خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۴ شماره ۴ زمستان ۹۶ (۳۱۳-۳۰۵)

مقاله پژوهشی

تاثیر نوروپپتید Y بر تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف

سوسن مرادی نسب[۱]، علی‌اکبر پورفتح‌اله[۲]، کامران عطاردی[۳]

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 نوروپپتید 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 (SCF، TPO، FLT3 L) به عنوان گروه کنترل و در شرایط تیمار شده با غلظت۱ میکرومولار نوروپپتید Y علاوه بر سایتوکاین به عنوان آزمون انجام پذیرفت. در روز ۷ تعداد تام سلول‌های هسته‌دار و سلول‌های $CD34^+$ محاسبه گردید. قدرت کلنی‌زایی سلول‌های تزاید 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 $CD34^+$ تیمار شده با نوروپپتیدY در مقایسه با گروه کنترل شد. مشاهده انواع کلنی‌های مختلط، میلوئیدی و اریتروئیدی در آزمون CFU نشان‌دهنده حفظ قدرت تمایزی سلول‌های تکثیر یافته $CD34^+$ به انواع رده‌های خونی بود. سلول‌های تکثیر شده با نوروپپتید Y قدرت کلنی‌زایی در کشت طولانی مدت را حفظ کرده بودند.

نتیجه گیری

مطالعه ما نشان داد نوروپپتید 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، نوروپپتیدY

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۷
تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۱

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD ایمونولوژی ـ استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- 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: 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 همین طور با توجه به این که تا سالیانی نه 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(۲، ۱). 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 عمدتا 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 تاثیر عواملی قرار می‌گیرند که در تعیین سرنوشت آن‌ها مؤثر است. یکی از این عوامل تاثیرات 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 اسیدآمینه 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 تاتموتو 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(۱۱-۹). دوز دارویی آن می‌تواند اثر درمانی برای نوروپاتی عصبی و عدم کارآیی 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).

هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر نوروپپتید Y بر تکثیرآزمایشگاهی سلول بنیادی خونساز واحد خون بند ناف بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی طی سه مرحله مشتمل بر بررسی بیان گیرنده‌های نوروپپتید Y، تعیین دوز مناسب نوروپپتید Y بر تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز و نحوه تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز تیمار شده با نوروپپتید 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 $CD34^+$ با روش فلوسیتومتری ارزیابی شد. به منظور بررسی نحوه بیان گیرنده‌های نوروپپتید Y از سلول‌های $CD34^+$ با خلوص بیش از ۹۰٪ استفاده شد. RNA سلول‌های $CD34^+$ با استفاده از ترایزول 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 توجه به بیان زیر تیپ‌های ۱ و ۵ نوروپپتید در اغلب سلول‌های ایمنی، برای تایید بیان این دو گیرنده نوروپپتید Y در سلول‌های بنیادی خونساز، آزمون Conventional PCR با استفاده از توالی آغازگرهای گیرنده‌های زیر تیپ ۱ و ۵ نوروپپتید Y و ژن خانه‌دار *GAPDH* (به عنوان کنترل) انجام گرفت(جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 پلیمراز با استفاده از ژل آگارز ۲٪ مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین دوز مناسب نوروپپتید Y، مجدداً جداسازی سلول‌های $CD34^+$ صورت گرفت. شمارش تام سلول‌های تک هسته‌ای به وسیله لام نئوبار انجام شد. در این مرحله به منظور تعیین خلوص سلول‌های $CD34^+$ و سلول‌های $CD38^-$ به روش فلوسیتومتری، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی(حاوی 10^4 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_1-FITC/PE (شرکت BD) بر علیه سلول‌های موشی جهت شناسایی و حذف باندهای غیراختصاصی اضافه شد.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده برای PCR

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

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 تزاید یافته در مقایسه با گروه کنترل انتخاب شد.غلظت‌های مورد مطالعه ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میکرو مولار 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 سایتوکین(Cyto-NPY)

تکثیر سلول‌ها در هر دو شرایط به صورت تکرار سه‌تایی و در محیط کشت Stem span (شرکت استم سل تکنولوژیس) 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 تکنولوژیس) 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 میلی متری 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 ۱۴روز 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.

