Downloaded from bloodjournal.ir at 20:12 +0430 on Tuesday September 21st 2021

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۶ شماره ۲ تابستان ۸۸ (۱۰۵-۹۵)

مقاله پژوهشی

ویژگی‌های سلول‌های تکثیر شده خون بند ناف در حضور ترکیبات مختلف سیتوکاینی

بهاره بیکی[۱]، دکتر مرضیه ابراهیمی[۲]

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی خونساز در درمان بیماری‌های خونی، نارسایی‌های متابولیک و نقص‌های سیستم ایمنی موثرند. از آن جا که سلول‌های بنیادی خونساز در خون بند ناف قابلیت پیوند به فرد بالغ را ندارند، لذا دستیابی به روش‌هایی که با صرف هزینه کم به تکثیر سلول‌های بنیادی خون بند ناف بپردازند اهمیت دارد. در این مطالعه، پتانسیل تکثیر و تمایز سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بند ناف(MNC) و نیز ویژگی‌های سلول‌های تولید شده در حضور ترکیبات مختلف سیتوکاینی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع مداخله‌ای آزمایشگاهی بود. سلول‌های تک‌هسته‌ای(MNC) از خون بند ناف نوزادان با دوره کامل حاملگی که مادران آن‌ها به ظاهر سالم($HBs\ Ag^-$ ، $anti\text{-}HCV^-$ ، $anti\text{-}HBC^-$ و $anti\text{-}HIV^-$) و فاقد دیابت و یا فشار خون بارداری بودند، جدا شد و در مقادیر $۱/۵ \times ۱۰^۶$ سلول در حجم ۲ میلی‌لیتر محیط کشت IMDM حاوی ۱۰٪ FBS و ۵ نوع سیتوکاین IL-3 ، TPO ، GM-CSF ، SCF ، Flt-3 و در سه گروه FSGT3 ، FSGT و FST کشت شدند. به منظور بررسی ویژگی سلول‌های تکثیر شده، شمارش سلولی، ایمنوفنوتیپ سلول‌ها و قدرت کلنی‌زایی آن‌ها در گروه‌های مختلف و در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. برای مقایسه درون گروهی درهر گروه از آزمایش غیر پارامتریک ویلکوکسون و برای مقایسه بین گروهی از آزمایش غیر پارامتریک من‌ویتنی استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج این مطالعه نشان داد تمام ترکیبات سیتوکاینی مورد مطالعه قادر به تحریک تکثیر MNC در خون بند ناف به میزان ۵ برابر می‌باشند. اما تنها ترکیب Flt3L ، SCF و TPO قادر به تولید بیشتر سلول‌های تک هسته، سلول‌های $CD34^+$ و سلول‌های $CD34^+90^+38^-$ طی ۱۴ روز کشت می‌گردد. هم چنین تمام ترکیبات به کار رفته سبب تولید پیش‌سازهای میلوئیدی در کشت‌های طولانی مدت می‌شوند.

نتیجه گیری

در این مطالعه با استفاده از MNC خون بند ناف و سه ترکیب سیتوکاینی Flt3LT ، SCF و TPO ، روش مقرون به صرفه‌ایی برای کشت سلول‌های بنیادی خون بند ناف بدون استفاده از فرآیندهای خالص‌سازی ارایه شده است که با افزایش تولید هم زمان سلول‌های تک هسته، سلول‌های بنیادی $CD34^+90^+38^-$ ، پیش‌سازهای $CD34^+$ ، پیش‌سازهای میلوئیدی $CD34^+133^+$ و کلونی‌های گرانولوسیتی منوسیتی همراه است.

کلمات کلیدی: خون جنینی، سلول‌های بنیادی خونساز، سیتوکاین‌ها، اینترکولین ـ ۳، فاکتور محرک کلنی گرانولوسیت ماکروفاژی، TPO ، SCF

تاریخ دریافت : ۸۷/۳/۲۸
تاریخ پذیرش : ۸۸/۵/۱۷

۱ـ کارشناس ارشد بیولوژی تکوینی ـ گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی پژوهشکده علوم زیستی و فناوری سلول‌های بنیادی رویان
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی ـ گروه طب ترمیمی پژوهشکده علوم زیستی و فناوری سلول‌های بنیادی رویان ـ صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵

Downloaded from bloodjournal.ir at 20:12 +0430 on Tuesday September 21st 2021

مقدمه

خونسازی، فرآیندی است که سبب تولید روزانه ۴۰۰ بیلیون سلول بالغ خونی در یک فرد متوسط می‌گردد(۱). به عبارت دیگر، تمام سلول‌های در گردش خون در انسان از جمعیت کوچکی از سلول‌های بنیادی (HSC) (Hematopoietic Stem Cell) و پیش‌سازهای خونساز (HPC) (Hematopoietic Progenitor Cell) منشاء می‌گیرند. سلول‌های بنیادی خونساز واجد خواص خود نوسازی و توانایی تمایز حداقل به ۸ رده خونی را دارا می‌باشند(۲). خون بند ناف که در جفت و بند ناف جریان دارد، غنی از پیش‌سازهای خونساز اولیه و سلول‌های بنیادی قابل پیوند می‌باشد که به عنوان منبعی برای پیوندهای آلوژنیک و درمان بیماری‌های بدخیم و غیر بدخیم مورد توجه قرار گرفته است. با این وجود، کاربرد این سلول‌ها در پیوند به بیماران به علت حجم کم خون و تعداد سلول‌های آن، محدود به کودکان با وزن ۲۰ کیلوگرم شده است(۴، ۳). در نتیجه تکثیر این سلول‌ها در آزمایشگاه در شرایطی که خواص بنیادی آن‌ها حفظ گردد، از اهداف مهم درمانی در نظر گرفته می‌شود(۶، ۵).

مطالعه‌ها نشان داده‌اند که خونسازی در بدن توسط سیگنال‌های مولکولی و ریز محیط سلولی تنظیم می‌گردد. پیام‌دهی مولکولی بین سلول‌ها، عمدتاً توسط عوامل بیرونی چون سلول‌های استرومایی و سیتوکاین‌های مترشحه از سلول‌ها فراهم می‌شود(۷). سیتوکاین‌ها ترکیبات گلیکوپروتئینی هستند که بر اساس سلول هدف، غلظت و حضور سایر ترکیبات سیتوکاینی موجود در محیط، اثرات متفاوتی را بر سلول‌ها اعمال می‌کنند(۹، ۸).

