Downloaded from bloodjournal.ir at 22:58 +0330 on Saturday February 17th 2018

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۴ شماره ۴ زمستان ۹۶ (۳۰۴-۲۹۵)

مقاله پژوهشی

توسعه سلول‌های بنیادی $CD34^+$ خون بند ناف در داربست DBM تحت تاثیر نیکوتین آمید

مریم حاج علی عسگری[۱]، مهین نیکوگفتار ظریف[۲]، مسعود سلیمانی[۳]، مجید شهابی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

تعداد کم سلول‌های بنیادی خونساز در خون بند ناف، مانعی مهم برای پیوند موفقیت‌آمیز این سلول‌ها بوده و ازدیاد این سلول‌ها در کنار حفظ خصوصیات عملکردی آن‌ها، از اهمیت بالایی برخوردار است. کشت سلول‌ها بر روی داربست‌های سه بعدی، کمک بسیاری به شبیه‌سازی ریز محیط مکانیکی و شیمیایی بافت مغز استخوان کرده و استفاده از ترکیبات خاصی چون نیکوتین آمید به تکثیر بدون تمایز سلول‌ها کمک می‌کند. به این ترتیب در این مطالعه به منظور تکثیر با حداقل تمایز سلول‌های بنیادی خونساز، توسعه این سلول‌ها در محیطی نزدیک به مغز استخوان طبیعی در حضور نیکوتین آمید بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی خونساز در ۵ بار تجربه در محیط سه بعدی و در شرایط مختلف تحت تاثیر سایتوکاین‌ها و نیکوتین آمید به مدت ۷ روز کشت داده شدند. در نهایت به منظور بررسی میزان توسعه سلولی، شمارش تام سلولی، ایمونوفنوتیپ سلولی و سنجش آپوپتوز به روش فلوسیتومتری و هم چنین بررسی توانایی کلنی‌زایی سلول‌ها انجام شد. نتایج توسط آزمون آنوا بررسی شد.

یافته‌ها

نتایج این مطالعه حکایت از تکثیر بیشتر در تعداد کل سلول‌ها و سلول‌های $CD34^+$، میزان کمتر آپوپتوز و توانایی کلنی‌زایی بالاتر در موارد استفاده توام از سایتوکاین‌ها و نیکوتین آمید در داربست سه بعدی نسبت به گروه‌های دیگر داشت.

نتیجه گیری

نیکوتین آمید با ممانعت از ایجاد تغییرات اپی ژنتیکی حاصل از کشت در محیط آزمایشگاه و داربست سه بعدی با شبیه‌سازی ریز محیط مغز استخوان، ترکیب بسیار مناسبی برای توسعه این سلول‌ها به شمار می‌آیند.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی هماتوپوئتیک، نیکوتین آمید، بندناف

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۱
تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۵

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
۳- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۴- PhD فرآورده‌های بیولوژیک ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

Downloaded from bloodjournal.ir at 22:58 +0330 on Saturday February 17th 2018

مقدمه

پیوند آلوژنیک مغز استخوان، درمان قطعی در بدخیمی‌های سیستم خونساز و بعضی بیماری‌های غیر سیستم خونساز است. سلول‌های بنیادی خونساز(HSC) حاصل از خون بند ناف، سلول‌هایی بسیار پرتوان بوده و جایگاه ویژه‌ای را در سلول درمانی و پزشکی بازساختی به خود اختصاص داده‌اند، لیکن به دلیل تعداد کم، استفاده از آن‌ها محدود شده است. در این راستا تلاش‌های گسترده‌ای از جمله استفاده از داربست‌های سه بعدی، برای رفع این محدودیت انجام شده است(۱). از بین داربست‌های مذکور Demineralized Bone Matrix (DBM)، به عنوان بافت آلوگرافت، داربستی استخوانی است که بخش ترکیبات معدنی ماتریکس خارج سلولی آن تحت تاثیر اسید حذف شده است و ماتریکس کلاژن که ارگانیک است و برخی فاکتورهای رشد مثل پروتئین‌های مورفوژنیک استخوان در آن باقی مانده است(۳، ۲).

