

## تأثیر نوروپیتید Y بر تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف

سوسن مرادی نسب<sup>۱</sup>، علی‌اکبر پورفتح‌اله<sup>۲</sup>، کامران عطاردی<sup>۳</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

تعداد کم سلول‌های بنیادی خونساز خون بند ناف یک محدودیت جهت مصارف بالینی است. از این رو تکثیر آزمایشگاهی این سلول‌ها به منظور دستیابی به تعداد مناسب برای مقاصد درمانی ضروری است. سیستم عصبی سمپاتیک و نوروترنسمیترها در تنظیم خود نوسازی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خونساز در ریز محیط مغز استخوان نقش دارند. هدف از مطالعه، ارزیابی قدرت تکثیری نوروپیتید Y در سلول‌های خونساز در شرایط آزمایشگاهی بود.

#### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، مقایسه کشت سلول‌های بنیادی خونساز پس از جداسازی آن‌ها در حضور فقط سایتوکاین (FLT3 L, TPO, SCF) به عنوان گروه کنترل و در شرایط تیمار شده با غلظت ۱ میکرومولار نوروپیتید Y علاوه بر سایتوکاین به عنوان آزمون انجام پذیرفت. در روز ۷ تعداد تام سلول‌های هسته‌دار و سلول‌های CD34<sup>+</sup> محاسبه گردید. قدرت کلنی‌زایی سلول‌های تزايد یافته بررسی شد. آزمون LTC-IC نیز جهت بررسی قدرت کلنی‌زایی در کشت طولانی مدت انجام شد.

#### یافته‌ها

تکثیر ۷ روزه سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف منجر به افزایش معنادار سلول‌های تام تک هسته‌ای و CD34<sup>+</sup> تیمار شده با نوروپیتید Y در مقایسه با گروه کنترل شد. مشاهده انواع کلنی‌های مختلط، میلیویدی و اریتروئیدی در آزمون CFU نشان‌دهنده حفظ قدرت تمایزی سلول‌های تکثیر یافته CD34<sup>+</sup> به انواع رده‌های خونی بود. سلول‌های تکثیر شده با نوروپیتید Y قدرت کلنی‌زایی در کشت طولانی مدت را حفظ کرده بودند.

#### نتیجه‌گیری

مطالعه ما نشان داد نوروپیتید Y می‌تواند تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز را با حفظ قدرت تمایز به انواع رده‌ها در کشت ۷ روزه و در حضور مکمل سایتوکاینی حمایت نماید.

**کلمات کلیدی:** خون بند ناف، سلول‌های بنیادی خونساز، نوروپیتید Y

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۱

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران  
۲- PhD ایمونولوژی - استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران  
۳- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

**مقدمه**

پیوند سلول‌های بنیادی خونساز در دهه‌های اخیر، به عنوان یک گزینه درمانی مناسب برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است. انواع لوسمی‌ها، آنمی آپلاستیک، آنمی داسی شکل، تالاسمی‌ها و ... از جمله بیماری‌هایی می‌باشند که با پیوند سلول‌های بنیادی خونساز درمان شده‌اند. این سلول‌ها را می‌توان از سه منبع مغز استخوان، خون محیطی و خون بند ناف جداسازی کرد. با توجه به سهولت جداسازی این سلول‌ها از خون بند ناف و همین‌طور با توجه به این‌که تا سالیانی‌نه چندان دور بند ناف به عنوان یک زباله تلقی و مورد توجه قرار نمی‌گرفت، جداسازی سلول‌های بنیادی خونساز از خون بند ناف توجه محققین را به خود جلب کرد (۱، ۲). پیوند خون بند ناف به بیمارانی که اهداکننده سازگار خویشاوند یا غیرخویشاوند ندارند، منجر به درمان بیماری‌های بدخیم بسیاری گردید. با توجه به تعداد محدود سلول‌های بنیادی در خون بند ناف و تاخیر پیوند در مقایسه با مغز استخوان و خون محیطی، این روش درمانی عمدتاً برای کودکان بیمار به کار گرفته شد (۳). پیوند خون بند ناف در صورت عدم دسترسی به اهداکننده خویشاوند یا غیرخویشاوند سازگار به عنوان درمان انتخابی مطرح گردید. اما با توجه به دوز سلولی توصیه شده جهت پیوند خون بند ناف و وزن بالغین، این گروه از بیماران نیازمند از این روش درمانی محروم می‌گردند (۴). یکی از ابتدایی‌ترین مطالعه‌هایی که به منظور تسریع روند پیوند و بهبود بازیابی سیستم ایمنی مورد مطالعه قرار گرفت، تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی یا پیش‌سازهای اولیه خون بند ناف بود. با افزایش دانش در مورد جایگاه‌های خونسازی و روش‌های جدید القاء تکثیر بدون تمایز پیش‌سازها، بند ناف در دسترس بیشتری قرار گرفت. سابقه استفاده از روش‌های تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی به سال‌های قبل بر می‌گردد. فرآیند تکثیر سلول‌های بنیادی با جداسازی سلول‌های پیش‌ساز  $CD34^+$  یا  $CD133^+$  و انکوباسیون آن‌ها در سرم یا محیط‌های جایگزین همراه با فاکتورهای رشد از جمله SCF، TPO و G-CSF انجام می‌پذیرد.