هم چنین علاوه بر آن که یک سیتوکاین می‌تواند انواع متفاوتی از سلول‌ها را تحت تاثیر قرار دهد، سلول‌های متفاوت نیز به هنگام تکثیر و یا تحریک توسط عوامل موجود در ریز محیطشان، توانایی تولید سیتوکاین‌های متنوعی را دارند که می‌تواند اثر سیتوکاین‌های موجود در کشت را تقویت و یا تضعیف کند. به عبارت دیگر اثرات خونسازی بسیار پیچیده بوده و ردیابی تاثیر یک سیتوکاین خاص و یا ترکیبی از آن‌ها در تکثیر و یا تمایز بسیار مشکل می‌باشد(۹).

به این ترتیب انتخاب درست نوع سلول و نوع و ترکیب سیتوکاین به منظور دست‌یابی به بهترین نتیجه، ضروری به نظر می‌رسد. از میان سلول‌های موجود در خون بند ناف، در بیشتر مطالعه‌ها از سلول‌های $CD34^+$ و یا $CD133^+$ به منظور تکثیر استفاده شده است(۱۳-۱۰). مطالعات کمی وجود دارند که سلول‌های ناخالص تک هسته‌ای را برای تکثیر استفاده کرده باشند(۱۶-۱۴).

از میان سیتوکاین‌ها نیز فاکتور رشد سلول‌های بنیادی(SCF) (Stem Cell Factor) و Flt-3 (Fms Related Tyrosine Kinase 3) بیشترین تاثیر را در تکثیر و ازدیاد سلول‌های $CD34^+$ و یا $CD133^+$ دارند، هم چنین فاکتور محرک کلنی گرانولوسیت - ماکروفاژی(GM-CSF) که به عنوان فاکتور رشد سلول‌های سفید خون عمل می‌کند، خانواده اینترلوکین‌ها و از جمله اینترلوکین ۳ و ۶ (IL-3, 6) که تحریک کننده رشد سلول‌های رده لنفوئیدی هستند و نیز ترومبوپویتین(TPO) که تولید و تمایز مگاکاریوسیت‌ها را القا می‌کند، از جمله سیتوکاین‌های مؤثر در تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز و پیش‌سازهای خونی هستند(۱۹-۱۷).

هم چنین از سیتوکین‌های G-CSF ، IL-7 ، IL-4 و LIF نیز برای تکثیر و تمایز سلول‌های هماتوپویتیک استفاده می‌شود(۲۲-۲۰).

علی‌رغم مطالعه‌های گسترده در زمینه تکثیر سلول‌های بنیادی خون بند ناف، مطالعه‌های کمی در زمینه بررسی ویژگی سلول‌های تکثیر شده در حضور ترکیبات مختلف سیتوکاینی صورت گرفته است. علاوه بر این، اکثر مطالعه‌ها بر روی سلول‌های بنیادی خالص شده از مغز استخوان و یا خون بند ناف انجام شده است.

از آن جا که خالص‌سازی سبب از دست رفتن بسیاری از پیش‌سازهای اولیه خونساز می‌گردد که می‌توانند در تولید ریز محیط سلولی مناسب برای تکثیر سلول‌های بنیادی مؤثر باشند، لذا در این مطالعه، از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بند ناف بدون انجام مراحل خالص‌سازی استفاده گردید و اثر ترکیبات متفاوت سیتوکاینی بر کشت این سلول‌ها و نیز ویژگی سلول‌های حاصل از نظر فنوتیپ و خواص کلون‌زایی مورد بررسی قرار گرفت.

Downloaded from bloodjournal.ir at 20:12 +0430 on Tuesday September 21st 2021

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع مداخله‌ای آزمایشگاهی بود.

۱- جداسازی و کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف:

خون گیری از بند ناف نوزادان مادران به ظاهر سالم (HBs Ag- ، anti-HCV- ، anti-HBC- و anti-HIV-) با دوره کامل حاملگی(n =۴) توسط کیسه‌های خونگیری حاوی ماده ضد انعقاد CPDA (شرکت بعثت) صورت گرفت. به منظور حذف گلبول‌های قرمز، خون کامل با هیدروکسی اتیل استارچ به نسبت ۱ میلی‌لیتر HES به ۵ میلی‌لیتر خون مخلوط گردید و مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف(UCB-MNC) با استفاده از شیب غلظت لنفودکس(آلمان) جدا گردید(۲۲).

از آن جا که سلول‌های بنیادی و پیش‌سازهای سلول‌های خونساز واجد انواع متفاوتی از رسپتورها بوده و هم چنین میانکنش سیتوکاین‌های متفاوت با یکدیگر و با رسپتورهای سلولی اثرات هم‌افزایی و یا بازدارندگی اعمال می‌نمایند، لذا فرمولاسیون سیتوکاین‌های خونساز برای رسیدن به یک تکثیر مطلوب ضروری است.

در این مطالعه ۵ سیتوکاین که در تکثیر سلول‌های بنیادی و پیش‌سازهای خونی مؤثرند شامل؛ SCF و Flt3L برای بقای سلول‌های بنیادی و نیز تکثیر آن‌ها ضروری بوده و مانع آپوپتوز در پیش‌سازها می‌گردد، IL-3 که از عوامل مؤثر خونسازی است، GM-CSF که یک فاکتور رشد وسیع‌الطیف است و سبب تکثیر پیش‌سازهای ماکروفاژی، گرانولوسیت، دندریتیک و اریتروئیدی می‌شود و TPO که از سیتوکاین‌های قوی در تمایز مگاکاریوسیت‌ها است مورد استفاده قرار گرفتند(۲۶-۲۳).

سیتوکاین‌های(۱۰۰ ng/ml) Flt3L ، (۱۰۰ ng/ml) SCF، (۵۰ ng/ml) GM-CSF ، (۱۰ng/ml) IL-3 و (۵۰ ng/ml) TPO از شرکت R&D (آمریکا، Systems) خریداری گردید. میزان ۲ میلی‌لیتر از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بند ناف(۱/۵ × ۱۰^۶ /ml) در محیط کشت IMDM (آمریکا، سیگما) حاوی ۱۰٪ FBS (آلمان، جیبکو) در پلیت‌های ۱۲ خانه‌ایی و در سه گروه متفاوت ۵ سیتوکاینی، FSG3T حاوی ستیوکاین‌های Flt3L ، SCF ، GM-CSF ، IL-3 و TPO ، گروه ۴ سیتوکاینی، FS3T شامل Flt3L ، SCF ، IL3 و TPO و گروه ۳ سیتوکاینی، FST شامل Flt3L ، SCF و TPO به مدت ۲۱ روز کشت شدند(۱۷).

