دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وچهارم–شماره ۱۲۷
اسفند ۱۳۹۵

بررسی اثر عصارهٔ پلاکتی مشتق از خون بندناف بر تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف در آزمایشگاه

نویسندگان: منیره محمد[۱،۲]، مرضیه ابراهیمی[۳]، فاطمه دانشمند[٤]، معصومه نوری[٥]، پردیس خسروانی[٦]

۱. دانشجوی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه دانشگاه پیام نور مرکزتفت، دانشگاه جامع استان یزد، یزد

۲. کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست پزشکی ترمیمی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی تهران، تهران

۳. دانشیارپژوهشگاه رویان، PhD ایمنولوژی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست پزشکی ترمیمی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی تهران، تهران

٤. استادیارگروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

٥. دکتری ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست پزشکی ترمیمی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی تهران، تهران

٦. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی تکوین، مرکزتحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی تهران، تهران

* نویسنده مسئول: مرضیه ابراهیمی **E-mail: mebrahimi@royaninstitute.org**

دریافت: ۵۴/۱۰/۱۹
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۱۱/۲۴
پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۰۱

چکیده

مقدمه و هدف: علی‌رغم نتایج رضایت‌بخش پیوند خون بندناف در درمان بعضی بیماری‌های خونی، یکی از چالش‌ها در این زمینه، حل مشکل تعداد کم این سلول‌ها می‌باشد. سال‌های اخیر عصارهٔ پلاکتی به‌لحاظ غنی‌بودن از فاکتورهای رشد به‌عنوان مکمل کشت سلول مزانشیم در سلول درمانی معرفی شده است. هدف این مطالعه، بررسی اثر عصارهٔ پلاکتی مشتق از خون بندناف بر تکثیر، تمایز و درصد زنده‌مانی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها: کنسانترهٔ پلاکتی در غلظت ۲×۱۰۹plt/ml از پلاسمای خون بندناف تهیه شد. تعداد ۱۰۶ سلول تک‌هسته‌ای خون بندناف در حضور سایتوکاین‌های Flt3L، SCF و TPO حاوی غلظت‌های متفاوت (۱۰٪-۰) از عصارهٔ پلاکتی مشتق از خون بندناف کشت شدند. درصد زنده‌مانی این سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو، سنجش تمایز سلول‌های تک‌هسته‌ای آزمایش Colony Assay، اندازه‌گیری درصد سلول‌های بنیادی خون‌ساز با شاخص سطحی (CD133+ CD34+ CD38-) از طریق فلوسایتومتری و بیان کمی ژن CD34 با روشQRT- PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: غلظت ۵٪ عصارهٔ پلاکتی مشتق از خون بندناف همراه با سایتوکاین‌ها سبب تکثیر ۱۲برابری (P<0.0001)سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف، ۱/۶ برابر کلونی BFU-E، ۲/۱ CFU-GM، ۱/۷ CFU-MIX و ۳/۳ برابر سلول‌های CD133+ CD34+ CD38- می‌شود. ژن CD34 نیز در گروه ۵٪ UCB- LP افزایش معنی‌دار نشان داد.

نتیجه‌گیری: عصارهٔ پلاکتی خون بندناف را می‌توان به‌عنوان مکمل در کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف و سلول‌های بنیادی خون‌ساز به‌منظور افزایش تکثیر و حفظ خاصیت بنیادی آن‌ها استفاده کرد.

واژگان کلیدی: سلول‌های خون بندناف، تکثیر و تمایز، عصارهٔ پلاکتی مشتق از خون بندناف، کلونی‌زایی

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

مطالعه و بررسی سلول‌های بنیادی خون‌ساز[1] در خط مقدم تحقیقات سلول‌های بنیادی با کاربردهای پزشکی قرار دارد. امروزه از این سلول‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌های خوش‌خیم و بدخیم سیستم خونی و ایمنی استفاده می‌شود. سه منبع پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز، مغز استخوان، خون محیطی و خون بندناف می‌باشند (۱). خون بندناف در مقایسه با مغز استخوان بالغ، نسبت بیشتری از سلول‌های پیش‌ساز خون‌ساز ابتدایی را دارد. این سلول‌ها پاسخ‌های تکثیری بالاتری در محیط آزمایشگاه و ظرفیت پیوندی بیشتری در بدن نشان می‌دهند (۲). همچنین دسترسی سریع و آسان از طریق بانک‌های متعدد خون بندناف، انطباق بالاتر در سازگاری HLA، شیوع کمتر واکنش شدید پیوند علیه میزبان Graft Versus Host Disease (GVHD)، کاهش خطر انتقال عفونت‌های ویروسی و در نهایت، عدم وجود خطر برای فرد اهداکننده از جمله مزیت‌های دیگر پیوند خون بندناف می‌باشند (۳). بااین‌وجود، تعداد کم سلول‌های خون‌ساز خون بندناف پیوند این سلول‌ها را به کودکان بیمار با وزن پایین محدود می‌کند (٤).

ازدیاد سلول‌های بنیادی خون بندناف می‌تواند بر مشکل تعداد اندک این سلول‌ها در بحث پیوند فائق آید؛ ولی القای تقسیم self-renewal و در مقیاس کافی نیز مهم‌ترین مشکل تکثیر این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. ازدیاد حقیقی HSCs زمانی رخ می‌دهد که هم‌زمان با تحریک تکثیر این سلول‌ها توسط فاکتورهای مختلف رشد خونساز، مسیرهای تمایزی، مرگ و پیری سلول‌های در حال تکثیر، توسط سایر عوامل داخلی یا خارجی سلول مهار شوند (۵). گرچه تاکنون تلاش‌های زیادی برای تکثیر بدون تمایز این سلول‌ها صورت گرفته، تنها تعدادی از آن‌ها موفق و مقرون‌به‌صرفه هستند که رایج‌ترین آن‌ها، کشت در حضور سیتوکین‌های محرک و فاکتورهای رشد خونساز (٦)، هم‌کشتی با سلول‌های استرومایی (۷) و کشت در بیوراکتور می‌باشد (۸).

استفادهٔ پلاکت‌ها برای بیمارانی که کمبود پلاکت دارند یا عملکرد پلاکت‌های آن‌ها دچار مشکل است، از دیرباز مورد توجه بوده است. امروزه علاوه‌بر پلاکت، از محصولات پلاکتی نیز برای درمان بیماری‌هایی همچون درمان زخم‌های پوستی، جراحی دهان، فک و صورت، ارتوپدی، جراحی ستون فقرات، جراحی سر و گردن، جراحی قلب و رفع چین‌وچروک و همچنین در سلول‌درمانی استفاده می‌شود (۹). مطالعاتی نیز عصارهٔ پلاکتی را به‌عنوان جایگزین سرم گاوی در کشت و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست، اندوتلیال، کراتینوسایت و سلول بنیادی مزانشیمی مطرح می‌کنند (۱۰).