سلول‌های بنیادی خونساز در ریز محیط مغز استخوان تحت تأثیر عواملی قرار می‌گیرند که در تعیین سرنوشت آن‌ها مؤثر است. یکی از این عوامل تأثیرات سیستم عصبی در کنترل ریز محیط مغز استخوان است (۷-۵). نوروترنسمیترهای مترشحه از سیستم عصبی سمپاتیک، نقش کلیدی در تنظیم ریز محیط مغز استخوان دارند. اگر چه مکانیسم این تغییرات ناشناخته است، بیان گیرنده‌های نوروترنسمیترها روی پیش‌سازهای خونی، گواهی بر ارتباط مستقیم سیستم عصبی و سیستم خونی است. نوروپپتید Y از مهمترین و فراوان‌ترین نوروترنسمیترهای عصبی در سیستم اعصاب سمپاتیک است، نوروپپتید Y با ۳۶ اسیدآمینو و وزن مولکولی ۴۲۵۳ گرم بر مول است که به همراه پپتید YY و پلی‌پپتید پانکراتیک جزو خانواده PP-Fold یا NPY می‌باشند و به عنوان نوروترنسمیتر در مغز و سیستم عصبی اتونومیک انسان عمل می‌کند. این واسطه‌های شیمیایی در سیستم عصبی اتونومیک عمدتاً توسط سیستم اعصاب سمپاتیک تولید می‌گردند و در مغز در هیپوتالاموس ساخته می‌شوند. نوروپپتید Y ابتدا در سال ۱۹۸۲ توسط تاموتو از هیپوتالاموس خوک جدا شد و از آن پس مطالعه‌های زیادی در رابطه با نقش آن در انسان انجام گرفت (۸). نقش‌های فیزیولوژیک متفاوتی برای آن ذکر شده است، از جمله نقش آن در مکانیسم‌های ضد پیری، تنظیم اشتها، تنظیم مصرف انرژی، تنظیم هموستاز استخوان، هموستاز سلول‌های ایمنی، تنظیم ریز محیط مغز استخوان، آنژیوژنز، یادگیری و حافظه (۹-۱۱). دوز دارویی آن می‌تواند اثر درمانی برای نوروپاتی عصبی و عدم کارایی مغز استخوان داشته باشد (۱۲). اثر مستقیم تنظیمی گیرنده نوروپپتید Y روی شمار متفاوتی از سلول‌ها از جمله پیش‌سازهای عصبی و سلول‌های بنیادی رویانی اثبات شده است. کشت طولانی مدت سلول‌های پیش‌ساز رویانی در حضور نوروپپتید Y و بدون لایه مغذی منجر به تکثیر بدون تمایز آن‌ها شد (۱۳). زیر تیپ‌های گیرنده نوروپپتید Y توسط اغلب سلول‌های ایمنی، سلول‌های آدیپوسیت، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان می‌شوند (۱۷-۱۴).

توجه به بیان زیر تیپ‌های ۱ و ۵ نوروپیتید در اغلب سلول‌های ایمنی، برای تایید بیان این دو گیرنده نوروپیتید Y در سلول‌های بنیادی خونساز، آزمون Conventional PCR با استفاده از توالی آغازگرهای گیرنده‌های زیر تیپ ۱ و ۵ نوروپیتید Y و ژن خانه‌دار *GAPDH* (به عنوان کنترل) انجام گرفت (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۷ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، ۱۰ میکرولیتر Master mix، ۰/۵ میکرومول از هر کدام از آغازگرها و ۱ میکرولیتر cDNA به عنوان الگو در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از ژل آگارز ۲٪ مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین دوز مناسب نوروپیتید Y، مجدداً جداسازی سلول‌های CD34<sup>+</sup> صورت گرفت. شمارش تام سلول‌های تک هسته‌ای به وسیله لام نئوبار انجام شد. در این مرحله به منظور تعیین خلوص سلول‌های CD34<sup>+</sup> و سلول‌های CD38<sup>-</sup> به روش فلوسیتومتری، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (حاوی ۱۰<sup>۴</sup> سلول)، جهت بررسی مارکرهای سطحی به دو لوله یکی مربوط به آزمایش و دیگری مربوط به کنترل ایزوتیپ منتقل گردیده، به لوله آزمایش میزان ۲/۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی مونوکلونال CD34-PE و ۲/۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی مونوکلونال CD38-FITC (شرکت BD) و به لوله کنترل ایزوتوپ ۲/۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی IgG<sub>1</sub>-FITC/PE (شرکت BD) بر علیه سلول‌های موشی جهت شناسایی و حذف باندهای غیراختصاصی اضافه شد.

هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر نوروپیتید Y بر تکثیر آزمایشگاهی سلول بنیادی خونساز واحد خون بند ناف بود.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی طی سه مرحله مشتمل بر بررسی بیان گیرنده‌های نوروپیتید Y، تعیین دوز مناسب نوروپیتید Y بر تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز و نحوه تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز تیمار شده با نوروپیتید Y در مقابل گروه کنترل انجام و در هر مرحله ۳ واحد خون بند ناف مورد آزمون قرار گرفت. ابتدا در مرکز جمع‌آوری خون بند ناف، اقدام به اخذ رضایت‌نامه کتبی از والدین شد. سپس نمونه خون بند ناف بعد از زایمان در کیسه‌های مخصوص خون بند ناف جمع‌آوری و در شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه‌ها کمتر از ۴ ساعت از زمان نمونه‌گیری مورد پردازش قرار گرفتند. ابتدا سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از فایکول جدا شدند. سپس سلول‌های بنیادی خونساز به روش MACS و توسط آنتی‌بادی بر علیه CD34 جدا شدند. میزان خلوص سلول‌های CD34<sup>+</sup> با روش فلوسیتومتری ارزیابی شد. به منظور بررسی نحوه بیان گیرنده‌های نوروپیتید Y از سلول‌های CD34<sup>+</sup> با خلوص بیش از ۹۰٪ استفاده شد. RNA سلول‌های CD34<sup>+</sup> با استفاده از ترايزول جدا شد. بعد از استخراج RNA با استفاده از کیت cDNA Synthesis kit Thermo scientific شرکت ترمو، مطابق دستورالعمل سازنده ساخت cDNA انجام پذیرفت. با

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده برای PCR

آغازگر	جهت	توالی (5'...3')	طول قطعه تکثیری (bp)
NPY1R	جلوبرنده	ATTTCCATCGGACTTCATAGG	۱۳۸
	معکوس	TTGTCCATCATGTTGTTTCTCC	
NPY5R	جلوبرنده	TGTTACAAGGAAAGGCTATCG	۱۴۶
	معکوس	ATACTCGTCGAGCTCTAAATCC	
GAPDH	جلوبرنده	CTGGCCAAGGTCATCCATG	۱۲۰
	معکوس	GCCATCACGCCACAGTTTC	

از نرم‌افزار SPSS ۱۶ و آزمایش آماری Paired sample t-Test جهت آنالیز داده‌ها استفاده شد.  $p < 0/05$  از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شده است.

#### یافته‌ها

به منظور تایید حضور قطعه ژنی NPY1R و NPY5R، روی cDNA تام استخراج شده از سلول بنیادی خونساز، PCR انجام شد. پس از انجام conventional PCR، محصولات تکثیر شده از هر دوی گیرنده‌ها روی ژل منتقل و الکتروفورز شد. طول قطعه تکثیر شده مورد انتظار برای NPY 1R و NPY 5R به ترتیب ۱۳۸ و ۱۴۶ بود. بانندی در محدوده ۱۴۶ bp مشاهده نشد. باند به دست آمده برای NPY1R مؤید حضور گیرنده تیپ ۱ نوروپپتید Y در سلول‌های  $CD34^+$  بود. بیشترین میزان تکثیر سلول‌های هسته‌دار و سلول‌های  $CD34^+/CD38^-$  در غلظت ۱ میکرومولار نوروپپتید Y مشاهده شد (نمودار ۱).

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود پاسخ سلول‌های  $CD34^+$  مورد مطالعه به غلظت‌های مختلف نوروپپتید Y، وابسته به دوز بود و میزان تکثیر بدون تمایز سلول‌ها متأثر از افزایش غلظت نوروپپتید Y بوده و بیشینه تکثیر سلولی به میزان ۱۸/۸ برابر با  $p < 0/002$  در برابر افزایش تکثیر سلولی به میزان ۱۷/۲ برابر با  $p < 0/003$  به ترتیب با غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میکرومولار نوروپپتید Y در برابر گروه کنترل با افزایش تکثیر سلولی به میزان ۱۲/۵ برابر مشاهده شد، لذا از غلظت ۱ میکرومولار نوروپپتید Y در ادامه مطالعه استفاده شد.