سلول‌ها در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ توسط لام نئوبار شمارش شدند و درصد زنده بودن سلول‌ها، فنوتیپ و خاصیت کلون‌زایی در هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط سلول‌ها هر ۲ روز تعویض شد و پس از رسیدن به انباشتگی مناسب، سلول‌ها در چاهک‌های جدید پاساژ داده شدند.

۲- بررسی ایمنوفنوتیپ سلول‌های تک هسته‌ایی تکثیر شده:

برای تعیین درصد سلول‌های بنیادی خونساز و سایر رده‌های تمایز یافته، از فلوسایتومتری و آنتی‌بادی‌های ضد شاخص پیش‌سازهای لنفوئیدی CD38 (بیوساینس) ، شاخص پیش‌سازهای میلوئیدی CD133 (بکتون دیکینسون) و شاخص سلول‌های بنیادی CD90 ، CD34 (داکو) کونژوگه با FITC ، PE و PE-Cy5 استفاده شد. بدین منظور ۵ × ۱۰^۴ سلول از هر گروه برداشته و با آنتی‌بادی‌های مورد نظر به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ °C انکوبه شدند. نتایج رنگ‌آمیزی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری(آلمان، پارتک :PAS III) به صورت دو رنگی و سه رنگی آنالیز شدند.

۳- سنجش قدرت کلنی‌زایی:

برای تعیین قدرت تشکیل کلونی، ۲ × ۱۰^۴ سلول در ۲ میلی‌لیتر محیط نیمه جامد(کانادا، MethoCult GF H4434) به هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای اضافه گردید. تعداد کلونی‌های اریتروئیدی(CFU-E) ، گرانولوسیت ـ ماکروفاژی(CFU – GM) و اریتروئید ـ گرانولوسیت ـ ماکروفاژی(CFU ـ Mix) پس از ۱۴ روز کشت، توسط میکروسکوپ نوری معکوس در هر گروه مورد بررسی قرار گرفتند(۲۷). به منظور بررسی محتویات سلولی در هر کلونی، با استفاده از میکروسکوپ نوری، تعدادی از کلونی‌ها برداشته و توسط رنگ رایت ـ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند.

Downloaded from bloodjournal.ir at 20:12 +0430 on Tuesday September 21st 2021

۴ـ آنالیز داده‌ها:

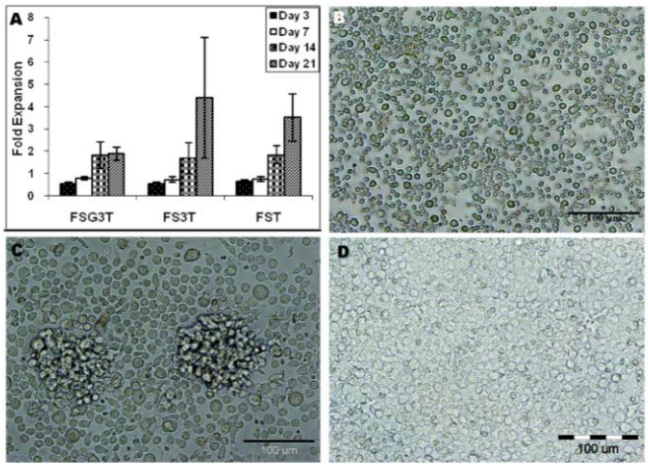
برای مقایسه درون گروهی بین روزهای مختلف در هر گروه از آزمایش غیر پارامتریک Wilcoxon Signed Ranks و برای مقایسه بین گروهی از آزمایش غیر پارامتریک Mann-Whithney استفاده شد و p< ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

۱- ترکیب Flt3L ، SCF و TPO سبب افزایش تعداد سلول‌های هسته‌دار و سلول‌های $CD34^+$ طی ۲۱ روز کشت می‌گردد:

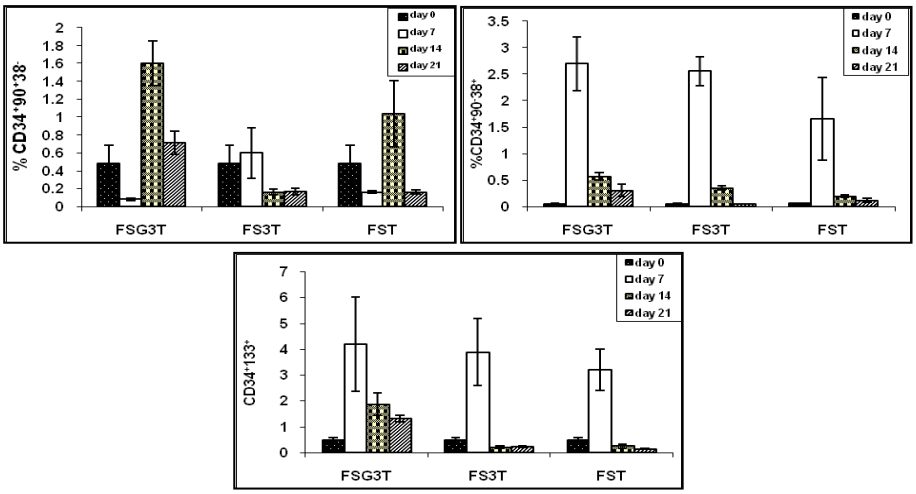
مشاهدات میکروسکوپی و نتایج شمارش سلولی در همه گروه‌ها نشان داد که ۳/۱۸٪ ± ۷۷/۴٪ از سلول‌ها طی سه روز ابتدایی کشت، از دست می‌روند(p< ۰/۰۵). سلول‌های باقیمانده در کشت، کروی بوده و از اندازه‌ای کوچک برخوردار بودند و در میان آن‌ها سلول‌هایی به اشکال برگی و یا بی‌شکل نیز دیده می‌شد(شکل B ۱). افزایش زمان کشت به ۱۴ روز، سبب ۰/۴ ± ۴/۵۹ برابر شدن تعداد کل سلول‌های هسته‌دار در همه گروه‌ها نسبت به روز سوم کشت گردید(p< ۰/۰۳)(شکل A ۱). تعداد سلول‌های $CD34^+$ نیز به ترتیب ۱/۴۹ ± ۴/۷ برابر در گروه FSG3T ، ۱/۱۶ ± ۲/۹۲ برابر در گروه FS3T و ۱/۷۰ ± ۴/۵۸ برابر در گروه FST نسبت به روز ۳ گردید(داده‌ها نشان داده نشدند). افزایش زمان کشت به ۲۱ روز نشان داد که تعداد سلول‌ها تنها در گروه FST افزایش می‌یابد(p= ۰/۰۲۴) و در گروه‌های FSG3T و FS3T ، اختلاف معنی‌داری بین تعداد سلول‌ها در روز ۱۴ و ۲۱ مشاهده نگردید(شکل A ۱). بررسی تعداد سلول‌های $CD34^+$ نیز در این زمان نشان داد که تعداد این سلول‌ها در گروه FSG3T ، ۰/۰۸ ± ۰/۳۱ برابر، در گروه FS3T ۰/۳۱ ± ۰/۹۸ برابر و در گروه FST ۰/۱۶ ± ۱/۱۹ برابر نسبت به روز ۱۴ می‌گردد و اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده می‌گردد(p< ۰/۰۱).