با توجه به اینکه عصارهٔ پلاکتی حاوی همچون فاکتورهای رشدی b-FGF, VEGF, IL-1β, PDGF, TGFβ می‌باشد (۱۱)، به نظر می‌رسد بتوان آن را در محیط کشت سلول به‌عنوان مکمل کشت برای رسیدن به نتیجهٔ تکثیری مناسب استفاده نمود. هدف این مطالعه بررسی اثر عصارهٔ پلاکتی مشتق از خون بندناف بر تکثیر و تمایز سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف در آزمایشگاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱. تهیهٔ عصارهٔ پلاکتی مشتق از خون بندناف (UCB-PL)

خون بندناف از بانک عمومی خون بندناف رویان تهیه گردید. تمام دهندگان خون رضایتنامهٔ مربوط‌به اهدای خون برای انجام تحقیقات را امضا نموده بودند. تمام واحدهای خونی مورداستفاده فاقد عفونت‌های ویروسی و میکروبی بودند. برای تهیهٔ عصارهٔ پلاکتی، پلاسمای چهار واحد خون بندناف به داخل کیسه‌های فاقد مادهٔ ضدانعقاد با حجم ml ۵۰۰ منتقل و با دور g× ۳۰۰، به مدت ۲۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع زردرنگ بالایی که پلاسمای غنی از پلاکت می‌باشد، با استفاده از

[1] . Hematopoietic Stem Cells: HSCS

Archive of SID

www.SID.ir

plasma extractor به کیسهٔ انتقالی و در دور g×۳۰۰۰، دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا رسوب پلاکتی تهیه شود. سوسپانسیون پلاکتی به غلظت ۲×۱۰۹plt/ml تهیه شد و به مدت ٢٤ الی ٤٨ ساعت در داخل فریزر ۷۰°C- ذخیره شدند. عصارهٔ سلولی به‌صورت مکانیکی و ازطریق انجماد و ذوب سوسپانسیون پلاکتی تهیه شد. این فرایند منجربه پاره‌شدن گرانول‌های پلاکتی و آزادشدن فاکتورهای رشد آن‌ها می‌شود. برای حذف بقایای پلاکت‌ها، محلول حاصل در دور g۳۰۰۰ به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ و محلول رویی جمع‌آوری و عصارهٔ پلاکتی (UCB-PL) Umbilical Cord Blood Platelet lysate نامیده شد. عصارهٔ پلاکتی حاصل با فیلتر ۰/۲ فیلتر و در حجم‌های ۲تا۱۰ میلی‌لیتر تقسیم‌بندی و در فریزر ۲۰°C- تا زمان استفاده ذخیره شد.

۲. جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف

واحدهای خون بندناف اهدایی که به‌علت تعداد ناکافی سلول‌ها واجد شرایط نگهداری نبودند، از بانک خون عمومی بندناف پژوهشگاه رویان دریافت شدند. همهٔ نمونه‌ها رضایت‌نامهٔ اهدا را داشتند و از نظر آزمایش‌های ویروسی منفی بودند. به‌منظور رسوب گلبول‌های قرمز، هیدروکسی اتیل استارچ (۱۰٪ Flex 14FH7320Free) به نسبت ۱به ۵ (V/V) به خون تام اضافه و پس از مخلوط‌کردن به مدت ٤٠تا٦٠ دقیقه بدون حرکت و در دمای ثابت ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس مایع رویی حاوی سلول‌های سفید به لولهٔ جداگانه‌ای منتقل و سپس تعداد سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش و درصد زنده‌مانی آن‌ها توسط تریپان‌بلو محاسبه گردید.

۳. کشت سلول

x١٠٦ ١ از سلول‌های UCB-MNC جداشده در محیط کشت Stem Line (SIGMA) حاوی اسید آمینه آل‌گلوتامین (۰/۵ میلی‌مولار) به‌همراه فاکتورهای رشد SCF و (۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر)، Flt3L (۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) و TPO (۱۰نانوگرم در میلی‌لیتر) (کلیهٔ فاکتورهای رشد از شرکت SIGMA تهیه گردید) کشت شدند. گروه‌های مورد بررسی در این مطالعه عبارت از چهار گروه بودند.

الف) کنترل منفی: سلول‌ها در حضور محیط کشت پایه بدون سایتوکاین‌ها کشت شد.

ب) کنترل مثبت: سلول‌ها در محیط کشت پایه همراه با سایتوکاین‌های SCF, FLt3L, TPO با غلظت‌های ذکرشده کشت شدند.

ج) گروه تست UCB-PL + Cytokines که با توجه به غلظت‌های مختلف UCB-PL به چهار زیرگروه تقسیم می‌شود: سلول‌ها در محیط کشت پایه همراه با سایتوکاین‌های SCF, FLt3L, TPO و غلظت‌های ۱٪، ۲/۵٪، ۵٪ و ۱۰٪ از UCB-PL کشت شدند.

د) گروه تست UCB-PL که با توجه به غلظت‌های مختلف UCB-PL به چهار زیرگروه تقسیم می‌شود: سلول‌ها در محیط کشت پایه و در حضور غلظت‌های ۱٪، ۲/۵٪، ۵٪ و ۱۰٪ از UCB-PL کشت شدند. (در این گروه هیچ سایتوکاینی به محیط اضافه نشد.)

در همهٔ گروه‌ها، سلول‌ها در دمای ۳۷°C، CO2 ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ انکوبه شدند. هر چهار روز یک بار تعویض محیط کشت سلول‌ها انجام شد. در روزهای ٤، ۸، ۱۵ و ۲۳ بعد از کشت، متغیرهای مورد مطالعه شامل شمارش سلول‌های تک‌هسته‌ای، تعیین درصد زنده‌مانی سلول‌ها، تست سنجش کلونی، بررسی بیان ژن CD34 به روش QRT-PCR و سنجش شاخص‌های سطحی-CD133+CD34+CD38 با روش فلوسایتومتری انجام شد.