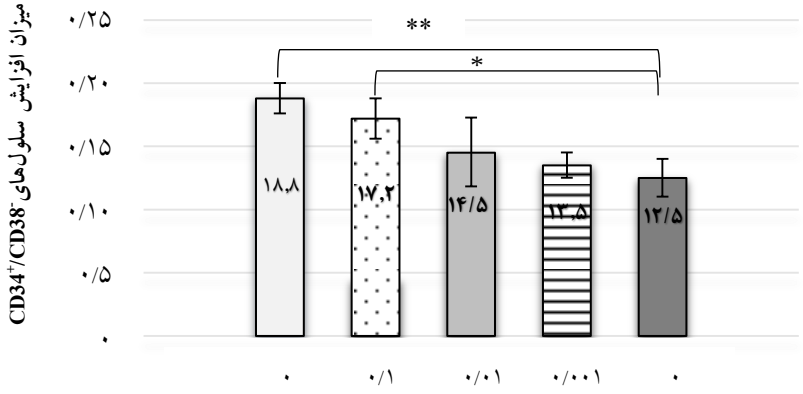
از نرم‌افزار SPSS ۱۶ و آزمایش آماری Paired sample t-Test جهت آنالیز داده‌ها استفاده شد. $p< ۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار درنظر گرفته شده است.

یافته‌ها

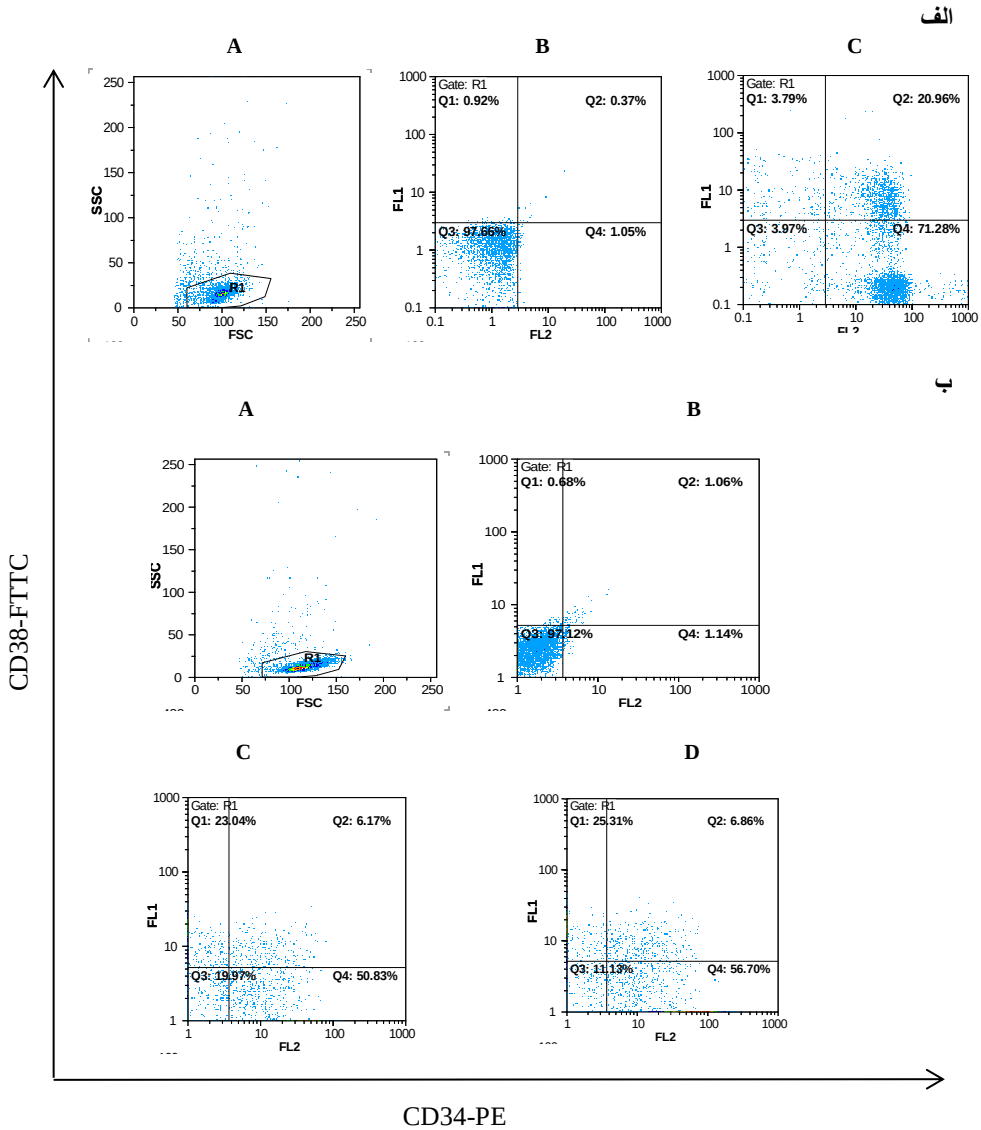
به منظور تایید حضور قطعه ژنی NPY1R و NPY5R ، روی cDNA تام استخراج شده از سلول بنیادی خونساز، PCR انجام شد. پس از انجام conventional PCR ، محصولات تکثیر شده از هر دوی گیرنده‌ها روی ژل منتقل و الکتروفورز شد. طول قطعه تکثیر شده مورد انتظار برای NPY 1R و NPY 5R به ترتیب ۱۳۸ و۱۴۶بود. باندی در محدوده bp ۱۴۶مشاهده 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).