هم چنین بررسی مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری دو نوع سلول را طی کشت نشان داد، گروهی که با تشکیل اجتماعات سلولی و کلونی تکثیر می‌شدند(شکل C ۱) و گروه دیگری که به صورت منفرد و بدون تشکیل کلونی تکثیر می‌شدند(شکل D ۱). تعداد کلونی‌ها و اندازه آن‌ها با افزایش زمان کشت به ۲۱ روز افزایش یافت. هم چنین تعداد کلونی‌های تکثیری در گروه‌های FSG3T و FS3T بیش از گروه FST بود(داده‌ها نشان داده نشده‌اند).



شکل ۱: افزایش تعداد سلول‌ها در گروه‌های FSG3T, FS3T و FST طی روزهای متفاوت کشت(A). مورفولوژی سلول‌های تک هسته‌ای پس از ۳ روز کشت(B)، کلونی‌های تکثیر شونده در روز ۱۴ کشت در گروه FS3T (C) و سلول‌های تکثیر شونده منفرد در روز ۱۴ کشت در گروه FST(D). بزرگنمایی تصویرB ، ۱۰X و تصاویر C و D، ۲۰X می‌باشد. F=Flt3L, S=SCF, G=GM-CSF, 3=IL-3, T=TPO

Downloaded from bloodjournal.ir at 20:12 +0430 on Tuesday September 21st 2021



شکل ۲: درصد سلول‌های بنیادی خونساز($CD34^+90^+38^-$)(A)، پیش‌سازهای لنفوئیدی($CD34^+90^-38^+$)(B) و پیش‌سازهای میلوئیدی ($CD34^+133^+$) (C) در حضور ترکیبات سیتوکاینی متفاوت.
F=Flt3L, S=SCF, G=GM-CSF, 3=IL-3, T=TPO

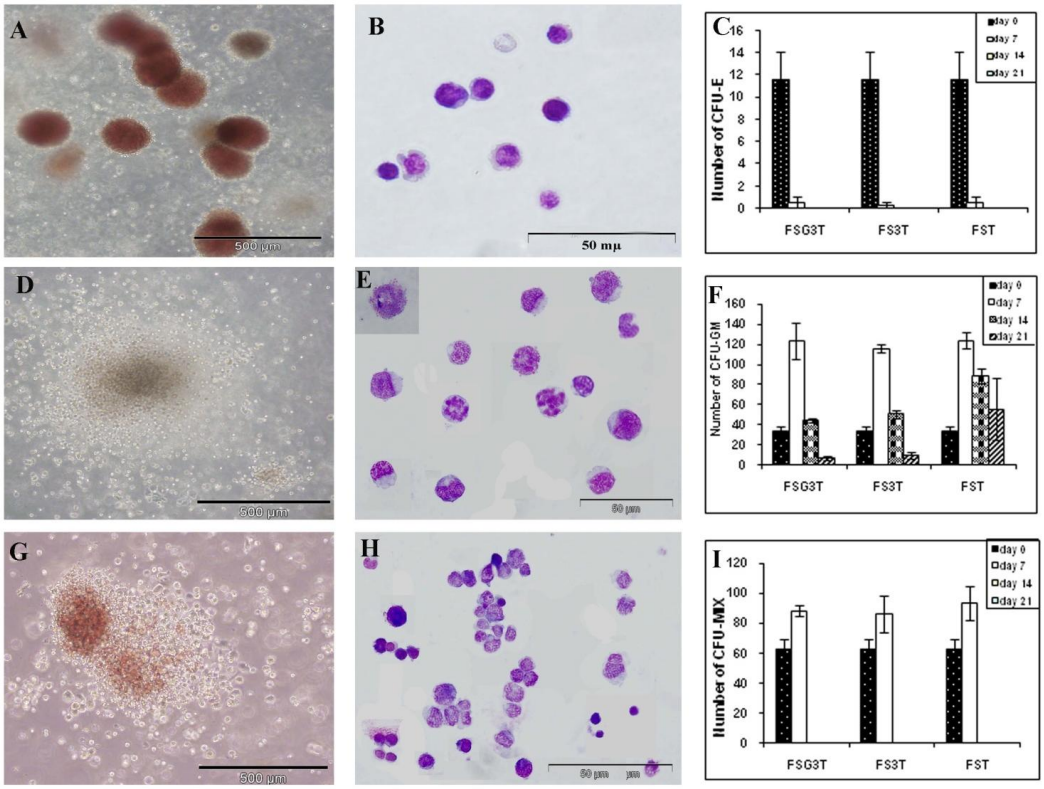
۲ـ سه ترکیب سیتوکاینی Flt3L ، SCF و TPO سبب تولید مقادیر زیاد سلول‌های بنیادی خونساز اولیه($CD34^+90^+38^-$) در کشت سلول‌های تک هسته‌ایی خون بند ناف می‌شود.