٤. سنجش کلونی

١٠٤×١ سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف از هر چهار گروه مورد مطالعه در روزهای ٤، ۸، ۱۵ و ۲۳ بعد از کشت برداشته شد و با ۲ میلی‌لیتر محیط متیل سلولز (استم سل تکنولوژی، Methocult™ GF+ H4435) حاوی سایتوکاین‌های CSF١٠ng/mL، CSF-GM10 ng/mL، IL٣- ١٠ng/mL، SCF 3µ/ml و EPO 10ng/mL مخلوط و در چاهک‌های شش‌خانه‌ای به مدت ١٤ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار ۵درصد CO2 انکوبه شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

تعداد کلونی‌های اریتروئیدی (Burst Forming Unit-Erythroid: BFU-E)، گرانولوسیت‌ـماکروفاژ (Colony-Forming unit Granulocyte-Macrophage: CFU-GM)، گرانولوسیت‌ـاریتروئیدـماکروفاژـ مگاکاریوسیت (Colony Forming Unit – Granulocyte / Erythroid /Macrophage /Megakaryocyte: CFU-Mix) پس از ١٤ روز کشت با میکروسکوپ نوری شمارش گردیدند.

۵. بررسی بیان ژن +CD ٣٤ به روش QRT-PCR

ابتدا RNA ژنومی استخراج و با استفاده از کیت (Japan ,Takara)، cDNA ساخته شد. مخلوط واکنش شامل µL ٣ از cDNA ساخته شده، µL ٢ پرایمرهای اختصاصی، µL ١٠از SYBR Green PCR Master Mix (USAABI) و µL ۵ ddHO در لوله‌های ویژه تهیه گردید. واکنش تکثیری بر طبق الگوی دمایی خاص، ١٠ دقیقه در دمای ٩۵ درجهٔ سانتیگراد، ١٢ دقیقه در دمای ٦٠ درجهٔ سانتیگراد، ١۵ ثانیه در دمای ٩۵ درجهٔ سانتیگراد، ١ دقیقه در دمای ٦٠ درجهٔ سانتیگراد و ١۵ ثانیه در دمای ٩۵ درجهٔ سانتیگراد و ٤٠ مرتبه تکرار مراحل از مرحلهٔ ٢ در داخل دستگاه AB Step-one plusاجرا گردید. برای آنالیزها از نرم‌افزار STEP One نسخهٔ شمارهٔ ٢ استفاده گردید. پروفایل بیان ژنی به‌طور نسبی و با روش ΔΔCt-٢محاسبه گردید. ژن GAPDH به‌عنوان ژن Housekeeping انتخاب گردید. توالی پرایمرها برای ژن +rRCD34،

F: 5'TGGACCGCGCTTTGCT3´ و

5'CCCTGGGTAGGTAACTCTGGG3´:R

و برای ژن GAPDH،

F:5'GAAATCCCATCACCATCTTCC3´ R: 5'GGCTGTTGTCATACTTCTCAT3´ بود

۶. بررسی ایمنوفنوتیپ سلول‌های کشت‌شده توسط فلوسیتومتری

به‌منظور آنالیز شاخص‌های سطحی CD133+CD34+CD38- از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال CD133-PE(miltenybiotec)، CD38-PE-CY5(Ebioscince) و CD 34-FITC(BD) به‌طور همزمان با هم، استفاده شد. ابتدا سوسپانسیونی از سلول‌ها به تعداد یک میلیون در ١٠٠ میکرولیتر PBS تهیه شد. آنتی‌بادی‌های فوق هرکدام به غلظت ١/١٠٠ استفاده شد. آنتی‌بادی‌های mouse IgG1 کنژوگه به فلوروکروم‌های PE,FITC,PE-Cy5 به‌عنوان ایزوتایپ کنترل انتخاب شدند. ١٠٠٠٠ سلول توسط دستگاه فلوسایتومتری FACSCalibur از شرکت BD با لیزر ٤٨٨ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های رنگ PE روی فیلتر 585/42، رنگ سبز روی فیلتر 533/15 و رنگ PE-Cy5 روی فیلتر 647 نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنالیز نمونه‌ها با نرم‌افزار cell Quest انجام شد.

۷. بررسی آماری

بررسی آماری با استفاده از نرم‌افزار ١٦ SPSS، Excell و تست پارامتریک ANOVA انجام شده است. برای تعیین معنی‌داری بین گروه‌های تیمارشده با عصارهٔ پلاکتی مشتق از خون بندناف و گروه‌های کنترل در سلول‌های تک‌هسته‌ای اختلاف P≤٠/٠۵، به‌عنوان اختلاف معنی‌دار محاسبه شد. تعداد تکرارها و نمایش به‌صورت Mean±SD محاسبه شده است.

نتایج

میانگین حجم تعداد ۵ نمونه از واحدهای خون بندناف که به‌طور تصادفی انتخاب شده بودند، ٩/١٤ ±٦١/٧٦ میلی‌لیتر و میانگین تعداد سلول تک‌هسته‌ای اولیه در هر میلی‌لیتر خون قبل از جداسازی گلبول قرمز ١/١۵ ± ۵/٧×١٠٦ با زنده‌مانی ١±١٠٠٪ و بعد از جداسازی به ٠/٩١ ± ١٠٦× ٤/٩ با زنده‌مانی ١± ٩٩٪ بود.

١. بررسی اثر UCB-PL در تکثیر سلول‌های UCB-MNC

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف UCB-PL بر میزان تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف تعداد ١٠٦ در میلی‌لیتر سلول در هر چاهک پلیت ١٢خانه‌ای طبق روش ذکر شده، کشت شد.