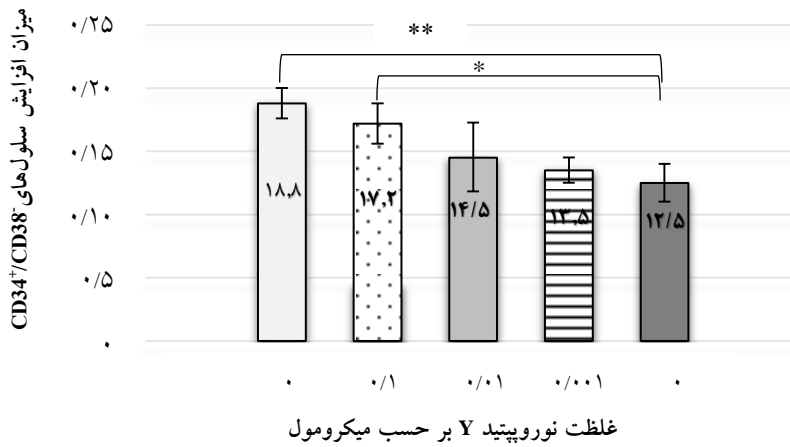
به منظور بررسی نحوه تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز تیمار شده با غلظت بهینه نوروپپتید Y، مجدداً سلول‌های  $CD34^+$  واحدهای خون بند ناف جدا گردید. شمارش تام سلول‌های تک هسته‌ای توسط لام ثنوبار انجام گرفت و از نظر ایمونوفنوتیپ با روش فلوسیتومتری بررسی شد. پس از یک هفته کشت سلول‌های  $CD34^+$  در حضور و عدم حضور نوروپپتید Y، از سلول‌های تکثیر یافته نمونه‌برداری به عمل آمد و شمارش تام سلول‌های هسته‌دار، آنالیز فلوسیتومتری، بررسی قدرت کلنی‌زایی و آزمون LTC-IC انجام پذیرفت (شکل ۱).

لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نهایتاً نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسیتومتری (Partec PAS III) و تحت نرم‌افزار فلومکس تجزیه و تحلیل شد. سلول‌های بنیادی خونساز در مقابل غلظت‌های مختلف نوروپپتید Y (شرکت Tocris) قرار داده شد و دوز مناسب بر اساس بیشترین تکثیر و کمترین تمایز سلول‌های تریزید یافته در مقایسه با گروه کنترل انتخاب شد. غلظت‌های مورد مطالعه ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میکرومولار بود. پس از تعیین دوز مناسب نوروپپتید Y، تکثیر سلول‌های  $CD34^+$  خون بند ناف در دو شرایط مختلف به صورت زیر انجام پذیرفت.

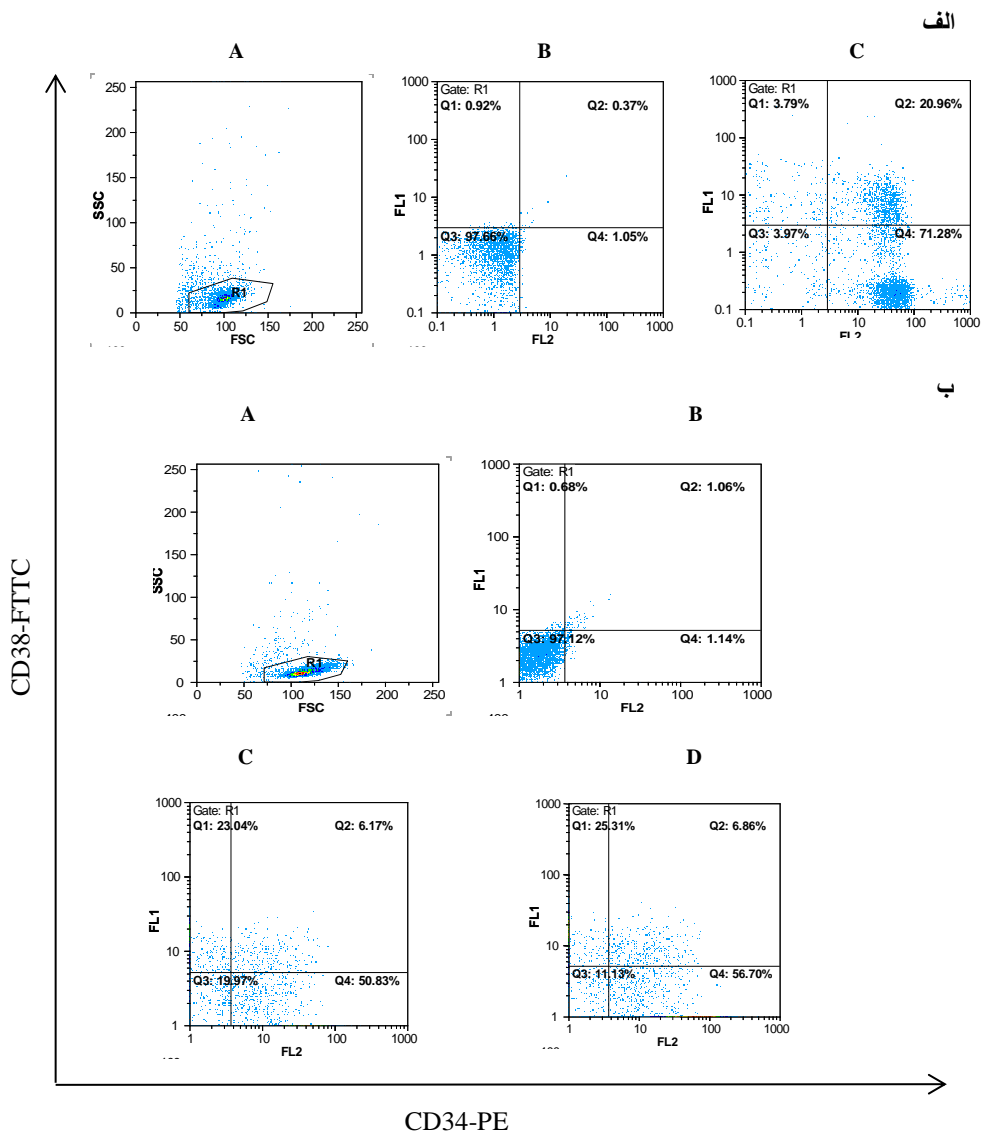
۱- تیمار شده توسط نوروپپتید Y به همراه سایتوکاین (Cyto+NPY) (غلظت نوروپپتید Y ۱ میکرومولار)