همان طور 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 متاثر از افزایش غلظت نوروپپتید Y بوده و بیشینه تکثیر سلولی به میزان ۱۸/۸ برابر با $p< ۰/۰۰۲$ در برابر افزایش تکثیر سلولی به میزان ۱۷/۲ برابر با $p< ۰/۰۰۳$ 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 نئوبار انجام گرفت و از نظر ایمونوفنوتیپ با روش فلوسیتومتری بررسی شد. پس از یک هفته کشت سلول‌های $CD34^+$ در حضور و عدم حضور نوروپپتیدY، 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).



نمودار ۱: مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف نوروپپتید Y بر تکثیر سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ (* افزایش معنادار در سطح $p< ۰/۰۰۳$ ، ** افزایش معنادار در سطح $p< ۰/۰۰۲$)



شکل ۱: نتیجه بررسی فلوسیتومتری شاخص‌های CD34 و CD38 از نمونه بند ناف جداسازی شده روز صفر A: گراف نمایشگر پراکندگی سلولی، سلول‌های مونونوکلئار در گیت R_1 انتخاب شده‌اند. B: گراف نمایشگر اتصال با آنتی‌بادی ایزوتیپ کنترل کنژوگه با PE و C FITC: گراف نمایشگر اتصالات سلولی با دو آنتی‌بادی CD34-PE و CD38-FITC ب) نمایشی از بررسی فلوسیتومتری میزان تکثیر سلول‌های $CD34^+$ تیمار شده بعد از یک هفته کشت A: گراف نمایشگر پراکندگی سلولی، سلول‌های مونوکلئار در گیت R_1 انتخاب شده‌اند. B: گراف نمایشگر اتصال با آنتی‌بادی ایزوتیپ کنترل کنژوگه با PE و C FITC: گراف نمایشگر اتصالات سلولی گروه کنترل با دو آنتی‌بادی CD34-pE و D CD38-FITC: گراف نمایشگر اتصالات سلولی گروه تیمار با ۱ µM از نوروپپتید Y با دو آنتی‌بادی CD34-PE و CD38-FITC (میزان شاخص $CD34^+/CD38^-$ 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 ۳/۴۴ ± ۶۱/۷۳ بود.)

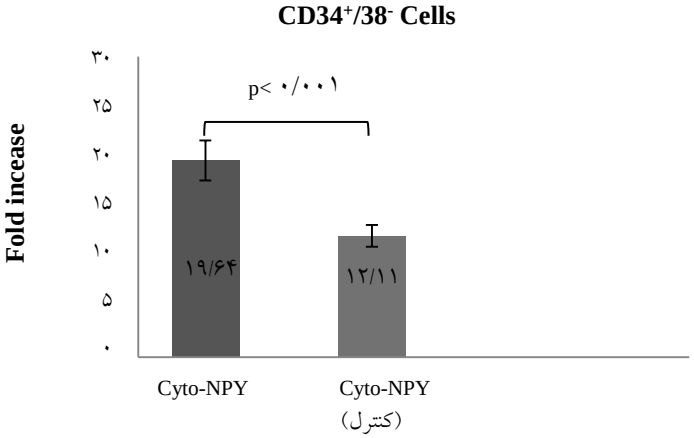
شکل ۱ نتایج بررسی فلوسیتومتری شاخص‌های CD34 و CD38 در روز صفر و پس از ۷ روز کشت را نشان می‌دهد.

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 (۱/۴۷ ± ۱۱/۲۴) بود($p< ۰/۰۰۱$). در مرحله بعد میزان تکثیر سلول‌های $CD34^{+}/38^{-}$ 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 $۱۰^{۳}$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).