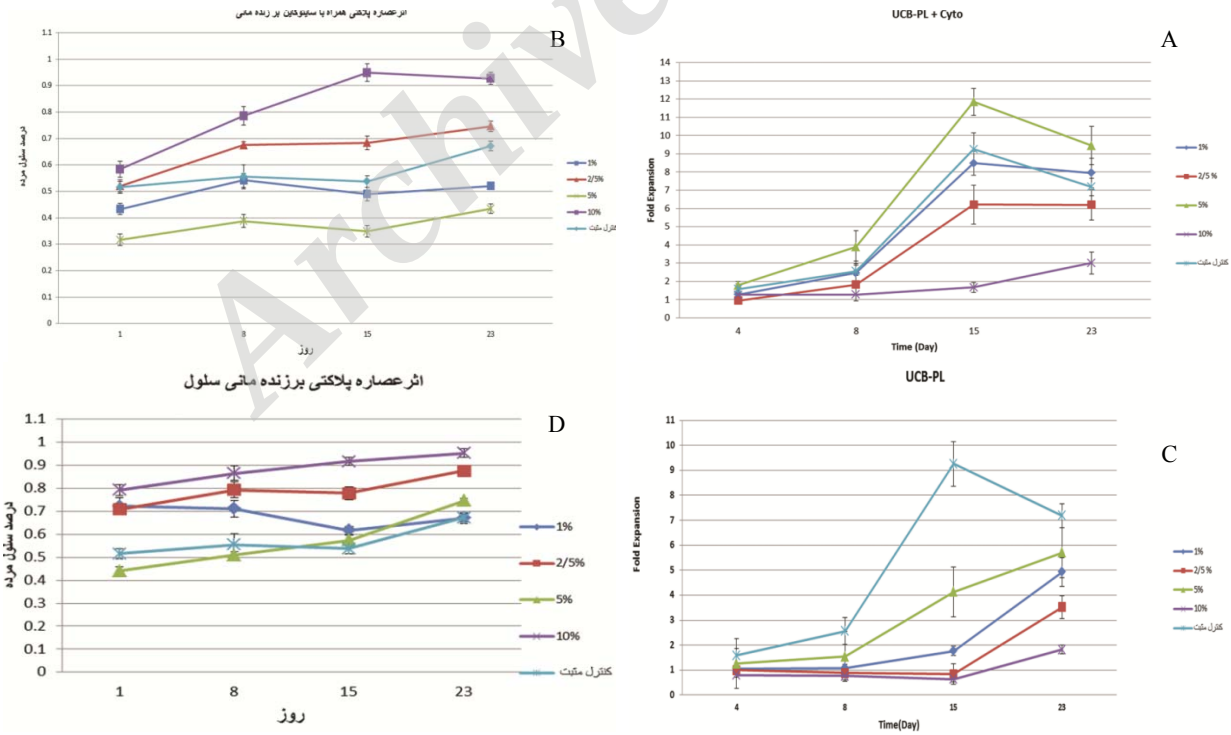
همان‌طور که در شکلA-١ نشان داده شده است، گروه UCB-PL همراه با سایتوکاین‌ها ماکزیمم تکثیر

Archive of SID

www.SID.ir

سلول‌ها در همهٔ گروه‌ها به‌جز گروه ۱۰٪ UCB-PL در روز پانزدهم مشاهده شد و پس از آن تا روز بیست‌وسوم تعداد سلولی کاهش یافت. تعداد سلول‌ها در گروه ۵٪ UCB–PL حاوی سایتوکاین‌ها نسبت‌به سایر گروه‌ها و حتی نسبت به گروه کنترل مثبت به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P۰/۰۰۰۱). ولی اختلاف معنی‌داری در تکثیر سلول‌ها، بین غلظت ٪1 از UCB–PL همراه با سایتوکاین‌ها و گروه کنترل مثبت وجود نداشت (P<0/05).کمترین تعداد سلول در گروه ۱۰٪ UCB–PL مشاهده شد که می‌تواند به‌دلیل افزایش اثرات سمی این ماده در غلظت‌های بالاتر باشد (شکلB–۱). گروه کنترل منفی حاوی بیشترین درصد از سلول‌های مرده (۱/۴۹ ±۶۲/۲۶) و گروه ۵٪ UCB-PL همراه با سایتوکاین‌ها کمترین درصد از سلول‌های مرده (۱/۱۵ ± ۲۱/۹۶) را دارا بودند (شکلB–۱، P<۰/۰۰۰۱).

برای پاسخ به این سؤال که آیا UCB-PL به‌تنهایی کفایت لازم برای تکثیر UCB-MNC را دارد، سایتوکاین‌ها از محیط کشت حذف شدند و کشت UCB-MNC در غلظت‌های متفاوت UCB-PL انجام گرفت. همان‌طور که نتایج در شکل C–1 نشان داده شده است، برخلاف گروه‌های حاوی سایتوکاین که ماکزیمم رشد در روز پانزدهم مشاهده شد، در این گروه ماکزیمم رشد در روز بیست‌وسوم کشت مشاهده شد. همچنین تعداد سلول‌ها در همهٔ گروه‌ها نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش نشان داد (P<۰/۰۰۰۱). به این ترتیب به نظر می‌رسد که UCB-PL به تنهایی قادر به راه‌اندازی تکثیر سلول‌ها نمی‌باشد. از میان گروه‌ها، گروه دریافت‌کننده UCB-PL ۱٪ و ۵٪ از تعداد سلول‌های بیشتری برخوردار بودند (P<۰/۰۰۱). نتایج بررسی زنده‌مانی سلول‌ها در این گروه نیز حاکی از اثرات سمی UCB-PL در غلظت‌های بالاتر از ۵٪ UCB – PL بود (شکلD-1). با توجه به نتایج فوق گروه ۱٪ و ۵٪ UCB– PL همراه با سایتوکاین‌ها برای ادامهٔ مطالعه انتخاب شدند.



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف UCB-PL در حضور سایتوکاین‌ها، (A) در تکثیر و (B) درصد زنده‌مانی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف.

اثر غلظت‌های مختلف UCB-PL به‌تنهایی،(C) در تکثیر و (D) درصد زنده‌مانی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بند ناف. نتایج حاصل ۳ تکرار زیستی مختلف و به‌صورت Mean± SD نشان داده شده است (P<۰/۰۰۰۱=***)