علاوه بر استفاده از داربست‌های سه بعدی، برخی ترکیبات نیز موجب توسعه این سلول‌ها می‌شوند. نیکوتین آمید یا NAM($C_6H_6N_2O$) شکلی از ویتامین B_3 است که در غذاها یافت می‌شود. این ماده در سال ۱۹۳۵ کشف شد و از آن زمان به عنوان یک مکمل غذایی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نیکوتین آمید یکی از انواع مهارکننده‌های هیستون داستیلاز است و مهارکننده آنزیم‌هایی است که از نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید(NAD^+) برای فعالیتشان استفاده می‌کنند(مانند آنزیم سرتوئین که یک هیستون داستیلاز وابسته به NAD است)، بنابراین به صورت مستقیم در کنترل عملکرد میتوکندری، متابولیسم سلولی و تولید انرژی دخالت دارد(۶-۴). مطالعه‌ها نشان داده است که سلول‌های بنیادی خونساز تحت تاثیر ریز محیط خود بوده و ریز محیط نقشی اساسی در تعیین سرنوشت این سلول‌ها و جهت‌گیری آن‌ها به سوی خاموشی، خود نوسازی و یا تمایز بازی می‌کند(۷). در مطالعه‌ای نشان داده شده که افزودن نیکوتین آمید به سایتوکاین‌های مؤثر در خونسازی، فراوانی افزایش یافته‌ای از سلول‌های $CD34^+$ $CD38^-$ و کاهش سلول‌های متعهد به یک رده خاص را همراه داشته است. هم چنین این سلول‌ها افزایش مهاجرت به سمت SDF-1 (stromal cell–derived factor1) و در واقع افزایش لانه گزینی در مغز استخوان را نشان داده‌اند(۸). نتایج مطالعه‌های هورویتز و همکارانش تاثیر نیکوتین آمید را بر توسعه سلول‌های بنیادی خونساز نشان داده است(۹). از طرف دیگر، در مطالعه‌ای که توسط تان و همکارانش صورت گرفت، مشاهده شد که استفاده از داربست استخوان اسفنجی همراه با استئوبلاست‌های متمایز شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSC)، در ازدیاد HSCها و حفظ حالت تمایز نیافته آن‌ها، تاثیر قابل توجهی دارد(۱۰). به این ترتیب در این مطالعه توسعه سلول‌های بنیادی خونساز تحت تاثیر نیکوتین آمید بررسی و با استفاده از داربست سه بعدی طبیعی DBM، شرایط کشت به شرایط داخل بدن نزدیک شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی مداخله ای بود.

تهیه خون بند ناف:

خون بند ناف با دریافت رضایت‌نامه کتبی از مادران هنگام زایمان تهیه شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف با استفاده از روش Magnetic-activated cell sorting (MACS) جداسازی شدند.

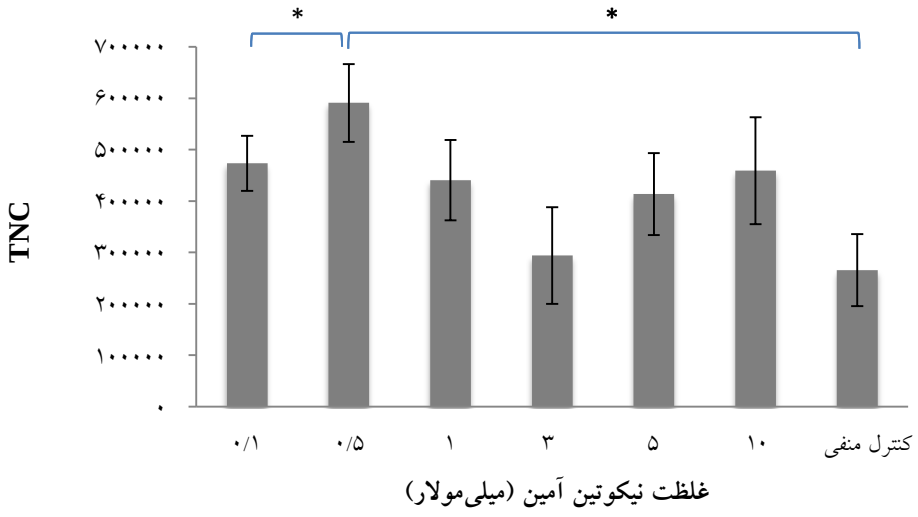
جداسازی HSC ها از خون بند ناف:

جداسازی این سلول‌ها با استفاده از روش MACS صورت گرفت. در این روش آنتی‌بادی‌های CD34 که به ذرات آهن کونژوگه هستند، در میدان مغناطیسی سبب ماندن سلول‌ها در ستون می‌شوند و در ادامه با خارج کردن ستون از میدان مغناطیسی، می‌توانیم سلول‌های $CD34^+$ را جداسازی کنیم.

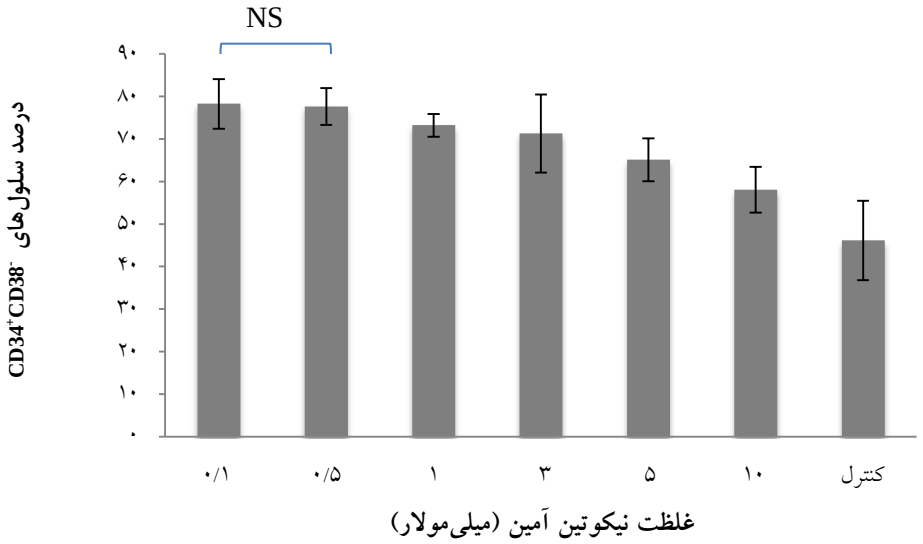
تعیین غلظت مناسب نیکوتین آمید:

جهت یافتن غلظت مناسب نیکوتین آمید مورد استفاده، ۶ غلظت ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۳، ۵، ۱۰میلی‌مولار آماده شد و HSCها به مدت ۷ روز در محیط کشت stem span همراه

Downloaded from bloodjournal.ir at 22:58 +0330 on Saturday February 17th 2018



نمودار ۱: مقایسه نتایج شمارش سلول‌های هسته‌دار پس از ۷ روز در غلظت‌های مختلف $p < ۰/۰۵$ *



نمودار ۲: مقایسه نتایج درصد خلوص سلول‌های $CD34^+$ پس از ۷ روز در غلظت‌های مختلف

NS:None Significant

با غلظت‌های مختلف از نیکوتین آمید کشت شدند. نتیجه شمارش سلول‌های هسته‌دار(TNC) و درصد خلوص سلول‌های $CD34^+$ پس از ۷ روز در نمودارها نشان داده شده است(نمودارهای ۱ و ۲).

آماده‌سازی بستر سه بعدی:

به علت این که سلول‌ها باید به DBM متصل می‌شدند، در ابتدا DBM با کلاژن کوت شد. جهت تنظیم اسیدیته DBM ، pH محلول بایستی به حدود ۷ برسد، به همین منظور با استفاده از محلول NaOH ۰/۱ مولار با تیتراسیون، مقدار pH حدود ۷ تنظیم شد.

کشت سلول‌ها:

تعداد ۱۵۰ هزار HSC به هر DBM که در خانه‌های پلیت‌های ۴۸ خانه قرار داده شده بود، اضافه گردید و سلول‌ها به مدت ۷روز در DBMها در محیط stem span و

Downloaded from bloodjournal.ir at 22:58 +0330 on Saturday February 17th 2018

در شرایط مختلف به شرح زیر کشت شدند:

- کنترل منفی(بدون هیچ افزودنی)
- سایتوکاین های(stem cell factor (SCF و Thrombopoietin (TPO) (هر یک ۵۰ ng/L)
- نیکوتین آمید ۰/۵ میلی مولار
- نیکوتین آمید + سایتوکاین

شمارش سلولی:

پس از ۷ روز با پیپتاژ سلول‌های کشت داده شده از داربست DBM جدا شدند. سپس شمارش این سلول‌ها توسط دستگاه شمارشگر سلولی انجام گرفت.

تعیین خلوص سلول‌های جدا شده:

جهت بررسی فنوتیپ سلول‌های $CD34^+$ پس از جداسازی از خون بند ناف و هم چنین پس از کشت در DBM ، فلوسایتومتری انجام شد. قبل از افزودن سلول‌ها به DBM و هم چنین پس از جداسازی آن‌ها از DBM در روز ۷، به دو میکروتیوب هر یک حدود ۲۰ هزار سلول اضافه گردید. به یک لوله به عنوان ایزوتایپ کنترل، IgG_1 موشی متصل به FITC و PE و به لوله دیگر دو آنتی‌بادی CD34 متصل به PE (داکو، دانمارک) و CD38 متصل به FITC (داکو، دانمارک) افزوده گردید. در نهایت با دستگاه فلوسایتومتری آنالیز صورت گرفت.

آپوپتوز:

جهت بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها، میزان آپوپتوز HSCها با استفاده از کیت Annexin-PI بررسی شد. در روز صفر برای HSCهای جدا شده و در روز ۷ برای هر یک از گروه‌ها به این صورت عمل گردید که به دو میکروتیوب هر یک ۲۰ هزار سلول اضافه شد. یک لوله unstain و به لوله دیگر Annexin و PI اضافه شده و نتایج با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری خوانده شد.

بررسی توانایی کلنی‌زایی(HSC (CFU assayها پس از کشت:

آزمایش سنجش کلنی جهت بررسی خصوصیات عملکردی HSCها در روز صفر و ۷ انجام گرفت. در این آزمایش از محیطی نیمه جامد استفاده شد که حاوی انواع سایتوکاین‌های مورد نیاز برای تمایز به انواع رده‌های خونی بود. این آزمایش به ترتیب زیر انجام شد:

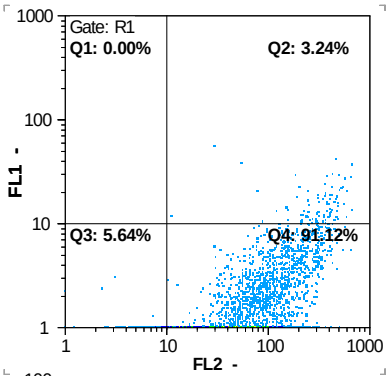
تعداد ۱۰۰۰ سلول شمارش و به ۳ میلی‌لیتر محیط متوکالت اضافه شد. محیط متوکالت حاوی سلول‌ها توسط سرنگ در دیش‌های مخصوص CFU ریخته شد. سپس این دیش‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ قرار داده می‌شدند. پس از ۱۴روز، کلونی‌ها بررسی و شمارش گردیدند. تجمعات حاوی ۵۰ سلول یا بیشتر به عنوان کلنی تلقی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات حاصله تحت آزمون آنوا انجام شد. مقادیر $p< ۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