۲- تنها در حضور سایتوکاین (Cyto-NPY)

تکثیر سلول‌ها در هر دو شرایط به صورت تکرار سه‌تایی و در محیط کشت Stem span (شرکت استم سل تکنولوژی) و در حضور سایتوکاین‌های TPO، SCF (با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر) و Flt3L (با غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر) به مدت یک هفته انجام پذیرفت. پس از ۷ روز کشت سلولی، سلول‌های تکثیر یافته از نظر مارکرهای سطحی  $CD34$  و  $CD38$  ایمونوفنوتیپ شدند. قدرت کلنی‌زایی سلول‌های بنیادی  $CD34^+$  قبل و بعد از یک هفته کشت به روش CFU-assay در محیط H4435 Methocult (شرکت استم سل تکنولوژی) انجام گرفت. تعداد ۳۰۰۰ سلول به ۳ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد. سوسپانسیون تهیه شده مخلوط شد تا کاملاً به صورت یکنواخت در بیاید. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی ایجاد شده به آرامی به هر یک از پلیت‌های ۳۵ میلی‌متری انتقال داده شد و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪  $CO_2$  قرار داده شد. سلول‌ها در مدت ۱۴ روز انکوباسیون به کلونی‌های واحد، تکثیر و تمایز پیدا کردند. پس از ۱۴ روز کلونی‌ها به وسیله میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۱۰ شمارش شدند. بررسی قدرت کلنی‌زایی سلول‌های بنیادی خونساز در کشت طولانی مدت (LTC-IC) بعد از تکثیر انجام گرفت و بعد از ۵ هفته برای آن CFU assay انجام شد.



نمودار ۱: مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف نوروپپتید Y بر تکثیر سلول‌های CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> (\* افزایش معنادار در سطح  $p < 0.003$ ، \*\* افزایش معنادار در سطح  $p < 0.002$ )



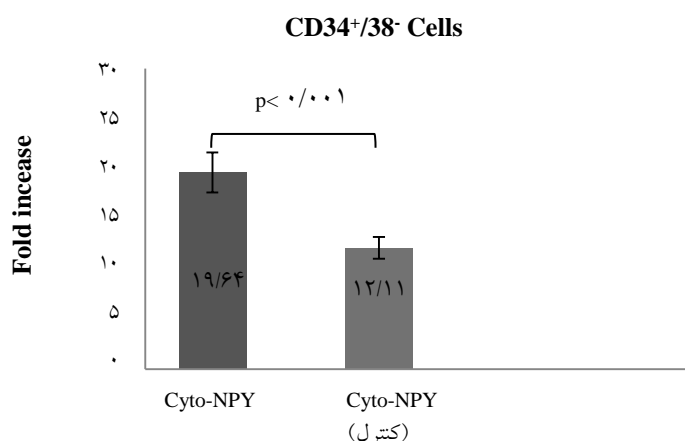
شکل ۱: نتیجه بررسی فلوسیتومتری شاخص‌های CD34 و CD38 از نمونه بند ناف جداسازی شده روز صفر A: گراف نمایشگر پراکندگی سلولی، سلول‌های مونونوکلنار در گیت R<sub>1</sub> انتخاب شده‌اند. B: گراف نمایشگر اتصال با آنتی‌بادی ایزوتیپ کنترل کنزوجه با PE و FITC C: گراف نمایشگر اتصالات سلولی با دو آنتی‌بادی CD34-PE و CD38-FITC (ب) نمایشی از بررسی فلوسیتومتری میزان تکثیر سلول‌های CD34<sup>+</sup> تیمار شده بعد از یک هفته کشت A: گراف نمایشگر پراکندگی سلولی، سلول‌های مونونوکلنار در گیت R<sub>1</sub> انتخاب شده‌اند. B: گراف نمایشگر اتصال با آنتی‌بادی ایزوتیپ کنترل کنزوجه با PE و FITC C: گراف نمایشگر اتصالات سلولی گروه کنترل با دو آنتی‌بادی CD34-pE و CD38-FITC D: گراف نمایشگر اتصالات سلولی گروه تیمار با ۱ μM از نوروپپتید Y با دو آنتی‌بادی CD34-PE و CD38-FITC (میزان شاخص CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> برای سه تکرار در روز صفر ۷۰/۲۸ و پس از ۷ روز کشت، برای گروه‌های کنترل، تیمار با نوروپپتید Y به ترتیب ۴/۱۱ ± ۵۲/۴ و ۶۱/۷۳ ± ۳/۴۴ بود.)