برای بررسی درصد سلول‌های بنیادی و پیش‌سازهای خونساز(رده میلوئیدی و لنفوئیدی) در هر گروه، آنالیز سه رنگی و دو رنگی با استفاده از آنتی‌بادی‌های کونژوگه به FlTC ، PE و PE-Cy5 توسط دستگاه فلوسیتومتری انجام گرفت. به این ترتیب سلول‌های $CD34^+90^+38^-$ به عنوان سلول‌های بنیادی خونساز اولیه، سلول‌های $CD34^+90^-38^+$ به عنوان پیش‌ساز رده لنفوئیدی و سلول‌های $CD34^+133^+$ به عنوان پیش‌سازهای میلوئیدی در نظر گرفته شد(شکل ۲). مقایسه نسبت سلول‌های $CD34^+90^+38^-$ به $CD34^+90^-38^+$ نشان داد که این نسبت به ترتیب در گروه FST و FSG3T بیش از گروه FS3T است(به ترتیب ۵/۲۵ ، ۲/۸۰ و ۰/۴۵)(p< ۰/۰۰۱ و p< ۰/۰۱). مقایسه نسبت سلول‌های $CD34^+90^+38^-$ به $CD34^+133^+$ در روز ۱۴ نیز نشان داد که این نسبت در گروه FST بیش از دو گروه دیگر است(۰/۸۵ در گروه FSG3T ، ۰/۸۰ در گروه FSG3T و ۴/۱۶ در گروه FST)(p< ۰/۰۲). بررسی نسبت رده میلوئیدی به لنفوئیدی نیز نشان داد که گروه FSG3T و سپس FST بیشترین تمایز را به سمت رده میلوئیدی(به ترتیب ۳/۲۸ و ۱/۲۵)(p< ۰/۰۵) و گروه FS3T بیشترین تمایز را به سمت رده لنفوئیدی(p= ۰/۰۳) داشته‌اند. درصد سلول‌های NK($CD16^+/56^+$) و سلول‌های T ($CD3^+$) نیز در تمام گروه‌ها طی ۲۱ روز کشت، کاهش نشان دادند که این کاهش در سلول‌های T بیشتر از سلول‌های NK مشاهده شد و در عوض درصد سلول‌های منوسیتی/ماکروفاژی($CD14^+$) افزایش معنی‌داری را نشان داد که ماکزیمم افزایش در روز ۲۱ کشت مشاهده گردید (p< ۰/۰۵)(داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

۳ـ ترکیبات متفاوت از سیتوکاین‌های Flt3L ، SCF ، GM-CSF ، IL-3 و TPO در کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف سبب تولید کلونی‌های گرانولوسیتی ـ ماکروفاژی(CFU-GM) می‌گردد:

به منظور بررسی توان ایجاد کلونی در روزهای مختلف کشت، از آزمایش سنجش کلونی بر روی محیط نیمه جامد استفاده شد، هم چنین سلول‌ها در هر کلونی برداشته شد و توسط رنگ‌آمیزی رایت ـ گیمسا بررسی گردید(شکل ۳). تعداد کل کلونی‌ها(CFC) در تمام گروه‌ها تا روز ۷ تفاوت معنی‌داری نشان نداد(p< ۰/۰۵)، اما در

Downloaded from bloodjournal.ir at 20:12 +0430 on Tuesday September 21st 2021



شکل۳: سنجش توانایی تشکیل کلونی در محیط نیمه جامد به مدت ۱٤ روز. نمایی از کلونی اریتروئیدی[CFU-E](A)، کلونی گرانولوسیت-مونوسیت[CFU-GM] (D) و کلونی مختلط[CFU-Mix](G)، رنگ‌آمیزی سلول‌ها در هر کلونی(B، E و H) و مقایسه گروه‌های مختلف در زمان‌های ۰، ۷،۱۴ و۲۱ کشت از نظر توان تشکیل کلونی‌های اریتروئیدی، گرانولوسیتی - مونوسیتی و مختلط(F،C و I).

F=Flt3L, S=SCF, G=GM-CSF, 3=IL-3, T=TPO

کشت‌های طولانی مدت، تعداد کلونی‌های تشکیل شده در گروه FST بیش از دو گروه دیگر بود(p= ۰/۰۳)(تعداد آن در روز ۱۴ به ترتیب ۸۸ در گروه FST ، ۵۰ در گروه FS3T و ۴۴ در گروه FSG3T و در روز ۲۱ به ترتیب ۹/۵۵ و ۶ بود). این اختلاف ناشی از افزایش تعداد CFU-GM در گروه FST بود. به عبارت دیگر در تمام گروه‌ها، توان تشکیل CFU-E و CFU-Mix پس از روز ۷ مشاهده نگردید(شکل ۳ C, F, I). رنگ‌آمیزی سلول‌ها با استفاده از رنگ رایت گیمسا نیز تایید کننده نوع کلونی بود(شکل ۳ B, E, H).

بحث

تلاش‌های اخیر محققان هماتولوژی، یافتن راه‌هایی است که بتوان سلول‌های بنیادی خونساز را با دستکاری در محیط کشت به تعداد زیاد و با حفظ تمامی خصوصیاتشان به عنوان یک سلول بنیادی خونساز تکثیر کرد تا بتوان آن را در کلینیک و ژن درمانی مورد استفاده قرار داد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که پتانسیل تکثیر سلول‌های بنیادی خون بند ناف به فاکتورهای درونی و بیرونی وابسته است. ریز محیط سلولی، سلول‌های استرومایی، سلول‌های همراه و سیتوکین‌ها از جمله عوامل بیرونی هستند که در تکثیر و ازدیاد سلول‌های بنیادی نقش مهمی دارند(۲۹، ۲۸). از آن جا که استفاده از سلول‌های خالص در کابردهای بالینی ضروری است، امروزه از انواع مختلف سلول‌های خالص CD34+ و CD133+ که از منابع مختلف به دست آمده‌اند و مخلوط سیتوکاین‌های متفاوت برای تکثیر سلول‌های خونساز استفاده می‌کنند(۳۱، ۳۰).

