانگین تعداد سلول‌های MNC، $CD34^+$ و $CD34^+/CD38^-$ در روز اول به ترتیب $۱۰^۵ \times (۱/۲۷ -/+)$ ۵/۳، $۱۰^۳ \times (۱۳/۹ -/+)$ ۱۹/۲۹ و $۱۰^۳ \times (۷/۹۹ -/+)$ ۸/۲۹ به دست آمد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: مقایسه میانگین، ماکزیمم و میانه افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در روزهای هفتم و چهاردهم. SF: محیط فاقد سرم $Stem\ span^{TM}$، FCS: محیط حاوی سرم جنین گاوی و CBP: محیط حاوی پلاسمای خون بند ناف

انواع محیط کشت	روز هفتم			روز چهاردهم		
	میانگین Mean	ماکزیمم Maximum	میانه Medium	میانگین Mean	ماکزیمم Maximum	میانه Medium
SF	۸/۷ (+/-۱۲/۹۶)	۴۶/۲۶	۴	۱۰/۳۵(+/-۱۳/۶۵)	۵۱	۶/۳
FCS	۲۵/۵ (+/-۷۲/۴۳)	.۲۶۳	۲	۵۷/۴(+/-۹۳/۸۹)	۲۹۸	۹/۸
CBP	۱۳/۵ (+/-۳۱/۲۸)	۱۱۲	۳/۳	۴/۷(+/-۴/۳)	۱۱/۰۳	۲/۸

جدول ۲: مقایسه میانگین، ماکزیمم و میانه افزایش درصد سلول‌های $CD34^+$ در روزهای هفتم و چهاردهم. SF: محیط فاقد سرم $Stem\ span^{TM}$، FCS: محیط حاوی سرم جنین گاوی و CBP: محیط حاوی پلاسمای خون بند ناف

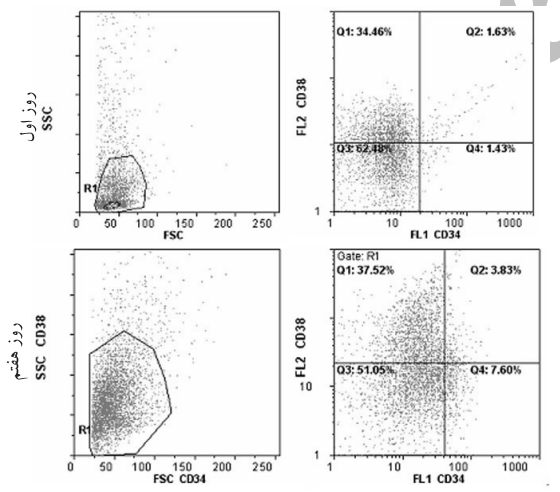
انواع محیط کشت	روز هفتم			روز چهاردهم		
	میانگین Mean	ماکزیمم Maximum	میانه Medium	میانگین Mean	ماکزیمم Maximum	میانه Medium
SF	۴/۷ (+/-۸/۱۷)	۲۶/۸۷	۱/۱۷	۵/۶۱(+/-۷/۹۱)	۲۹/۷	۳/۴
FCS	۱۰/۱۱(+/-۱۱/۳۱)	۲۹/۴۵	۵/۸	۲۰/۴۵(+/-۲۶/۸۷)	۸۴/۷	۸/۴
CBP	۱۰/۰۴(+/-۶/۴)	۳۱/۱۹	۱/۳	۱۰/۸۲(+/-۲۰/۱۴)	۶۸/۱	۱/۱۵

نتایج افزایش تعداد مطلق سلول‌های MNC

بالاترین میانگین و ماکزیمم افزایش درصد تعداد مطلق MNC نسبت به روز اول از محیط FCS به دست آمد که به ترتیب (۰/۷۸-/+) ۱/۳ و ۲/۵ در روز هفتم و (۲/۳-/+) ۲/۷ و ۲/۵ برابر در روز چهاردهم بود. در مقایسه محیط‌های مختلف روز چهاردهم، تمام محیط‌ها افزایش معنی‌داری را در تعداد سلول‌های MNC نسبت به روز اول نشان دادند.