شکل ۱ نتایج بررسی فلوسیتومتری شاخص‌های CD34 و CD38 در روز صفر و پس از ۷ روز کشت را نشان می‌دهد.

شمارش کلی سلول‌ها و تکثیر آن‌ها طی مدت یک هفته در هر دو حالت کشت نسبت به تعداد سلول‌های اولیه منتقل شده به هر چاهک افزایش داشت، اما این افزایش به صورت معناداری در گروه تیمار شده با نوروپپتید Y (۳/۱۵ ± ۱۸/۴۵) بیش از گروه کنترل (۱۱/۲۴ ± ۱/۴۷) بود (p < ۰/۰۰۱). در مرحله بعد میزان تکثیر سلول‌های CD34<sup>+</sup>/38<sup>-</sup> دو حالت مختلف با همدیگر مقایسه شد (نمودار ۲).

قدرت کلنی‌زایی سلول‌ها نیز بعد از یک هفته کشت در هر دو حالت کشت نسبت به قدرت کلنی‌زایی اولیه (روز صفر) (به ازای ۱۰<sup>۳</sup> سلول) افزایش داشت.

قدرت کلنی‌زایی در پایان روز هفتم در گروه آزمایش (Cyto+NPY) در مقایسه با گروه کنترل (Cyto-NPY) افزایش معناداری داشت (p < ۰/۰۵) (جدول ۲). به منظور ارزیابی توان سلول‌های تکثیر شده در تولید کلنی در شرایط کشت طولانی مدت، از آزمون LTC-IC استفاده شد. نتایج این آزمون نشان از افزایش میزان قدرت کلنی‌زایی در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل داشت (p = ۰/۰۱) (نمودار ۳).

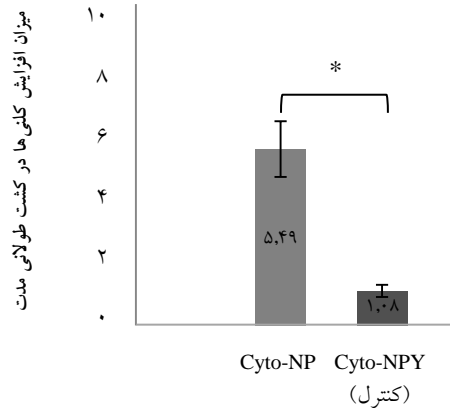


نمودار ۲: مقایسه میزان افزایش سلول‌های CD34<sup>+</sup>/38<sup>-</sup> بعد از یک هفته کشت در حضور و عدم حضور نوروپپتید Y

جدول ۲: میانگین کلنی‌زایی سلول‌های TNC در روز صفر کلنی ۱۲/۱ ± ۱۲۷ به ازای ۱۰<sup>۳</sup> سلول می‌باشد. p value گروه‌های آزمایش نسبت به گروه کنترل محاسبه شده‌اند.

شرایط کشت	نمونه	10 <sup>3</sup> TNC/CFC	CFC Fold increase	p value
Cyto+NPY	a	۸۰	۱۳/۷۱	۰/۰۴۴
	b	۷۴	۱۲/۲۵	
	c	۹۱	۱۳/۷۳	
	انحراف معیار ± میانگین	۸۱/۶۶ ± ۸/۶۲	۱۳/۲۱ ± ۰/۸۵	
Cyto-NPY (کنترل)	a	۵۱	۶/۴۲	***
	b	۸۳	۸/۸۴	
	c	۶۷	۶/۳۵	
	انحراف معیار ± میانگین	۶۴ ± ۱۱/۵۳	۷/۲ ± ۱/۴۱	

LTC-IC



نمودار ۳: مقایسه قدرت کلنی‌زایی گروه تیمار شده با نوروپپتید Y و گروه کنترل و کنترل در کشت طولانی مدت (LTC-IC)  
(\* افزایش معنادار در سطح  $p=0/01$ )