Archive of SID

www.SID.ir

۲. بررسی تمایز در سلول‌های کشت‌شده با UCB-PL

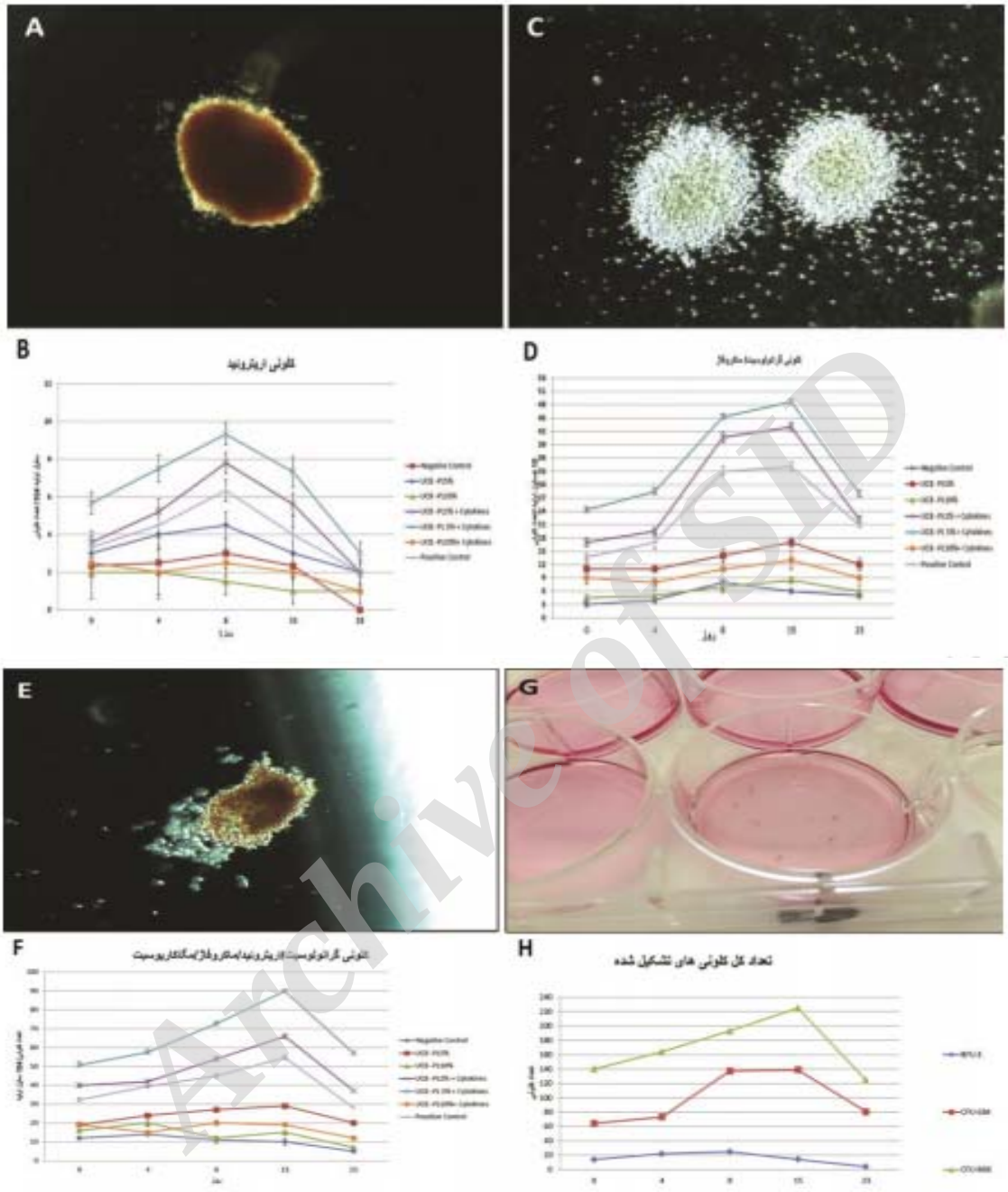
آزمون سنجش کلونی به‌منظور بررسی پتانسیل تمایزی سلول‌های کشت‌شده با استفاده از محیط کشت MethoCult. به‌صورت تکرارهای ۳ تایی انجام شد. در شکل2:A- نمای میکروسکوپی کلونی‌های BFU-E، C- کلونی‌های CFU-GM و E– کلونی‌های CFU-Mix نشان داده شده است. پتانسیل تمایز سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف به پیش‌سازهای مختلف خون‌ساز در فواصل زمانی صفر، ٤، ٨، ١٥ و ٢٣ روز پس از کشت در شکل ۲ نشان می‌دهد که (B) تعداد کلونی BFU-E در گروه ٪۵ UCB-PL به‌همراه سایتوکاین‌ها افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت و سایر گروه‌ها داشت (P<۰/۰۰۱). در تمام گروه‌ها ماکزیمم تعداد کلونی BFU-E در روز هشتم مشاهده شد و کاهش تعداد کلونی با افزایش زمان کشت مشاهده گردید و شکل F و D ماکزیمم کلونی‌های CFU-GM، CFU-Mix در روز پانزدهم کشت مشاهده شد در گروه‌های کنترل مثبت، ٪۱ و ٪۵ UCB-PL همراه با سایتوکاین‌ها افزایش معنی‌داری در تعداد کلونی‌های CFU-Mix وCFU-GM نسبت‌به سایر گروه‌ها مشاهده شد که از بین آن‌ها گروه ٪۵ UCB-PL به‌همراه سایتوکاین اثر غالب‌تر بر القای کلونی CFU-GM و CFU-Mix و افزایش معنی‌دار در تعداد این نوع کلونی‌ها نسبت‌به گروه کنترل مثبت و سایر گروه‌ها نشان داد (P<۰/۰۰۱ =***).

۳. بررسی سلول‌های بنیادی خون‌ساز در محیط کشت حاوی UCB-PL

ازآنجاکه نتایج آزمایش تکثیر سلولی نشان داد دُز ٪۵ و ٪۱UCB-PL به‌همراه سایتوکاین‌ها در تکثیر و تمایز UCB-MNC مؤثر است، درصد سلول‌های CD 133+ CD34+ CD38- توسط فلوسایتومتری و بیان ژن CD34 بااستفاده‌از QRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد درصد سلول‌های CD 133+ CD34+ CD38- در روز بیست‌وسوم در گروه کنترل مثبت ٪۸ ، در گروه ٪۱ UCB-PL حدود ٪۵ و در گروه ٪۵ UCB-PL حدود ٪۲۵ بود (شکل3- A، P<۰/۰۰۰۱). همچنین بیان ژن CD34 در گروه ٪۵ UCB-PL در روز پانزدهم نسبت‌به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری داشت؛ به‌طوری‌که نسبت‌به گروه کنترل مثبت ۳برابر و نسبت‌به گروه ٪۱ UCB-PL ۲/۳ برابر افزایش بیان را نشان داد (شکل 3-B، P<۰/۰۵=*).

Archive of SID

www.SID.ir



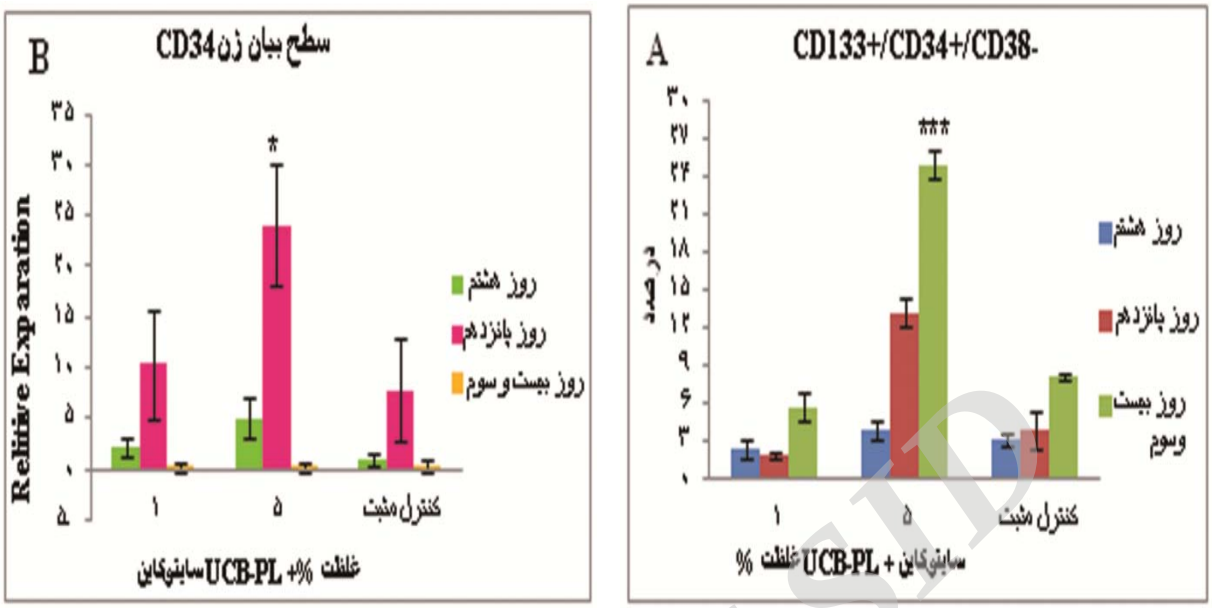
شکل ۲. بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت UCB-PL بر تشکیل کلونی‌های ردهٔ اریتروئیدی، (A,B) ردهٔ گرانولوسیت- ماکروفاژ، (C,D)