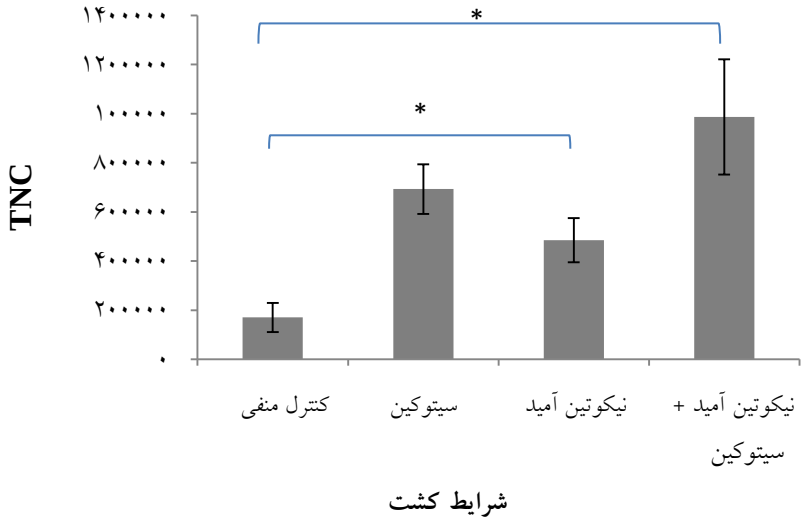
تعیین درصد خلوص سلول‌های $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف:

برای تعیین خلوص سلول‌های $CD34^+$ از آنتی‌بادی‌های ضد شاخص‌های CD34 و CD38 استفاده شد. طبق آنالیز فلوسایتومتری، به طور میانگین ۷/۱ ± ۸۸/۳ درصد از سلول‌ها $CD38^-CD34^+$ بودند(شکل ۱).

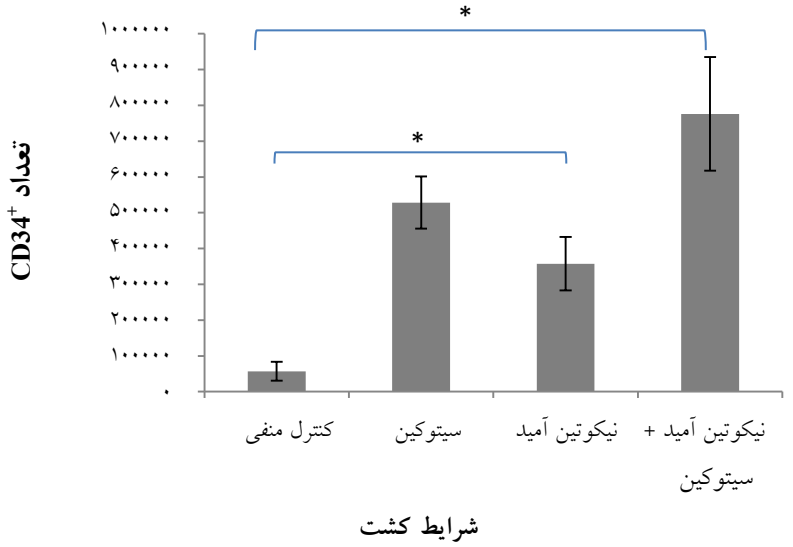


نمودار ۳: گراف فلوسایتومتری خلوص سلول‌های $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف. محور X سلول‌های $CD34^+$ و محور Y سلول‌های $CD38^+$ را نشان می‌دهد.

Downloaded from bloodjournal.ir at 22:58 +0330 on Saturday February 17th 2018



نمودار ۴: میزان تکثیرکل سلول‌های جدا شده پس از ۷ روز کشت در شرایط مختلف. ۰/۰۵ > p *