نتایج افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در روزهای هفتم و چهاردهم

درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ توسط فلوسایتومتری در روزهای اول، هفتم و چهاردهم تعیین شد (شکل ۱). بالاترین میانگین و ماکزیمم افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در روزهای هفتم و چهاردهم از محیط FCS به دست آمد (جدول ۱). ماکزیمم و میانگین افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در این محیط در روز هفتم به ترتیب ۲۶۳ و (۷۲/۴ -/+) ۲۵/۵ برابر و در روز چهاردهم به ترتیب ۲۹۸ و (۹۳/۸۹ -/+) ۵۷/۴ بود. به طور کلی در روز چهاردهم میانگین و میانه افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در محیط FCS بالاتر از SF و در محیط SF بالاتر از CBP بود (جدول ۱ و شکل ۲). در روزچهاردهم ۷۶ درصد نمونه‌ها در محیط‌های SF و FCS و ۵۸ درصد نمونه‌ها در محیط CBP بیش از دو برابر تکثیر شده بودند. در ارزیابی میزان افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در هر محیط، در روز هفتم محیط‌های SF و CBP (SF با $p=۰/۰۰۶$ و CBP با $p=۰/۰۳۳$) و در روز چهاردهم تمامی محیط‌ها (SF با $p=۰/۰۰۲$، FCS با $p=۰/۰۰۳$ و CBP با $p=۰/۰۱۹$) نسبت به روز اول اختلاف معنی‌داری داشتند. همچنین محیط‌ها از نظر میزان تکثیر سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در روزهای هفتم و چهاردهم با یکدیگر مقایسه شدند. سه محیط در روز هفتم تفاوت معنی‌داری با هم نشان ندادند. در روز چهاردهم محیط SF نسبت به محیط CBP ($p=۰/۰۳۴$) و محیط FCS نسبت به محیط CBP ($p=۰/۰۰۳$) میزان تکثیر بیشتری داشتند، اما در محیط‌های FCS و SF اختلاف معنی‌دار نبود.



شکل ۱: فلوسایتومتری برای سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در محیط FCS

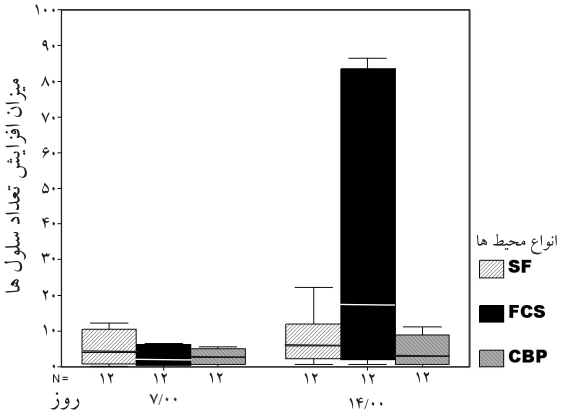
نتایج افزایش درصد سلول‌های $CD34^+$ در روزهای هفتم و چهاردهم

در بررسی افزایش درصد سلول‌های $CD34^+$ در روزهای هفتم و چهاردهم، محیط FCS بالاترین میانگین و ماکزیمم را نشان داد که مقدار آن به ترتیب (۱۱/۳۱-/+) ۱۰/۱۱ و ۲۹/۴ برابر در روز هفتم و

Archive of SID
www.SID.ir

(۲۶/۸۷-/+) ۲۰/۴ و ۸۴/۷ برابر در روز چهاردهم بود (جدول ۲). در روز چهاردهم ۶۶ درصد نمونه‌ها در محیط SF و FCS و ۴۵ درصد نمونه‌ها در محیط CBP بیش از دو برابر تکثیر شده بودند. در روز چهاردهم میانه افزایش درصد سلول‌های $CD34^+$ در محیط FCS بیشتر از محیط SF و در محیط SF بیشتر از محیط CBP بود (شکل ۳).