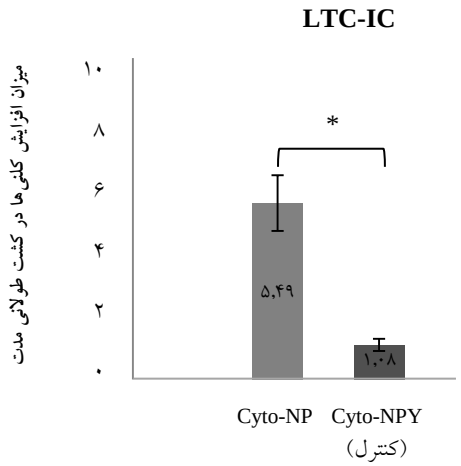
به منظور ارزیابی توان سلول‌های تکثیر شده در تولید کلنی در شرایط کشت طولانی مدت، از آزمون LTC-IC استفاده شد. نتایج این آزمون نشان از افزایش میزان قدرت کلنی‌زایی در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل داشت($p= ۰/۰۱$)(نمودار ۳).



نمودار ۲: مقایسه میزان افزایش سلول‌های $CD34^{+}/38^{-}$ 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 $۱۰^{۳}$ سلول می‌باشد. p value گروه‌های آزمایش نسبت به گروه کنترل محاسبه شده‌اند.

شرایط کشت	نمونه	$۱۰^{۳}$ 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	۸/۶۲ ± ۸۱/۶۶	۰/۸۵ ± ۱۳/۲۱	
Cytp-NPY (کنترل)	a	۵۱	۶/۴۲	***
	b	۸۳	۸/۸۴	
	c	۶۷	۶/۳۵	
	انحراف معیار ± میانگین	۱۱/۵۳ ± ۶۴	۱/۴۱ ± ۷/۲	



نمودار۳: مقایسه قدرت کلنی‌زایی گروه تیمار شده با نوروپپتید Y و گروه کنترل و کنترل در کشت طولانی مدت(LTC-IC)
(* افزایش معنادار در سطح ۰/۰۱ =p)

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 شده است. به تازگی از تاثیر NPY بر خود نوسازی سلول‌های بنیادی رویانی صحبت شده است. در مطالعه‌ای که توسط سان‌می 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. سان‌می خصوصیت پرتوانی سلول‌های بنیادی رویانی تکثیر یافته و توان تمایزی آن‌ها را مورد ارزیابی قرار داد. سلول‌ها توان تمایزیشان 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 تائید رسید. تکثیر سلول‌های $CD34^+$ با استفاده از تیمار کردن توسط نوروپپتید Y در پایان هفته اول نسبت به شرایط کشت

بدون تیمار کردن افـزایش چشـم‌گیـری نشـان داد. قـدرت کلنی‌زایی سلول‌های تکثیر شده به روش تیمار با نوروپپتیـد Y در مقایسه با روش کشت فاقد تیمار به صورت معناداری افزایش یافت.

افـزایش چشـمگیر سـلول‌هـای هسـته‌دار، سـلول‌هـای $CD34^+$ ، CFC-U و LTC-IC در تکثیر سلول‌ها بـا اسـتفاده از نوروپپتید Y در مقایسه با سایر روش‌ها مؤید این مطلـب است که سیستم عصـبی از طریـق نوروپپتیـد Y بـه خـوبی خودنوسازی سلول‌ها را حمایت می‌کند.

نتیجه‌گیری

با توجه بـه الگـوی افـت تعـداد سـلول‌هـای $CD34^+$ و خصوصاً CFC-U و LTC-IC ، می‌توان چنـین نتیجـه‌گیـری کرد که اثر تیمار کردن سلول‌های بنیادی با نوروپپتیـد Y در مقایسـه بـا فقـط سـیتوکین‌هـا جهـت تکثیـر و حفـظ خودنوسازی سلول‌های بنیادی خونساز، اثری مانـدگارتر و پایاتر است به این ترتیب و با توجه به مطالـب ارایـه شـده نوروپپتید Y می‌تواند به عنوان یک فاکتور مؤثر بر تکثیر در بازسازی مغز استخوان نقش داشته باشـد و هـم چنـین بـه عنوان یک مکمل در کشت سلول‌های بنیادی مورد اسـتفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایان‌نامـه کارشناسـی ارشـد مرکـز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشـی و پژوهشـی طـب انتقـال خون می‌باشد. بدین‌وسیله از مؤسسه به جهت حمایت مالی تشکر می‌گردد.

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, Shivtiel 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.

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2018; 14(4): 305-313

Original Article

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

Moradi-Nasab S.[1], Pourfathollah A.A.[1], Atarodi K.[1]

[1]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 µM NPY and cytokine as test group with cytokine as control group was performed . TNC number and $CD34^+$ cell number were calculated on day 7. Colony formation assay was performed in methylcelloluse 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 $CD34^+$ 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 $CD34^+$ 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*