ردهٔگرانولوسیت-اریتروئید-ماکروفاژ- مگاکاریوسیت، (H) تعداد کل کلونی‌های تشکیل‌شده روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف در فواصل زمانی ۰، ٤، ۸، ۱۵ و ۲۳ روز پس از کشت، نتایج حاصل ۳ تکرار زیستی مختلف و به‌صورت Mean± SD نشان داده شده است (P<۰/۰۰۱ =***).

تصویر میکروسکوپی (A) کلونی ردهٔ اریتروئیدی، (C) کلونی ردهٔ گرانولوسیت- ماکروفاژ، (E) کلونی ردهٔ گرانولوسیت- اریتروئید- ماکروفاژ- مگاکاریوسیت (G) نمای کلی از تشکیل کلونی‌ها در پلیت ٦ خانه.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۳. بررسی سلول‌های بنیادی خون‌ساز در سلول‌های تیمارشده با غلظت ۱٪ و ۵٪ UCB-PL

(***=P<۰/۰۰۰۱) (**=P<۰/۰۵)(A) درصد سلول‌های CD 133+ CD34+ CD38-، (B) بیان ژن CD۳٤

بحث

گرانول‌های پلاکت‌ها حاوی انواع فاکتورهای رشد شامل فاکتور رشد تراریختی TGF-β، فاکتور رشد شبه‌انسولینی IGF، فاکتور رشد اپیدرمی EGF، فاکتور رشد رگ‌زایی VEGF، فاکتور رشد مشتق از پلاکت PDGF، فاکتور رشد فیبروبلاستی FGF، اینترلوکین ۸ (IL-8) اینترلوکین ۱ بتا (IL-1β)، فاکتور محرک کلونی‌زایی گرانولوسیت- ماکروفاژ (CSF-GM) می‌باشد که این فاکتورها مسیرهای سیگنالینگ متنوعی را درون سلول راه‌اندازی می‌کنند که باعث پاسخ‌های متفاوت سلول نظیر تکثیر، مهاجرت، تمایز سلول می‌شوند (۱۲). خون بندناف یکی از منابع با دسترسی آسان برای استخراج پلاکت‌ها می‌باشد.

پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز ازجمله روش‌های درمانی مؤثر برای درمان بدخیمی‌ها و ناهنجاری‌های خونی می‌باشد (۱۳). این سلول‌ها از منابع گوناگون چون مغز استخوان، خون محیطی و خون بندناف قابل استخراج هستند. امکان دسترسی بالا به سلول‌های بنیادی خون‌ساز خون بندناف و همچنین ظرفیت بیولوژی بسیار بالای این سلول‌ها، این سلول‌ها را به اهداف بسیار مهمی برای سلول‌درمانی و پیوند مغز استخوان مبدل می‌کند. اما تعداد کم سلول‌ها در هر واحد خون بندناف، استفاده از آن‌ها را در موارد پیوند مغز استخوان بزرگسالان محدود می‌کند (۱٤). به‌این‌ترتیب تکثیر این سلول‌ها و پیش‌سازهای خونی در محیط آزمایشگاهی امری ضروری به نظر می‌رسد.

Archive of SID
www.SID.ir

در این مطالعه کارآیی سیستم کشت، تکثیر، افزایش زنده‌مانی و تمایز سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف با استفاده از UCB-PL مورد بررسی قرار گرفت و از UCB-PL در حضور یا فقدان سایتوکاین‌های مؤثر (Flt3L، TPO،SCF) در تکثیر سلول‌های بنیادی خون‌ساز استفاده شد. نتایج نشان داد که UCB-PL به‌تنهایی برای شروع تکثیر مؤثر نیست. اما در ترکیب سایتوکاین‌های Flt3L، TPO،SCF سبب پیش برد تکثیر سلول‌ها در محیط کشت می‌شود. همچنین دُز مؤثرUCB-PL بر تکثیر UCB-MNC در حضور سایتوکاین‌های ذکرشده، ۵٪ بود که سبب افزایش معنی‌داری در تکثیر سلولی حتی در مقایسه با کنترل مثبت گردید. گرچه مطالعه‌ای مبنی‌بر اثر UCB-PL در تکثیر UCB-MNC تاکنون گزارش نشده است؛ اما گزارشاتی مبنی‌بر بررسی اثر عصارهٔ پلاکتی و دُز بهینهٔ آن بر روی تکثیر سایر سلول‌ها وجود دارد. همچنین در مطالعات متعدد، دُز مؤثر عصارهٔ پلاکتی مشتق از خون محیطی بر روی تکثیر سلول‌های کراتینوسایت ۲۸٪ (۱۲) بر روی سلول‌های فیبروبلاست ۱۹٪ (۱۵) بر روی سلول‌های اندوتلیال ۲۰٪ (۱۶، ۱۵) و بر روی سلول‌های بنیادی بافت‌چربی و فیبروبلاست انسانی ۵٪ گزارش شده است (۱۷).