خالص‌سازی سلول‌ها، منجر به تهی شدن و تخلیه سلول‌های همراه و سلول‌های CD34- ، نیز تهی‌سازی

Downloaded from bloodjournal.ir at 20:12 +0430 on Tuesday September 21st 2021

سیستم‌های کشت از فاکتورهای تغذیه‌ای و تغییر در لاکتات و pH محیط می‌گردد که در بازسازی جمعیت سلول‌های خونی در کشت‌های طولانی مدت و افزایش پتانسیل کلون‌سازی پیش‌سازهای اولیه و نیز تمایز سلولی ضروری هستند(۳۳، ۳۲). لذا در مطالعه از سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف بدون انجام مراحل خالص‌سازی برای تکثیر در حضور ترکیبات متفاوت سیتوکاین‌های IL-3 ، GM-CSF ، FLT3L ، SCF و TPO استفاده گردید. از آن جا که انتخاب مخلوط مناسب ستوکاین‌ها که تعیین کننده ریز محیط سلول‌ها نیز می‌باشند، اثر تعیین کننده‌ای در سرنوشت سلول‌های بنیادی دارند، لذا در این مطالعه اثر مخلوط‌های متفاوت سیتوکاینی بر جمعیت ناخالص تک هسته‌ای خون بند ناف مورد ارزیابی قرار گرفت تا به این سؤالات پاسخ داده شود، ۱ـ آیا سیتوکاین‌های متفاوت در تعیین سرنوشت سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف مؤثرند؟ ۲ـ چه ترکیب سیتوکاینی سبب تکثیر بهینه سلول‌های تک هسته‌ای با حفظ خواص بنیادینگی می‌گردد؟ ۳ـ سلول‌های تکثیر شده در حضور ترکیبات متفاوت سیتوکاینی چه ویژگی دارند و به کدام رده خونی تمایز می‌یابند؟

برای پاسخ به سؤالات فوق سه ترکیب سیتوکاینی انتخاب گردید: گروه FSG3T شامل ۵ سیتوکاین Flt3L ، SCF ، GM-CSF ، IL-3 و TPO ، گروه FS3T شامل چهار سیتوکاین Flt3L ، SCF ، IL-3 و TPO و گروه FST شامل سه سیتوکاین Flt3L ، SCF و TPO . غلظت سیتوکاین‌ها در تمام گروه‌ها مشابه انتخاب شد. کاهش ۷۰٪ تا ۸۰٪ از جمعیت سلولی، طی ۳ روز ابتدایی کشت حاکی از آن است که این سیتوکاین‌ها توانایی حفظ سلول‌های تمایز یافته و پیش‌سازهای متعهد را ندارند، اما تمام ترکیبات سیتوکاینی انتخاب شده قادر به تکثیر سلول‌های باقیمانده در کشت و حفظ این تکثیر تا روز ۲۱ می‌باشند. از سوی دیگر، حضور جمعیت‌های سلولی که به صورت منفرد و یا به صورت کلونی تکثیر می‌نمایند نیز می‌تواند نشانگر حرکت به سمت تمایز یا حفظ خواص بنیادینگی سلول‌ها باشد. به عبارت دیگر در هفته اول کشت که سلول‌ها به صورت منفرد تکثیر می‌شوند و یا در گروه FST که در روز ۱۴ نیز سلول‌های منفرد به مقادیر زیاد در کشت مشاهده می‌شود، می‌تواند به علت وجود پتانسیل تکثیر(Proliferation) در این سلول‌ها باشد. در عوض افزایش تعداد و اندازه کلونی‌ها در کشت‌های طولانی مدت و خصوصاً در گروه FSG3T و یا FS3T می‌تواند ناشی از از دست رفتن قدرت تکثیر(Proliferation) و ورود به مرحله تمایز باشد که با افزایش پتانسیل تزاید(Expansion) همراه است. در مطالعه شیانگ نیز، ۲ نوع کشت به هنگام تکثیر سلول‌های خالص CD34+ مشاهده شد که شامل سلول‌های منفرد پراکنده، گرد و نیمه شفاف بود که طی هفته دوم کشت، مجموعه‌های سلولی در اندازه‌های مختلف را تشکیل می‌دادند، این نوع کشت مخصوص سلول‌هایی با شاخص CD34+CD38- و مجموعه سلول‌هایی با میزان کم و یا حتی فاقد سلول‌های پراکنده که مجموعه‌های سلولی بزرگ(کلونی) را تشکیل می‌دادند و از دسته CD34+CD38+ بودند و هم راستا با نتایج ایمنوفنوتیپ در این مطالعه وارد شدند(۳۴). هنگامی که این مجموعه‌ها و یا سلول‌های منفرد پراکنده رنگ شد، مشخص گردید که سلول‌های پراکنده بیشتر حاوی بلاست‌های اولیه هستند، در حالی که در مجموعه‌های سلولی، بیشتر دسته سلول‌های متعهد دودمانی دیده شد(۳۴). در این مطالعه مشخص گردید که هر ۳ ترکیب سیتوکاینی مورد مطالعه، توانایی افزایش تکثیر و ازدیاد سلول‌های تک هسته‌ای خونساز را دارا بوده و در تمام گروه‌ها بیشینه تکثیر سلول‌های هسته‌دار تا روز ۱۴ و به میزان ۵ برابر است که به علت سیتوکاین‌های افزوده شده به محیط می‌باشد. در حقیقت SCF و Flt3L که از جمله سیتوکاین‌های عمل کننده اولیه هستند، سبب بقای سلول‌های پیش‌سازی، ورود سلول‌های بنیادی به فاز S و تقسیم سلولی شده و نیز مانع آپوپتوز سلول‌های پیش‌ساز می‌شوند(۳۵). هم چنین GM-CSF ، TPO و IL-3 انسانی نیز بر سلول‌های پر توان اثر گذاشته و آن‌ها را از فاز G0 خارج می‌کنند و سبب تکثیر پیش‌سازهای متعهد خونی می‌شوند(۳۶). علی‌رغم افزایش تعداد سلول‌های هسته‌دار در همه گروه‌ها، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها از نظر افزایش تعداد سلول‌های CD34 مشاهده گردید. به این ترتیب که دو ترکیب FSG3T