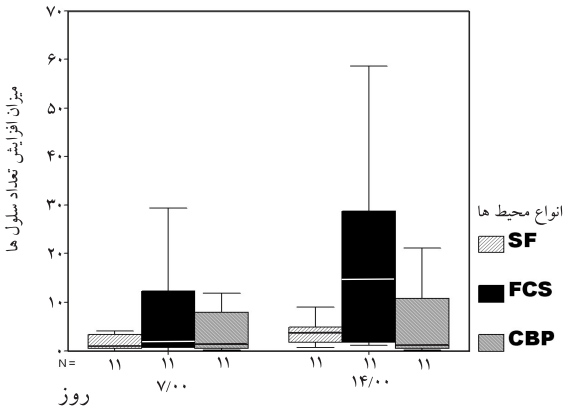
در ارزیابی افزایش درصد سلول‌های $CD34^+$ نسبت به روز اول، محیط FCS در روز هفتم (p= ۰/۰۲۸) و محیط‌های FCS (p=۰/۰۰۵) و SF (p=۰/۰۰۶) در روز چهاردهم نسبت به روز اول افزایش معنی‌داری نشان دادند. همچنین میزان افزایش درصد سلول‌های $CD34^+$ در روزهای هفتم و چهاردهم در محیط‌های مختلف (FCS/SF، SF/CBP و FCS/CBP) با یکدیگر مقایسه شد و اختلاف معنی‌داری به دست نیامد.



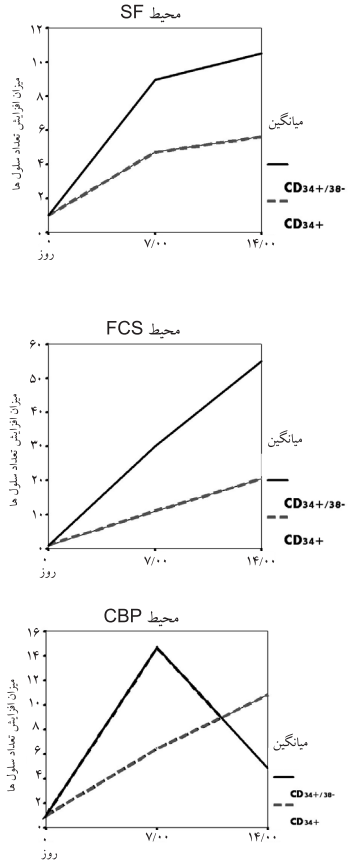
شکل ۲: مقایسه میزان افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در محیط‌های مختلف در روزهای هفتم و چهاردهم توسط نمودار جعبه‌ای (Boxplot).
SF: محیط فاقد سرم Stem Cpan TM (SF)، FCS: محیط حاوی سرم جنین گاوی (FCS) و CBP: محیط حاوی پلاسمای خون بند ناف (CBP). در روز هفتم محیط‌ها از نظر میزان افزایش سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. در روز چهاردهم محیط SF نسبت به محیط CBP (p=۰/۰۳۴) و محیط FCS نسبت به محیط CBP (p=۰/۰۰۳) میزان تکثیر بیشتری نشان دادند اما محیط‌های FCS و SF اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند.

نتایج بهترین زمان جهت تکثیر سلول‌های HSC

مطابق شکل ۴ و جداول ۱ و ۲، میانگین افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ و سلول‌های $CD34^+$ در محیط کشت SF و FCS در روز چهاردهم نسبت به روز هفتم بالاتر است. این اختلاف میانگین در محیط FCS زیاد است اما در محیط کشت SF چشم‌گیر نیست. در مورد محیط کشت CBP میانگین تعداد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ تا روز هفتم افزایش می‌یابد اما بعد از آن کاهش چشم‌گیری پیدا می‌کند در حالی که میانگین افزایش درصد سلول‌های $CD34^+$ با شیب کمتری نسبت به روز اول رو به افزایش است. بنابراین بهترین زمان برای کشت سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در محیط CBP یک هفته و برای محیط‌های FCS و SF به مدت دو هفته است.



شکل ۳: مقایسه میزان افزایش درصد سلول‌های $CD34^+$ در محیط‌های مختلف در روزهای هفتم و چهاردهم توسط نمودار جعبه ای (Boxplot).
SF: محیط فاقد سرم $Stem\ span^{TM}$ (SF)،FCS : محیط حاوی سرم جنین گاوی (FCS) و CBP: محیط حاوی پلاسمای خون بند ناف (CBP). محیط‌های مختلف از نظر میزان افزایش درصد سلول‌های $CD34^+$ در روزهای هفتم و چهاردهم اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.