در این مطالعه، با توجه به درصد افزایش سلول CD 133+ CD34+ CD38-، بیان ژن CD34 و افزایش کلونی‌های ردهٔ BFU-E، CFU-GM و CFU-GEMM مشخص گردیده است که دُزهای بالاتر از ۵٪ UCB-PL برای سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف کشنده می‌باشد و در غلظت ۵٪ UCB-PL این حدس را قوت می‌بخشد که عصارهٔ پلاکتی بندناف در حفظ بنیادینگی سلول‌های خون‌ساز مؤثر است. در سایر مطالعات نشان داده شده یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی که رابطه‌ای خطی بین آن و درصد موفقیت پیوند وجود دارد، تعداد CFU-GM می‌باشد که می‌توان از آن به‌عنوان یک عامل قابل‌اعتماد برای پیش‌بینی نتیجهٔ پیوند استفاده کرد. این آزمایشات اعلام کرده‌اند مقدار CFU-GM در مقایسه با سایر فاکتورها شامل تعداد کل سلول‌های هسته‌دار و حتی تعداد سلول‌های CD34 فاکتور مهم‌تری محسوب می‌گردد (۱۸).

مطالعهٔ محتویات عصارهٔ پلاکتی مکانیسم اثر این عصاره را بر سلول‌های خون‌ساز روشن می‌سازد. فاکتور رشد فیبروبلاستی bFGF (FGF-۲) موجود در پلاکت‌ها، یکی از عوامل مهم رگزایی است که در تعامل با سایتوکاین‌های خون‌ساز (IL-6, CSF-GM, IL-3, SCF) در تنظیم هماتوپویزیس نقش دارد. همچنین با اثر بر روی سلول‌های استرومال و پیش‌ساز سلول‌های خون‌ساز، اثر تنظیم‌کنندگی مثبتی بر روی خون‌سازی و اثر غیرمستقیم بر روی تکثیر مگاکاریوسیت‌ها دارد. به‌این‌ترتیب b-FGF نقش مهمی در تمایز سلول‌های اولیهٔ خون‌ساز به‌صورت فیزیولوژیکی و پاتولوژیک بازی می‌کند (۱۹، ۲۰).

فاکتور رشد شبه‌انسولینی (IGF–۱) موجود در پلاکت‌ها، باعث بهبود سرعت تکثیر پلاکت، گلبول قرمز و سلول بنیادی می‌شود. همچنین از آپوپتوز و مرگ سلولی، سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های پیش‌ساز جلوگیری می‌کند (۲۱). در حال حاضر، در سطح بسیاری از بافت‌ها گیرندهٔ فاکتور رشد شبه انسولینی وجود دارد. این گیرنده از نوع تیروزین‌کینازی می‌باشد و اتصال IGF–۱ به گیرنده باعث فعال‌شدن مسیر سیگنالینگ AKT می‌شود. IGF–۱ یکی از قوی‌ترین فعال‌کننده‌های این مسیر به‌شمار می‌آید (۲۲، ۲۳). فاکتور رشد پلاکتی VEGF به‌همراه bFGF برروی سلول‌های همانژیوبلاست از طریق گیرندهٔ تیروزین کیناز FLK-1 اثر گذاشته و موجب تکثیر سلول‌های همانژیوبلاست و خون‌سازی از طریق افزایش عملکرد سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌شود (۲٤). PDGF نیز ازجمله فاکتورهای مهم پلاکتی است که در حضور سایتوکاین‌های مختلف ازجمله ترمبوپویتین (TPO)، SCF و Flt3L، کارآمدترین فاکتورها در تکثیر سلول‌های CD34و کلونی‌های گرانولوسیت–اریتروئید–مارکروفاژ–مگاکاریوسیت‌ها (CFU-GEMM) می‌باشد. علاوه‌براین،

Archive of SID

www.SID.ir

PDGF سایتوکاین مؤثر بر روی تکثیر و عملکرد سلول‌های بنیادی و اجداد اولیهٔ آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی است و باعث افزایش قابل‌ملاحظهٔ این سلول‌ها در محیط کشت آزمایشگاهی می‌شود (۲۵). همچنین این فاکتور رشد پلاکتی در شرایط آزمایشگاهی باعث تحریک سلول اریتروئیدی شده و در حضور سایتوکاین‌هایی چون اریتروپوئتین (EPO) و فاکتور شبه‌انسولینی- (IGF-1) سبب افزایش رشد سلول اریتروئیدی می‌شود (۲۶).

نتیجه‌گیری

عصارهٔ پلاکتی مشتق از خون بندناف می‌تواند نقشی در فرایند تکثیر، تمایز و درصد زنده‌مانی سلول‌های تک‌هسته‌ای داشته باشد. با توجه به نتایج مطالعات پیشین که بیشترین بررسی، مربوطبه تأثیر عصارهٔ پلاکتی بر روی سلول‌های مزانشیم و سلول‌های هماتوپوئتیک جداشده از خون بندناف بوده است و گزارشی مبنی‌بر سلول‌های تک‌هسته‌ای تیمارشده با عصارهٔ پلاکتی مشتق از خون بندناف دیده نشده و همچنین با توجه به اینکه افزایش تکثیر و درصد بقای سلول‌های تک‌هسته‌ای بندناف از مهم‌ترین و کلیدی‌ترین عملکردهای فرایند پیوند می‌باشد، می‌توان این فراورده را به‌عنوان محرکی برای تسریع تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای در محیط کشت استفاده کرد.

UCB –PL در حضور سایتوکاین‌های خون‌ساز Flt3L، SCFو TPO به تقویت تکثیر سلول‌های UCB-MNC کمک می‌کند و باعث حفظ بنیادینگی در این سلول‌ها می‌شود. همچنین القاکنندهٔ قدرت تمایز UCB-MNC به سمت رده‌های متفاوت خون‌ساز می‌شود. به نظر می‌رسد می‌توان UCB–PL در حضور سایتوکاین‌های خون‌ساز Flt3L، SCF و TPO را به‌عنوان محرک برای تسریع تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای در محیط کشت پیشنهاد داد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه از پایان‌نامهٔ ارشد گروه سلول‌های خون‌ساز و سرطان پژوهشگاه رویان استخراج شده است که با حمایت مالی پژوهشگاه رویان و ستاد توسعه علوم و فناوری سلوی های بنیادی و با تأیید کمیتهٔ اخلاق پزشکی به‌شمارهٔ IR.ACECR.ROYAN.REC.1394.33 به‌تاریخ ۱۳۹٤/۰۵/۰۷ به‌انجام رسیده است.