Downloaded from bloodjournal.ir at 20:12 +0430 on Tuesday September 21st 2021

و FST سبب افزایش ۴/۵ برابری سلول‌های CD34 در روز ۱۴ شدند. حفظ تکثیر سلول‌ها تا روز ۲۱ و عدم کاهش تعداد آن‌ها می‌تواند به نوع ترکیب سیتوکاینی انتخاب شده و نیز حضور سلول‌های کمکی در محیط کشت به علت عدم خالص‌سازی سلول‌ها باشد. در مطالعه کوهلر در سال ۱۹۹۹، سلول‌های CD34+ خون بند ناف در حضور SCF ، FLt3L و IL-3 به همراه GMCSF ، IL-6 و EPO و در محیط عاری از سرم کشت شدند و میانگین سلول‌های تک هسته‌ای به میزان ۴/۲ برابر و سلول‌های CD34+ ۲۹ برابر افزایش یافت(۳۲). غلظت SCF ، FLT3L و GMCSF در این مطالعه ۳ برابر مطالعه ما بود. در مطالعه یانگ نیز که سلول‌های MNC در محیط IMDM حاوی سیتوکاین‌های TPO ، Flt3L ، SCF و IL-3 کشت شده بودند، تعداد سلول‌ها در روز ششم، ۰/۷ ± ۵/۸ و در روز هشتم، ۱ ± ۶/۹ برابر گردید در حالی که سلول‌های CD34 آن در روز ششم، ۰/۱۹ ± ۰/۱۱ برابر و در روز هشتم، صفر برابر شده بود(۳۷). از میان سه ترکیب مورد نظر، تنها ترکیب FST سبب حفظ خواص تکثیر سلول‌ها و نیز خواص بنیادینگی آن‌ها تا روز ۲۱ شده بود و از توان تشکیل کلونی بیشتری تا روز ۲۱ برخوردار بود. هم چنین تعداد بیشتری از سلول‌های $CD34^+90^+38^-$ را تا روز ۱۴ تولید نمود، که به نظر می‌رسد به دلیل فقدان سیتوکاین‌های تمایزی رده میلوئیدی (IL-3 ، GM-CSF) باشد. در حقیقت GM-CSF به عنوان فاکتور رشد سلول‌های سفید خون عمل کرده و IL-3 نیز مسؤول تکثیر و ازدیاد سلول‌های بنیادی خونساز و سلول‌های میلوئیدی مانند ماکروفاژها و ماست سل‌ها است(۹). در مطالعه‌ای که توسط یاماگوچی و همکارانش در سال ۲۰۰۰ و نیز فوجی‌موتو و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی سلول‌های $CD34^+$ صورت گرفت، ترکیب FLt3L ، SCF و TPO به عنوان مؤثرترین ترکیب در تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز معرفی گردید و نتایج مشابهی حاصل شد(۳۸، ۲۲، ۲۰، ۱۷). در مطالعه یائو نیز که از سلول‌های $CD34^+$ استفاده شده بود، ترکیب TPO ، IL-3 ، SCF و Flt3L به عنوان قوی‌ترین ترکیب سیتوکاینی در محیط کشت IMDM حاوی ۱۰٪ FBS گزارش شد. در مطالعه فوق گزارش شد که افزایش GM-CSF ، اثر بازدارنده بر تکثیر سلول‌های CD34 دارد اما تکثیر پیش‌سازها را تقویت می‌کند(۹). نتایج آن هم‌راستا با این مطالعه بود که نشان داد GM-CSF اثر بازدارنده بر روی پیش‌سازهای خونساز اعمال می‌نماید. در بسیاری از مقالات نیز ترکیب FLt3L ، SCF و IL-3 مهم‌ترین اثر را در تکثیر سلول‌های CD34 اعمال نمودند که مشابه یافته ما بر سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف بود(۴۰، ۳۹).

هم چنین درصد بیان شاخص سلول‌های تمایز یافته و خاصیت کلونی‌زایی سلول‌های کشت شده، نشان داد که سلول‌های تک هسته‌ای خون‌ساز در محیط کشت بیشتر تمایل به سمت رده میلوئیدی دارند تا لنفوئیدی(۴۱).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، روش مقرون به صرفه‌ای برای کشت سلول‌های بنیادی خون بند ناف بدون استفاده از فرآیندهای خالص‌سازی و از منبع ارزان قیمت خون بند ناف ارایه گردید و مشخص شد که حضور SCF ، Flt3L و TPO برای کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف کافی بوده و سبب افزایش تعداد سلول‌های تک هسته $CD34^+$، سلول‌های بنیادی $CD34^+90^+38^-$ ، پیش‌سازهای میلوئیدی $CD34^+133^+$ و کلونی‌های گرانولوسیتی ـ منوسیتی طی ۱۴ روز ابتدایی کشت می‌گردد که قابلیت استفاده در مطالعه‌های تمایزی را دارا هستند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات آقایان دکتر وثوق معاونت پشتیبانی پژوهشکده رویان، دکتر بهاروند مدیر گروه بخش سلول‌های بنیادی و دکتر شاهوردی معاونت پژوهشی پژوهشکده رویان که زمینه انجام این پروژه را در بخش تحقیقات پژوهشکده رویان فراهم آوردند کمال تشکر را می‌نماییم. هم چنین از آقای احسان جان زمین کارشناس بخش فلوسیتومتری پژوهشکده رویان، آقای دکتر ضرابی و کارکنان بانک خون بند ناف رویان که در اجرای پروژه ما را یاری نمودند، سپاسگزاریم. بخشی از این طرح با حمایت مالی مرکز امور زنان و خانواده نهاد ریاست جمهوری به انجام رسیده است.

Downloaded from bloodjournal.ir at 20:12 +0430 on Tuesday September 21st 2021

References :