شکل ۴: مقایسه میانگین افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ و $CD34^+$ در محیط‌های مختلف در روزهای هفتم و چهاردهم. نمودار پیوسته مربوط به سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ و نمودار نقطه‌چین مربوط به سلول‌های $CD34^+$ می‌باشد.SF: محیط فاقد سرم $Stem\ span^{TM}$ ،FCS : محیط حاوی سرم جنین گاوی و CBP: محیط حاوی پلاسمای خون بند ناف.

www.SID.ir

بحث

امروزه خون بند ناف به عنوان منبع مهمی از HSCs جهت پیوند به بیماران در بسیاری از بیماری‌های خونی و غیرخونی مورد توجه قرار گرفته است (۳، ۴). اما مشکل عمده در استفاده از CB تعداد کم سلول‌های هسته دار و سلول‌های $CD34^+$ لازم برای پیوند به فرد بالغ است (۱۰). بنابراین لازم است که این سلول‌ها در محیط ex vivo تکثیر شوند. برای این منظور در مطالعات مختلف از ترکیب سایتوکاین‌های متفاوتی استفاده شده است (۱۴-۹).

در مطالعه کامپانی و همکاران (۱۶) سلول‌های $CD34^+$ در محیط فاقد سرم همراه با سایتوکاین‌های IL-3، Flt3-L، IL-6 و SCF نسبت به محیط مشابه که در آن فقط فاکتور Flt3-L حذف شده بود افزایش درصد بالاتری را نشان داد (۳۰ برابر در مقابل ۱۱ برابر).

یاماو و همکاران نشان دادند که سایتوکاین‌های TPO، Flt3-L، IL-6 و SCF نسبت به سایر سایتوکاین‌ها اثرات قوی‌تری در القا تکثیر HSCs دارند (۱۱). گیلمور و همکاران نیز نشان دادند که در محیط کشت IMDM همراه با ۱۰ درصد FCS که حاوی ۴ فاکتور TPO، Flt3-L، IL-6 و SCF است، محتوای سلول‌های $CD34^+$ در مدت ۵ روز به میزان ۲ برابر افزایش می‌یابد در حالی که در محیط مشابه که تنها حاوی ۲ فاکتور Flt3-L و TPO است در این مدت افزایش کم و یا هیچ‌گونه افزایشی مشاهده نمی‌شود. بنابراین حضور IL-6 و SCF باعث تسریع تکثیر HSCs در محیط کشت می‌شود (۱۰). یکی از مشکلات استفاده از UCB تاخیر در پیوند پلاکت‌ها است که با تکثیر سلول‌های پیش ساز مگاکاریوسیتی قابل حل است.

شاو و همکاران برای این منظور از ترکیب سایتوکاینی TPO، Flt3-L، IL-3 و SCF در محیط SF استفاده کردند و سلول‌های پیش‌ساز مگاکاریوسیتی ($CD34^+/CD41^+$) را به میزان ۶ برابر در مدت ۱۱ روز تکثیر کردند (۹). لذا با توجه به نتایج ذکر شده در این تحقیق برای تکثیر سلول‌های $CD34^+$ و سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ از ترکیب سایتوکاینی IL-6، IL-3، TPO، SCF و Flt3-L استفاده شد و میزان تکثیر و بقای این سلول‌ها در محیط فاقد سرم (SF)، نسبت به محیط‌های حاوی سرم از جمله پلاسمای خون بند ناف (CBP) و سرم جنین گاوی (FCS) و همچنین توانایی CBP در جایگزینی با FCS مقایسه و ارزیابی گردید. سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در طی دو هفته کشت به طور میانگین در محیط FCS، ۵۷ برابر و در محیط SF به میزان ۱۰/۳ برابر تکثیر شدند و تکثیر موفق نمونه‌ها با کشت طولانی مدت (long term culture of initial cells: LTC-IC) تایید شد (نتایج نشان داده نشده است).