منابع

1. Haspel RL, Miller KB. Hematopoietic stem cells: source matters. Current Stem Cell Research & Therapy 2008;3:229-36
2. Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: Current Practice and Future Innovations. Critical Reviews in Oncology/Hematology 2003;48:35-43
3. Nishino T, Osawa M, Iwama A. New approaches to expand hematopoietic stem and progenitor cells. Expert Opinion on Biological Therapy 2012;12:743-56
4. Stanevsky A, Shimoni A, Yerushalmi R, Nagler A. Cord blood stem cells for hematopoietic transplantation. Stem Cell Reviews 2011;7:425-33
5. Akala OO, Clarke MF. Hematopoietic stem cell self-renewal. Current Opinion in Genetics & Development 2006;16:496-501
6. Norkin M, Lazarus HM, Wingard JR. Umbilical cord blood graft enhancement strategies: has the time come to move these into the clinic? Bone Marrow Transplantation 2013;48:884-9
7. Lima MD. Mesenchymal Stem Cell (MSC) Based Cord Blood (CB) Expansion (Exp) leads to rapid engraftment of platelets and neutrophils. Blood 2010;116

Archive of SID

www.SID.ir

8. Jaroscak J,Goltry K, Smith A, Waters-Pick B, Martin PL, Driscoll TA, et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. Blood 2003;101: 5061-7
9. Rick G, Smith BS, C.C.P, Craig J, Glassmann C.C.P, and Mark S. Campbell, B.A , C.C.P. Platelet-rich Plasma: Properties and Clinical Applications. The Journal of Lancaster General Hospital 2007; 2
10. Jonsdottir-Buch SM, Lieder R, Sigurjonsson OE. Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. PlOS One 2013;8:e68984
11. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. Physiological Reviews 1999;79 :1283-316
12. Bolta PRmaZ. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. Acta Dermatoven APA 2007;16:10
13. Kita K, Lee JO, Finnerty CC, Herndon DN. Cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells: current challenges in engraftment, infection, and ex vivo expansion. Stem Cells International 2011;2011:276193
14. Cutler C, Ballen KK. Improving outcomes in umbilical cord blood transplantation: state of the art. Blood Reviews 2012;26 :241-6
15. Ranzato E, Patrone M, Mazzucco L, Burlando B. Platelet lysate stimulates wound repair of HaCaT keratinocytes. The British Journal of Dermatology 2008;159:537-45
16. Ranzato E, Mazzucco L, Patrone M, Burlando B. Platelet lysate promotes in vitro wound scratch closure of human dermal fibroblasts: different roles of cell calcium, P38, ERK and PI3K/AKT. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2009;13:2030-8
17. Ranzato E, Boccafoschi F, Mazzucco L, Patrone M, Burlando B. Role of ERK1/2 in platelet lysate-driven endothelial cell repair. Journal of Cellular Biochemistry 2010;110: 783-93
18. Wu JY, Liao C, Chen JS, Xu ZP, Li Y, Sun X, et al. [Analysis of post-thaw infused cell dose for predicting engraftment after unrelated cord blood transplantation]. Journal of Experimental Hematology / Chinese Association of Pathophysiology 2011;19:754-8
19. Kawai-Kowase K, Sato H, Oyama Y, Kanai H, Sato M, Doi H, et al. Basic fibroblast growth factor antagonizes transforming growth factor-beta1-induced smooth muscle gene expression through extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway activation. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2004;24 :1384-90
20. Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. Aging 2011;3:920-33
21. Zhou D, Deoliveira D, Kang Y, Choi SS, Li Z, Chao NJ, et al. Insulin-like growth factor 1 mitigates hematopoietic toxicity after lethal total body irradiation. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 2013;85:1141-8
22. Sattler FR. Growth hormone in the aging male. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2013;27:541-55
23. Barzilai N, Bartke A. Biological approaches to mechanistically understand the healthy life span extension achieved by calorie restriction and modulation of hormones. The journals of gerontology Series A, Biological Sciences and Medical Sciences 2009;64:187-91
24. Faloon P, Arentson E, Kazarov A, Deng CX, Porcher C, Orkin S, et al. Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. Development 2000;127:1931-41
25. Su RJ, Zhang XB, Li K, Yang M, Li CK, Fok TF, et al. Platelet-derived growth factor promotes ex vivo expansion of CD34+ cells from human cord blood and enhances long-term culture-initiating cells, non-obese diabetic/severe combined immunodeficient repopulating cells and formation of adherent cells. British Journal of Haematology 2002;117:735-46

Archive of SID

www.SID.ir

26. Drygalski A, Xu G, Constantinescu D, Kashiwakura I, Farley T, Dobrila L, et al. The frequency and proliferative potential of megakaryocytic colony-forming cells (Meg-CFC) in cord blood, cytokine-mobilized peripheral blood and bone marrow, and their correlation with total CFC numbers: implications for the quantitation of Meg-CFC to predict platelet engraftment following cord blood transplantation. Bone Marrow Transplantation 2000;25 :1029-34

Archive of SID

www.SID.ir

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
24th Year, No.127
February- March 2017

Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells by umbilical cord blood platelet lysate

Monireh Mohammad[1,2], Marzieh Ebrahimi[3*], Fatemeh Daneshman[4], Masoume Nouri[2], Pardis Khosravani[3]

1. Payame Noor University, Yazd, Iran.
2. Department of Regenerative Biomedicine, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
3. Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
4. Payame Noor University, Tehran, Iran.

*** Corresponding author e-mail: mebrahimi@royaninstitute.org**

Abstract

Background and Objective: In spite of promising results in treatment of blood diseases by umbilical cord blood cell transplantation, low number of derived stem cells has been a matter of concern. Since platelets extracts has been introduced as a potent mesenchymal stem cell culture supplement, the purpose of current study was to investigate the probable effects of umbilical cord blood platelet lysate (UCB-PL) in proliferation, survival and differentiation of cord blood mononuclear cells.

Materials and Methods: The umbilical cord blood platelet lysate (UCB-PL) was added to cord blood mononuclear cells culture (1×10 6 /mL) in presence of FLT3L, TPO and SCF. The effective dose of UCB-PL, cell viability and differentiation of mononuclear cells were determined by trypan blue staining and colony assay method, respectively. The number of mononuclear cells was measured by flowcytometric analysis of CD133+ CD34+CD38- cells. Quantitative expression of CD 34 was performed by QRT-PCR method.

Results: Combination of 5% of UCB-PL with mentioned cytokines yielded a 12-fold cell proliferation in comparison with control group. A higher concentration of UCB-PL showed cytotoxic effects. CD 34 also increased significantly in group of 5% UCB-PL treated cells. In this particular group, a significant increase of colony forming units granulocytes-erythroid-macrophages-megakaryocyte (CFU-GMMM) and granulocyte-macrophage (CFU-GM) were detected.

Conclusion: Our results indicate that 5% UCB -PL can be used as a supplement in MNC cultured cells and in cord blood hematopoietic stem cells for cell therapy purposes.

Key words: Proliferation and differentiation, Platelet extracts derived from umbilical cord blood, Colony assay

Received: 08/01/2017
Last revised: 12/02/2017
Accepted: 19/02/2017

Archive of SID

www.SID.ir