شده است. به تازگی از تاثیر NPY بر خود نوسازی سلول‌های بنیادی رویانی صحبت شده است. در مطالعه‌ای که توسط سان می انجام شد، تاثیر مستقیم نوروپپتید Y بدون کشت توأم با لایه مغذی مورد ارزیابی قرار گرفت و به تکثیر بدون تمایز معنادار در سلول‌های بنیادی رویانی دست یافت که با نتایج این مطالعه مبنی بر تاثیر مستقیم نوروپپتید Y بر سلول‌های بنیادی خونساز مطابق است. سان می خصوصیت پرتوانی سلول‌های بنیادی رویانی تکثیر یافته و توان تمایزی آن‌ها را مورد ارزیابی قرار داد. سلول‌ها توان تمایزشان به سلول‌های اکتودرم، مزودرم و اندودرم را حفظ کرده بودند. در مطالعه حاضر نیز سلول‌های تیمار شده توسط نوروپپتید خاصیت تمایزی خود را به رده‌های اریتروئیدی و گرانولوسیتی حفظ کرده بودند و قدرت کلنی‌زایی در آن‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار داشت.

هم چنین نقش سیتوکاین‌های FLt3، TPO و SCF در تزاید سلول‌های بنیادی خونساز نظیر سایر مطالعه‌ها مورد تأیید قرار گرفت، پتانسیل نوروپپتید Y در تکثیر سلول‌های پیش‌ساز خونی در مقایسه با روش‌های کشت بدون تیمار و تنها در حضور سایتوکاین نیز به تأیید رسید. تکثیر سلول‌های  $CD34^+$  با استفاده از تیمار کردن توسط نوروپپتید Y در پایان هفته اول نسبت به شرایط کشت

بحث

تکثیر ۷ روزه سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف، منجر به افزایش معنادار سلول‌های تام تک هسته‌ای و سلول‌های  $CD34^+$  تیمار شده با نوروپپتید Y در مقایسه با گروه کنترل گردید. سلول‌های بنیادی خونساز در ریز محیط مغز استخوان تحت تاثیر عواملی قرار می‌گیرند که در تعیین سرنوشت آن‌ها مؤثر است. در مطالعه‌های اخیر مطرح شده است که ریز محیط مغز استخوان توسط اعصاب سمپاتیک تنظیم می‌گردد، اگر چه مکانیسم‌هایی که توسط آن نوروترنسمیترهای مترشحه از اعصاب سمپاتیک مغز استخوان را تنظیم می‌کنند، هنوز ناشناخته است. در این مطالعه، نقش مستقیم نوروپپتید Y در تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز نشان داده شد. در حالی که پارک و همکارانش گزارشی ارایه کردند مبنی بر این که نوروپپتید Y از طریق برهمکنش با ماکروفاژها و سلول‌های اندوتلیال باعث بقای سلول‌های بنیادی خونساز می‌گردد. وی هم چنین نشان داد که موش‌های ناک اوت شده از نظر ژن نوروپپتید Y به شدت دچار کاهش سلول‌های بنیادی خونساز شدند و بازسازی مغز استخوان در آن‌ها مختل شد (۱۱).

در مطالعه‌های قبلی اثرات برهم کنش نوروپپتید Y و گیرنده تیپ ۱ در تکثیر گروه‌های مختلف سلولی نشان داده

مقایسه با فقط سیتوکین‌ها جهت تکثیر و حفظ خودنوسازی سلول‌های بنیادی خونساز، اثری ماندگارتر و پایاتر است به این ترتیب و با توجه به مطالب ارائه شده نوروپپتید Y می‌تواند به عنوان یک فاکتور مؤثر بر تکثیر در بازسازی مغز استخوان نقش داشته باشد و هم چنین به عنوان یک مکمل در کشت سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. بدین وسیله از مؤسسه به جهت حمایت مالی تشکر می‌گردد.

بدون تیمار کردن افزایش چشم‌گیری نشان داد. قدرت کلنی‌زایی سلول‌های تکثیر شده به روش تیمار با نوروپپتید Y در مقایسه با روش کشت فاقد تیمار به صورت معناداری افزایش یافت.

افزایش چشمگیر سلول‌های هسته‌دار، سلول‌های CD34<sup>+</sup>، CFC-U و LTC-IC در تکثیر سلول‌ها با استفاده از نوروپپتید Y در مقایسه با سایر روش‌ها مؤید این مطلب است که سیستم عصبی از طریق نوروپپتید Y به خوبی خودنوسازی سلول‌ها را حمایت می‌کند.