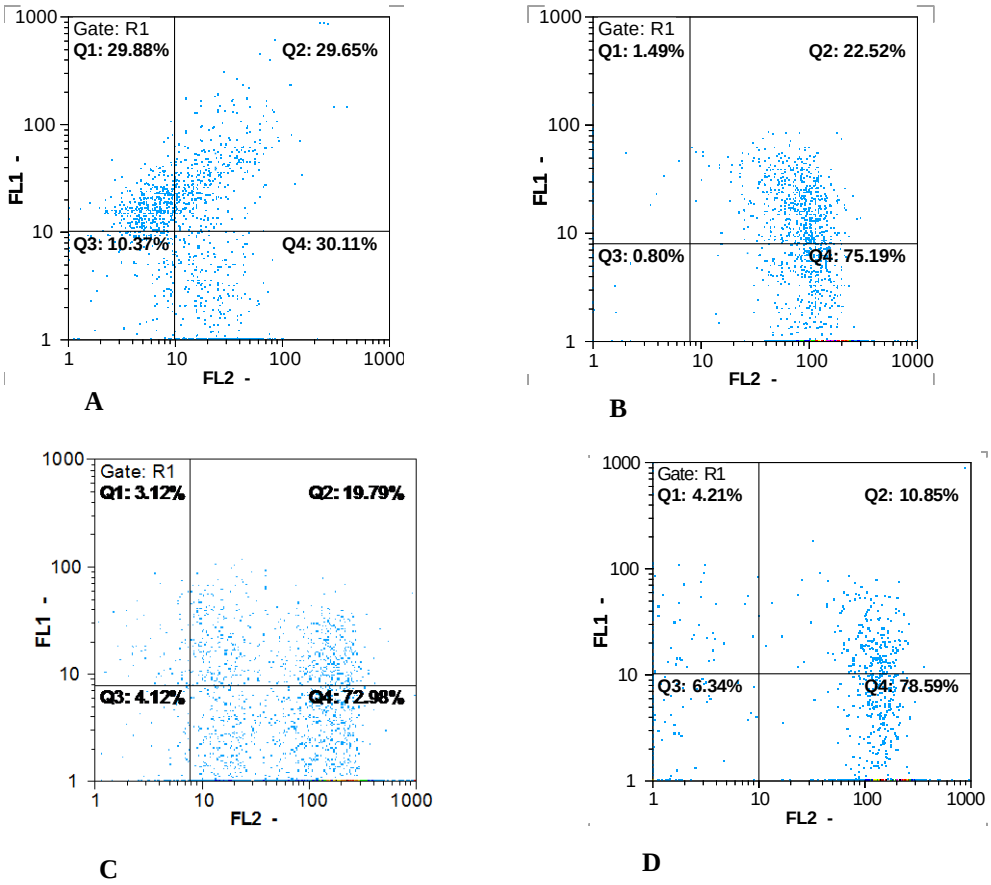


نمودار ۵: میزان تکثیرسلول‌های $CD34^+$ پس از ۷ روز کشت در شرایط مختلف. ۰/۰۵ > p *

تعیین غلظت نیکوتین آمید:

در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار، بیشترین تعداد سلول‌های هسته‌دار (TNC) مشاهده شد که با توجه به تفاوت معنادار این گروه با گروه کنترل و هم چنین با در نظر گرفتن درصد سلول‌های $CD34^+$ در این گروه، این غلظت به عنوان غلظت مناسب در تجربیات در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که درصد سلول‌های $CD34^+$ در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۵ ، بالاترین رقم را داشت که به دلیل عدم تفاوت معنادار بین این دو گروه و هم چنین افزایش معنادار TNC در گروه ۰/۵ میلی‌مولار، این غلظت با اطمینان انتخاب شد.

Downloaded from bloodjournal.ir at 22:58 +0330 on Saturday February 17th 2018



شکل ۱: نتایج فلوسایتومتری شاخص‌های CD34-PE و CD38-FITC در شرایط مختلف کشت. A :کنترل منفی B : سایتوکاین C : نیکوتین آمید D : نیکوتین آمید + سایتوکاین. محور X سلول‌های $CD34^+$ و محور Y سلول‌های $CD38^+$ را نشان می‌دهد.

شمارش سلولی و ارزیابی میزان تکثیر سلولی:

تعداد کل سلول‌های هسته‌دار جدا شده(TNC) در پایان روز هفتم کشت در تمامی مواردی که محیط کشت حاوی نیکوتین آمید+ سایتوکاین و یا نیکوتین آمید به تنهایی بود، افزایش معنادار را نشان داد(نمودارهای ۴ و ۵).

بررسی ایمونوفنوتایپ HSCها پس از هم کشتی:

برای HSC ها در روز صفر و روز ۷ فلوسایتومتری شاخص‌های CD34-PE و CD38-FITC بررسی شد. درصد میانگین بیان مارکر سطحی CD34 در روز صفر ۷/۱ ± ۸۸/۳ درصد بود. در روز هفتم درصد بیان مارکر CD34 در شرایط مختلف کشت متفاوت بود. گراف‌های زیر میزان بیان مارکرها ی CD34 و CD38 را در شرایط مختلف کشت نشان می‌دهد. گراف‌ها مربوط به یکی از نتایج فلوسایتومتری برای هر گروه است(شکل ۱).

بررسی میزان آپوپتوز HSCها پس از هم کشتی:

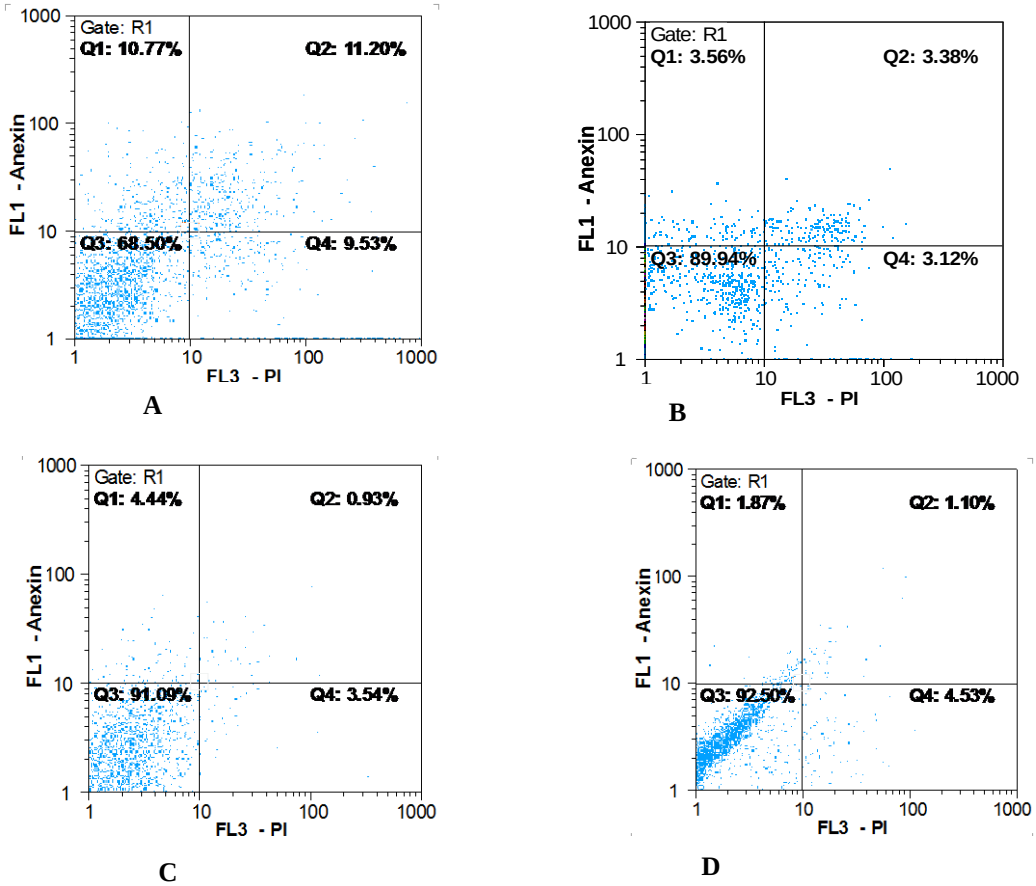
غیر از گروه‌های کنترل، بیش از ۹۰٪ از سلول‌ها، وارد فاز آپوپتوتیک نشده بودند. تعداد سلول‌های زنده حاصل آزمایش آپوپتوز در تعداد مطلق سلول‌ها بود. نتایج یکی از گروه‌ها در شکل آمده است(شکل ۲).

بررسی توان کلنی‌زایی HSC ها:

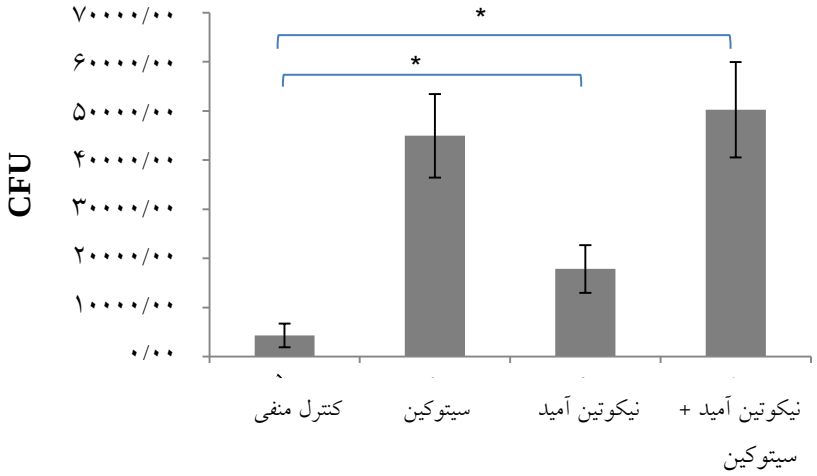
به منظور بررسی توان کلنی‌زایی سلول‌های جدا شده، تعداد ۱۰۰۰ سلول در محیط متوکالت کشت شدند. کلنی‌های ایجاد شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس شمارش شدند.

توان کلنی‌زایی سلول‌های تکثیر شده پس از ۷ روز کشت در شرایط مختلف، از طریق شمارش تعداد کلنی‌های ایجاد شده در محیط متوکالت مورد ارزیابی قرار گرفت.

Downloaded from bloodjournal.ir at 22:58 +0330 on Saturday February 17th 2018



شکل ۲ : مقایسه میزان آپوپتوز در شرایط مختلف کشت. A : کنترل منفی B : سایتوکاین C : نیکوتین آمید D : نیکوتین آمید+ سایتوکاین.



نمودار ۶: مقایسه کلنی‌زایی در شرایط مختلف کشت. ۰/۰۵ > p *

Downloaded from bloodjournal.ir at 22:58 +0330 on Saturday February 17th 2018

افزودن نیکوتین آمید هم در همراهی با سایتوکاین و هم به تنهایی سبب افزایش معنادار کلنی‌زایی شد ($p< ۰/۰۵$) (نمودار ۶).