دیک و همکاران (۱۷) با ترکیب سایتوکاینی مشابه (SCF، IL-3، G-SF، f1t2/f1k2 ligand و IL6) سلول‌های HSC خون بند ناف را در محیط فاقد سرم به میزان ۲ تا ۴ برابر در مدت ۴ روز تکثیر کردند. در حضور سرم سلول‌های بالغ تغذیه کننده به کف پلیت می‌چسبند و در نتیجه از تکثیر سلول‌های پایه پشتیبانی می‌کنند بنابراین حضور سرم برای تسریع شروع تکثیر لازم است (۹). در این مطالعه نیز محیط SF در هفته اول نسبت به محیط‌های حاوی سرم از میانگین کمتری برخوردار بود که نشان دهنده تاخیر در شروع پروسه تکثیر است. گیلمور و همکاران با استفاده از محیط فاقد سرم QBSF که حاوی ترکیبات انسانی جایگزین سرم مانند سرم آلبومین، انسولین و ترانسفرین است، سلول‌های $CD34^+$ را به میزان بالاتری نسبت به محیط حاوی FCS تکثیر کردند (۱۰). بنابراین با استفاده از این نوع محیط‌ها علاوه بر سلامت بیشتر کشت از نظر عدم آلودگی به ترکیبات سرم حیوانی، می‌توان با کوتاه کردن این روند هزینه را نیز کاهش داد.

در مطالعه کامپانی و همکاران (۱۶) هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری میان محیط SF و محیط حاوی FCS از نظر میانگین افزایش درصد سلول‌های MNC و $CD34^+$ مشاهده نشد و نیز ضریب تغییر (variation coefficient) در محیط FCS نسبت به محیط SF در بین نمونه‌ها بالاتر بود (۹۶ در برابر ۵۱ درصد برای سلول‌های $CD34^+$). در مطالعه ما نیز نتایج کشت نمونه‌ها در محیط SF با FCS تفاوت معنی‌داری نداشت و در محیط FCS نتایج از پراکندگی بالاتری برخوردار بود (شکل ۲) که نشان دهنده این است که قابلیت پیش‌بینی و تکرار نتایج در محیط FCS نسبت به SF کمتر است. بنابراین برای مصارف کلینیکی محیط SF مطمئن‌تر است. در بررسی توانایی CBP در جایگزینی با FCS، میانگین افزایش درصد سلول‌های $CD34^+$ و سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در روزهای هفتم و چهاردهم در محیط FCS بالاتر بود.

در مطالعه ایکس‌یو و همکاران نیز در حضور سایتوکاین‌های IL-6، MGDF، SCF و Flt3-L بازده سلول‌های $CD34^+$ در محیط حاوی FCS بالاتر از محیط حاوی CBP بود (۱۸).

در این مطالعه، مورفولوژی سلول‌ها در محیط‌های مختلف نیز بررسی شد. در بیشتر نمونه‌ها جمعیت سلولی در محیط CBP کمتر از محیط‌های FCS و SF بود و جمعیت سلولی طی هفته دوم کاهش چشم‌گیری داشت (شکل ۴). بنابراین از محیط CBP تنها به مدت یک هفته می‌توان استفاده کرد. در نتیجه‌گیری کلی، جهت تکثیر سلول‌های پیش‌ساز اولیه و سلول‌های بالغ‌تر در طی دو هفته کشت، محیط FCS بهترین محیط است. اما از آنجایی که FCS می‌تواند منبع آلودگی‌های مختلف باشد و یا باعث آلرژی گردد، بهتر است از محیط‌های فاقد سرم برای تکثیر سلول‌های HSC جهت پیوند به بیماران استفاده شود (۱۰). در کلینیک افزایش ۲ تا ۴ برابر سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ در یک نمونه برای پیوند به بیماران کافی است که این مقدار به راحتی از محیط CBP و SF به دست می‌آید. بنابراین بهتر است از این دو محیط به جای محیط FCS استفاده شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه محیط SF به مدت بیشتری از کشت پشتیبانی می‌کند، مورفولوژی و میانگین افزایش درصد سلول‌ها در آن بالاتر از CBP است و تعداد نمونه‌هایی که در آنها درصد سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ تا بیش از دو برابر افزایش یافته است در محیط SF

Archive of SID
www.SID.ir

بیشتر از CBP است، بهتر است از محیط کشت SF به جای CBP استفاده شود. چرا که این محیط از نظر افزایش درصد سلول‌های $CD34^+/CD34^-$ تا بیش از ۵ برابر، کیفیت و سلامت کشت از لحاظ عدم آلودگی، کاهش هزینه کشت، پشتیبانی بیشتر از تکثیر سلول‌ها در مدت دو هفته کشت (نسبت به CBP) و تکرارپذیر بودن نتایج در طی تحقیق، جهت مصارف کلینیکی مناسب‌تر از دو محیط حاوی FCS و CBP است.