### نتیجه‌گیری

با توجه به الگوی افت تعداد سلول‌های CD34<sup>+</sup> و خصوصاً CFC-U و LTC-IC، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که اثر تیمار کردن سلول‌های بنیادی با نوروپپتید Y در

### References:

- 1- Conrad PD, Emerson SG. *Ex vivo* expansion of hematopoietic cells from umbilical cord blood for clinical transplantation. *J Leukoc Biol* 1998; 64(2): 147-55.
- 2- Berglund S, Magalhaes I, Gaballa A, Vanherberghen B, Uhlin M. Advances in umbilical cord blood cell therapy: the present and the future. *Expert Opin Biol Ther* 2017; 17(6): 691-9.
- 3- Gluckman E, Ruggeri A, Volt F, Cunha R, Boudjedir K, Rocha V. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol* 2011; 154(4): 441-7.
- 4- Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan K-W, *et al.* Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol* 2004; 32(4): 397-407.
- 5- Coste C, Neirinckx V, Gothot A, Wislet S, Rogister B. Are neural crest stem cells the missing link between hematopoietic and neurogenic niches? *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 218.
- 6- Spiegel A, Kalinkovich A, Shvitiel S, Kollet O, Lapidot T. Stem cell regulation via dynamic interactions of the nervous and immune systems with the microenvironment. *Cell Stem Cell* 2008; 3(5): 484-92.
- 7- Sato M, Katayama Y. Osteocytes and Homeostasis of Remote Organs. *Curr Osteoporos Rep* 2015; 13(4): 193-7.
- 8- Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 1982; 296(5858): 659-60.
- 9- Zukowska Z, Grant DS, Lee EW. Neuropeptide Y: a novel mechanism for ischemic angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13(2): 86-92.
- 10- Botelho M, Cavadas C. Neuropeptide Y: An anti-aging player? *Trends Neurosci* 2015; 38(11): 701-11.
- 11- Park MH, Jin HK, Min WK, Lee WW, Lee JE, Akiyama H, *et al.* Neuropeptide Y regulates the hematopoietic stem cell microenvironment and prevents nerve injury in the bone marrow. *EMBO J* 2015; 34(12): 1648-60.
- 12- Hansel D, Eipper B, Ronnett G. Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature* 2001; 410(6831): 940-4.
- 13- Son MY, Kim MJ, Yu K, Koo DB, Cho YS. Involvement of neuropeptide Y and its Y1 and Y5 receptors in maintaining self-renewal and proliferation of human embryonic stem cells. *J Cell Mol Med* 2011; 15(1): 152-65.
- 14- Dimitrijević M, Stanojević S. The intriguing mission of neuropeptide Y in the immune system. *Amino Acids* 2013; 45(1): 41-53.
- 15- Zukowska Z, Pons J, Lee EW, Li L. Neuropeptide Y: a new mediator linking sympathetic nerves, blood vessels and immune system? *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81(2): 89-94.
- 16- Buttari B, Profumo E, Domenici G, Tagliani A, Ippoliti F, Bonini S, *et al.* Neuropeptide Y induces potent migration of human immature dendritic cells and promotes a Th2 polarization. *FASEB J* 2014; 28(7): 3038-49.
- 17- Bedoui S, Kromer A, Gebhardt T, Jacobs R, Raber K, Dimitrijevic M, *et al.* Neuropeptide Y receptor-specifically modulates human neutrophil function. *J Neuroimmunol* 2008; 195(1-2): 88-95.



Original Article

## The impact of neuropeptide Y on expansion of cord blood hematopoietic stem cells

Moradi-Nasab S.<sup>1</sup>, Pourfathollah A.A.<sup>1</sup>, Atarodi K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

### Abstract

#### Background and Objectives

The low number of hematopoietic stem cells (HSCs) in each unit of UCB is a limitation for clinical application of this source of HSCs. *Ex vivo* expansion of HSCs to obtain a sufficient number for therapeutic purposes is necessary. The sympathetic nervous system (SNS) and neurotransmitters regulate HSCs self-renewality, proliferation and differentiation in the bone marrow. The aim of this study was to evaluate the proliferative effect of NPY on the CB-HSCs in *ex vivo* condition.

#### Materials and Methods

After isolation of HSCs, the comparison of HSCs *Ex vivo* expansion using 1  $\mu$ M NPY and cytokine as test group with cytokine as control group was performed. TNC number and CD34<sup>+</sup> cell number were calculated on day 7. Colony formation assay was performed in methylcellulose medium. LTC-IC assay was performed to investigate colonization potential of expanded cells in long time culture.

#### Results

*Ex vivo* expansion of CB-HSCs after 7 days resulted in significant increase in the number of total nucleated cells and CD34<sup>+</sup> cells in NPY-treated groups in comparison to control group. The formation of different cell colonies identified as erythrocytic, granulocytic and mix colonies in CFU assay reflect the differentiation potential of expanded CD34 cells. Treated group with NPY also retained their ability to formate colonies in long term culture.

#### Conclusions

Our study demonstrated that Neuropeptide Y can successfully support expansion of CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells while retaining their potential of being differentiated into various cell lineages after 7-day culture period with cytokine supplementation.

**Key words:** Umbilical Cord Blood, Hematopoietic Stem Cells, Neuropeptide Y

Received: 17 Jun 2017

Accepted: 12 Sep 2017

Correspondence: Atarodi K., PhD of Hematology. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.  
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052146; Fax: (+9821) 88601599  
E-mail: k.atarodi@ibto.ir