بحث

تلاش‌های گسترده‌ای برای رفع محدودیت استفاده از خون بند ناف جهت پیوند سلول‌های بنیادی خونساز انجام شده است که از آن جمله می‌توان به تلاش برای توسعه تعداد این سلول‌ها با استفاده از مواد مختلف اشاره کرد که یکی از این مواد، مهارکننده‌های هیستون داستیلاز است(۱). نیکوتین آمید، یکی از مهارکننده‌های هیستون داستیلاز است. این ماده مهارکننده سرتوئین(کوآنزیم: NAD^+) است. زیر گروه SIRT1 از این خانواده که در واقع یک هیستون داستیلاز است با داستیلاسیون ریشه لیزین هیستون‌ها موجب فشردگی کروماتین شده که در این شرایط امکان رونویسی از آن نمی‌باشد. نیکوتین آمید این عملکرد را مختل کرده و منجر به هایپراستیلاسیون هیستون‌ها شده و بیان ژن‌های مربوط به تکثیر این سلول‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد(۱۴-۱۱). از طرفی طی توسعه HSCهای بند ناف در کشت، DNA آن‌ها دچار هایپر متیلاسیون می‌شوند. مهار کننده‌های متیلاسیون DNA که یکی از انواع آن‌ها مهار کننده‌های داستیلاسیون هیستون‌ها(والپوریک اسید، ۵-آزا-۲-دئوکسی سیتیدین و نیکوتین آمید) هستند، بر کاهش هایپرمتیلاسیون ژن‌های تنظیم کننده در هماتوپوئز مؤثر هستند. در نتیجه برای کاهش متیلاسیون ژن ها و هم چنین استیلاسیون آن‌ها که هر دو سبب افزایش بیان ژنی می‌شود، در این مطالعه از نیکوتین آمید برای توسعه HSCها استفاده شد.

یکی از علل هایپرمتیلاسیون HSCها، عدم وجود ریز محیط مناسب طی کشت است. شواهد حاکی از آن است که یک ساختار سه بعدی برای تقلید شرایط فیزیولوژیکی سلول‌ها در *ex vivo* مهم و ضروری به نظر می‌رسد(۱۶، ۱۵، ۱) به همین جهت در این مطالعه HSCها در داربست DBM کشت شدند.

در این مطالعه مشاهده شد که افزودن نیکوتین آمید هم به تنهایی و هم همراه با سایتوکاین به محیط کشت، شمارش کلی سلول‌ها و شمارش سلول‌های $CD34^+$ را در مقایسه با گروه کنترل، به طور معناداری افزایش داد ولی بهترین نتیجه از همراهی نیکوتین آمید با سایتوکاین حاصل شده است که سبب افزایش ۵/۶ برابری سلول های $CD34^+$ و ۶/۵ برابری TNC شد. افزودن نیکوتین آمید و سایتوکاین به محیط کشت سبب شد خلوص سلول‌های $CD34^+$ افزایش یافته و در مقایسه با گروه‌های دیگر، سلول‌های کمتری تمایز یابند. هم چنین گروه‌های کشت شده با نیکوتین آمید و سایتوکاین کمترین میزان آپوپتوز را داشتند که این موضوع تایید کننده شرایط زیست بهتر در حضور نیکوتین آمید می‌باشد. در نتایج CFU، در میان گروه‌های کشت شده، بیشترین تعداد کلنی مربوط به کشت HSCها همراه با سایتوکاین و نیکوتین آمید بود که افزایش ۳ برابری وجود داشت.

پیش از این در مطالعه‌های دیگری از نیکوتین آمید و سایتوکاین جهت توسعه استفاده شده بود. زیرا نیکوتین آمید علاوه بر توسعه HSC های بند ناف، مانع هایپر متیلاسیون DNA این سلول‌ها می‌شود(۱).

در مطالعه پلد و همکارانش، HSCها سه هفته در دو گروه نیکوتین آمید + سایتوکاین و سایتوکاین به تنهایی کشت شدند. در گروهی که حاوی نیکوتین آمید و سایتوکاین بود TNC، سلول‌های $CD34^+$ و هم چنین کلنی‌زایی افزایش قابل توجهی داشتند، ضمن آن که تعداد سلول‌های تمایز یافته در مقایسه با گروه حاوی سایتوکاین به طور معناداری کاهش داشت(۸). افزایش بیشتر تعداد سلول‌ها و کلنی‌ها در مطالعه پلد نسبت به این مطالعه، ممکن است به علت مدت زمان کشت در مطالعه پلد(که سه برابر این مطالعه بود) و هم چنین ترکیب سایتوکاینی که حاوی TPO ، SCF ، IL-6 و FLT3-L بود، باشد در حالی که ترکیب سایتوکاینی در مطالعه حاضر تنها حاوی SCF و TPO بود.

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶ ، برای توسعه HSCها از داربستی از جنس استخوان استفاده شد و سایتوکاین یا ماده دیگری به محیط کشت اضافه نشد ولی نتایج حاکی از

Downloaded from bloodjournal.ir at 22:58 +0330 on Saturday February 17th 2018

افزایش معنادار HSCها در مقایسه با کشت دو بعدی بود (۱۷). به صورت خلاصه آن چه در این مطالعه ملاحظه شد، تاثیر قابل ملاحظه نیکوتین آمید و سایتوکاین بر توسعه و کلنی‌زایی و کاهش میزان آپوپتوز سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک بود.