تقدیر و تشکر

این طرح با حمایت شبکه پزشکی مولکولی و مرکز تحقیقات هماتولوژی-انکولوژی و پیوند مغزاستخوان بیمارستان شریعتی انجام شده است. بدین وسیله از ریاست محترم شبکه پزشکی مولکولی جناب آقای دکتر سیروس زینلی و همکاران محترم در مرکز تحقیقات هماتولوژی-انکولوژی آقای دکتر احمد رضا شمشیری و خانم آسیه عشوری که از مشاوره آماری ایشان در این مقاله استفاده شد و آقایان دکتر پویا علیجانی پور، دکتر سینا وطن دوست و خانمها، دکتر فروغ فروغی، دکتر زهرا گلیایی و دکتر فریما فروزیا که در طراحی و تصویب این طرح مشارکت داشتند کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

Refrences

1. Moore KA, Ema H, Lemischka IR: In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. Blood 1997; 89: 4337–4347
2. McAdams TA, Miller WM, Papoutsakis ET: Hematopoietic cell culture therapies (part I), cell culture considerations. Trends Biotechnol 1996; 14:341–349
3. Watt SM and Contreras M: Umbilical cord blood and its stem cell potential. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine 2005; 10: 209-220
4. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham M et al: Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. N Engl J Med 1996; 335:157–166
5. Clift RA, Thomas ED: Seattle marrow transplant team. Follow-up 26 years after treatment for acute myelogenous leukemia. N Engl J Med 2004; 351: 2456-7
6. Gratwohl A: Overview of transplant activity in Europe. Hematol J 2004; 5: 529-33
7. Chao NJ, Emerson SG, Weinberg KI: Stem cell transplantation (cord blood transplants). Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2004; 354-71
8. Gammaitoni L, Bruno S, Sanavio F, Gunetti M, Kollet O: Ex vivo expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hematopoietic reconstitution. Experimental Hematology 2003; 31(3): 261-270
9. Shaw PH, Gilligan D, Wang XM, Thall PF and Corey S: Ex vivo expansion of megakaryocyte precursors from umbilical cord blood $CD34^+$ cells in a closed liquid culture system. American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2003; 9: 151-156
10. 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; 28:1297–1305
11. Yao CL, Liu CH, Chu I, Hsieh TB and Hwang SM: Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells. Enzyme and Microbial Technology 2003; 33: 343–352
12. Yao CL, Chub IM, Hsieh TB and Hwang SM: A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. Experimental Hematology 2004; 32, 720–727
13. Shih CC, Hu M, Hu J, Weng Y, Yazaki PJ, Medeiros J: A secreted and LIF-mediated stromal cell-derived activity that promotes ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. Blood 2000; 95:1957–66
14. Yamaguchi M, Hirayama F, Murahashi H, Azuma H, Sato N, et al: Ex vivo expansion of human UC blood primitive hematopoietic progenitors and transplantable stem cells using human primary BM stromal cells and human AB serum. Cytotherapy 2002; 4(2):109-18
15. Yamaguchi M, Hirayama F, Kanai M, Sato N, Fukazawa K et al: Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. Exp Hematol 2001 Feb; 29(2):174-82
16. Campany G, Querol S, Cancelas JA and Gardia J: Short- term, serum-free, static culture of cord blood-derived $CD34^+$ cells: effects of FLT3-L and MIP-1a on in vitro expansion of hematopoietic progenitor cells. Haematologica 1999; 84: 675-682
17. Bhtia M, Bonnet D, Kapp U, Wang JCY, Murdoch B and Dick JE: Quantitative analysis revels expansion of human hematopoetic repopulating cells after short- term ex vivo culture. J Exp Med. 1997; 186: 619
18. Xu R, Medchill M and Reems JA: Serum supplement, inoculums cell density, and accessory cell effects are dependent on the cytokine combination selected to expand human HPCs ex vivo. Transfusion. 2000; 40(11):1299-307

Archive of SID

www.SID.ir