نتیجه‌گیری

نیکوتین آمید و سایتوکاین بر توسعه و کلنی‌زایی سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک مؤثر بوده و سبب افزایش زنده‌مانی این سلول‌ها و افزایش خلوص سلول‌های $CD34^+$ شدند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با حمایت مالی مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تهران و با کد اخلاق IR.IMI.REC.1394.23 می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان مقاله از حمایت‌های این مؤسسه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1- Park B, Yoo KH, Kim C. Hematopoietic stem cell expansion and generation: the ways to make a breakthrough. Blood Res 2015; 50(4): 194-203.
2- Chung HJ, Hur JW, Ryu KS, Kim JS, Seong JH. Surgical Outcomes of Anterior Cervical Fusion Using Deminaralized Bone Matrix as Stand-Alone Graft Material: Single Arm, Pilot Study. Korean J Spine 2016; 13(3): 114-9.
3- Tilkeridis K, Touzopoulos P, Ververidis A, Christodoulou S, Kazakos K, Drosos GI. Use of demineralized bone matrix in spinal fusion. World J Orthop 2014; 5(1): 30-7.
4- Frei GM, Persi N, Lador C, Peled A, Cohen YC, Nagler A, *et al*. Nicotinamide, a form of vitamin B3, promotes expansion of natural killer cells that display increased *in vivo* survival and cytotoxic activity. Blood 2011; 118(21): 4035.
5- Peled T, Shoham H, Aschengrau D, Yackoubov D, Frei G, Nagler A, *et al*. Nicotinamide, a Recognized Inhibitor of SIRT1, Promotes Expansion in Ex Vivo Cultures of Short and Long-Term Repopulating Cells. Blood 2009; 114(22): 2431.
6- Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. J Biol Chem 2002; 277(47): 45099-107.
7- Mortera-Blanco T, Mantalaris A, Bismarck A, Aqel N, Panoskaltsis N. Long-term cytokine-free expansion of cord blood mononuclear cells in three-dimensional scaffolds. Biomaterials 2011; 32(35): 9263-70.
8- Peled T, Shoham H, Aschengrau D, Yackoubov D, Frei G, Rosenheimer N, *et al*. Nicotinamide, a SIRT1 inhibitor, inhibits differentiation and facilitates expansion of hematopoietic progenitor cells with enhanced bone marrow homing and engraftment. Exp Hematol 2012; 40(4): 342-55.
9- Horwitz ME, Chao NJ, Rizzieri DA, Long GD, Sullivan KM, Gasparetto C, *et al*. Umbilical cord blood expansion with nicotinamide provides long-term multilineage engraftment. J Clin Invest 2014; 124(7): 3121-8.
10- Tan J, Liu T, Hou L, Meng W, Wang Y, Zhi W, *et al*. Maintenance and expansion of hematopoietic stem/progenitor cells in biomimetic osteoblast niche. Cytotechnology 2010; 62(5): 439-48.
11- Imai SI, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. Nature 2000; 403(6771): 795-800.
12- Mantel C, Broxmeyer HE. SIRT1, stem cells, aging, and stem cell aging. Curr Opin Hematol 2008; 15(4): 326.
13- Bari S, Seah KKH, Poon Z, Cheung AMS, Fan X, Ong S-Y, *et al*. Expansion and homing of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells for clinical transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2015; 21(6): 1008-19.
14- Xie J, Zhang C. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. Sci China Life Sci 2015; 58(9): 839-53.
15- Jones PL, Veenstra GCJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, *et al*. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet 1998; 19(2): 187-91.
16- Jing D, Fonseca A-V, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, *et al*. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells-modeling the niche compartments *in vitro*. Haematologica 2010; 95(4): 542-50.
17- Huang X, Zhu B, Wang X, Xiao R, Wang C. Three-dimensional co-culture of mesenchymal stromal cells and differentiated osteoblasts on human bio-derived bone scaffolds supports active multi-lineage hematopoiesis *in vitro*: Functional implication of the biomimetic HSC niche. Int J Mol Med 2016; 38(4): 1141-51.

Downloaded from bloodjournal.ir at 22:58 +0330 on Saturday February 17th 2018

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2018; 14(4): 295-304

Original Article

The investigation of CD34$^+$cord blood stem cells expansion in DBM scaffold under the influence of nicotinamide

Haj Ali Asgari M.[1], Nikougoftar Zarif M.[1], Soleimani M.[2], Shahabi M.[1]

[1]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.*
[2]*Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

The low number of umbilical cord blood cells is an important barrier to successful bone marrow transplantation. Therefore, the growth of these cells while maintaining their functional characteristics is of great importance. Culturing cells on 3D scaffolds like DBM has greatly contributed to the simulation of the mechanical and chemical micro-environment of the bone marrow tissue. There are also specific compounds for proliferation without differentiation of cells one of which is nicotinamide.

Materials and Methods

In this experimental study, hematopoietic stem cells (HSCs) were cultured 7 days in DBM under the following conditions of (1) negative control, (2) cytokine, (3) nicotinamide, (4) nicotinamide and cytokine. After 7 days, cell count, purity using flow cytometry, colony forming unit assay and apoptosis were evaluated and performed. The data were analyzed using Anova.

Results

Our results indicated that in all cases, the combination of nicotinamide and cytokine was accompanied with more proliferation, more CD34$^+$ cells, less apoptosis, and higher colony-forming ability than other groups.

Conclusions

Nicotinamide is a very suitable compound for the development of umbilical cord blood cells given the role of the former in preventing epigenetic changes that are the outcome of laboratorial cell culture and the simulation of bone marrow niche by DMB.

Key words: Hematopoietic Stem Cell, Nicotinamide, Umbilical Cord

Received: 2 Aug 2017
Accepted: 27 Sep 2017

Correspondence: Nikougoftar Zarif M., PhD of Hematology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601575; Fax: (+9821) 88601576
E-mail: *Nikougoftar@ibto.ir*