1- McAdams TA, Winter JN, Miller WM, Papoutsakis ET. Hematopoietic cell culture therapies (Part II): Clinical aspects and applications. Trends Biotechnol 1996;14(10):388-96.
2- Danet GH, Lee HW, Luongo JL, Simon MC, Bonnet DA. Dissociation between stem cell phenotype and NOD/SCID repopulating activity in human peripheral blood CD34(+) cells after ex vivo expansion. Exp Hematol 2001; 29(12):1465-73.
3- Shih CC, Hu MC, Hu J, Weng Y, Yazaki PJ, Medeiros J, *et al*. A secreted and LIF-mediated stromal cell-derived activity that promotes ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. Blood 2000; 95(6): 1957-66.
4- Gilmore GL, DePasquale DK, Lister J, Shadduck RK. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34(+) hematopoietic stem cells. Exp Hematol 2000; 28(11): 1297-1305.
5- Broxmeyer HE. Cord blood as an alternative source for stem and progenitor cell transplantation. Curr Opin Pediatr 1995; 7(1): 47-55.
6- Rubinstein P. Why cord blood? Hum Immunol 2006; 67(6): 398-404.
7- Mayani H, Dragowska W, Lansdorp P. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. Blood 1993; 81(12): 3252-8.
8- Lebkowski JS SL, Okarma TB. Serum-free culture of hematopoietic stem cells. Stem Cells 1995;13: 607-12.
9- yao CL, Liu CH, Chu IM, Hsieh TB, Hwang SM. factorial desings combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells. enzym microb technol 2003; 33: 343-52.
10- Yamaguchi M, Hirayama F, Kanai M, Sato N, Fukazawa K, Yamashita K, *et al.* Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. Exp Hematol 2001; 29(2): 174-182.
11- Mao PZJ, Wang CX, Du qh. [In vitro expansion of cord blood CD133+ cells supported by bone marrow stromal cells and cytokines][Article in Chinese]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2007; 15(2): 319-23.
12- Yang S, Cai H, Jin H, Tan WS. Hematopoietic reconstitution of CD34(+) cells grown in static and stirred culture systems in NOD/SCID mice. Biotechnol Lett 2008; 30(1): 61-5
13- Madkaikar M, Ghosh K, Gupta M, Swaminathan S, Mohanty D. Ex vivo Expansion of Umbilical Cord Blood Stem Cells Using Different Combinations of Cytokines and Stromal Cells. Acta Haematol 2007; 118(3): 153-9.
14- Estrov Z, Huh YO, Ginsberg CF, Harris D, Van Q, Mirza NQ, *et al.* Ex vivo expansion of apheresis-derived peripheral blood hematopoietic progenitors. J Clin Apher 2002; 17(1): 7-16.
15- McNiece I, Harrington J, Turney J, Kellner J, Shpall EJ. Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. Cytotherapy 2004; 6(4): 311-7.
16- Paquette RL, Gonzales E, Yoshimura R, Tran L, Choi R, Baldwin G, *et al*. Ex vivo expansion and differentiation of unselected peripheral blood progenitor cells in serum-free media. J Hematother 1998; 7(6): 481-91.
17- Chivu M, Diaconu C, Bleotu C, Alexiu I, Brasoveanu L, Cernescu C. The comparison of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. J Cell Mol Med 2004; 8(2): 223-31.
18- Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KH, Sung KW, *et al*. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. Ann Hematol 2006; 85(4): 212-25.
19- Fujimoto N, Fujita S, Tsuji T, Toguchida J, Ida K, Suginami H, *et al.* Microencapsulated feeder cells as a source of soluble factors for expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells. Biomaterials 2007; 28(32): 4795-805.
20- Liu L, Sun Z, Chen B, Han Q, Liao L, Jia M, *et al*. Ex vivo expansion and in vivo infusion of bone marrow-derived Flk-1+CD31-CD34- mesenchymal stem cells: feasibility and safety from monkey to human. Stem Cells Dev 2006; 15(3): 349-57.
21- 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 Aastrom Replicell System. Blood 2003; 101(12): 5061-7.
22- da Silva CL, Gonçalves R, Lemos F, Lemos MA, Zanjani ED, Almeida-Porada G, *et al.* Modelling of ex vivo expansion/ maintenance of hematopoietic stem cells. Bioprocess Biosyst Eng 2003; 25(6):365-9.
23- Moore S, Haylock DN, Levesque JP, McDiarmid LA, Samels LM, To LB, *et al*. Stem cell factor as a single agent induces selective proliferation of the Philadelphia chromosome positive fraction of chronic myeloid leukemia CD34(+) cells. Blood 1998; 92(7): 2461-70.
24- Flores-Guzman P, Gutierrez-Rodriguez M, Mayani H. In vitro proliferation, expansion, and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. Arch Med Res 2002; 33(2): 107-14.
25- Lu X, Baudouin SV, Gillespie JI, Anderson JJ, Dickinson AM. A comparison of CFU-GM, BFU-E and endothelial progenitor cells using ex vivo expansion of selected cord blood CD133(+) and CD34(+) cells. Cytotherapy 2007; 9(3): 292-300.
26- Rossmanith T, Schroder B, Bug G, Muller P, Klenner T, Knaus R, *et al.* Interleukin 3 improves the ex vivo expansion of primitive human cord blood progenitor cells and maintains the engraftment potential of scid repopulating cells. Stem Cells 2001; 19(4): 313-20.
27- Almeida - Porada G , Brown RL , MacKintosh FR, Zanjani ED. Evaluation of serum-free culture conditions able to support the ex vivo expansion and engraftment of human hematopoietic stem cells in the human-to-sheep xenograft model. J Hematother Stem Cell Res 2000; 9(5): 683-93.
28- Mayani H , Dragowska W , Lansdorp P . Lineage

Downloaded from bloodjournal.ir at 20:12 +0430 on Tuesday September 21st 2021

commitment in human hemopoiesis involves asymmetric cell division of multipotent progenitors and does not appear to be influenced by cytokines. J Cell Physiol 1993; 157(3): 579-86.

29- Mayani H, Dragowska W, Lansdorp P. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. Blood 1993; 82(9): 2664-72.

30- Heimfeld S, Kalamasz DF, Fogarty BL, Fei R, Tsui ZN, Jones HM, *et al*. Isolation and ex vivo expansion of CD34+ cells from cord blood using dextran sedimentation and avidin column selection. Blood Cells 1994; 20(2-3): 397-403.

31- Yee GC. The future of cell therapy. Pharmacotherapy 1996; 16(3 Pt 2): 109S-115S.

32- Kohler T, Plettig R, Wetzstein W, Schaffer B, Ordemann R, Nagels H, *et al*. Defining optimum conditions for the ex vivo expansion of human umbilical cord blood cells. Influences of progenitor enrichment, interference with feeder layers, early-acting cytokines and agitation of culture vessels. Stem Cells 1999; 17(1): 19-24.

33- Goodell M, Rosenzweig M, Kim H, Marks D, DeMaria M, Paradis G, *et al*. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. Nat Med 1997; 3(12): 1337-45.

34- Huang S, Terstappen LW. Lymphoid and Myeloid Differentiation of Single Human CD34+, HLA-DR+, CD38- Hematopoietic Stem Cells. Blood 1994; 83(6): 1515-26.

35- Mohamed A, Ibrahim A, El-Masry M, Mansour I, Khroshied M, Gouda H, *et al*. Ex vivo expansion of stem cells: defining optimum conditions using various cytokines. Lab Hematol 2006; 12(2): 86-93.

36- Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood 1993; 81(11): 2844-53.

37- Yang JY CD, Liu WC, Zhang HM, Teng ZH, Ren J. Dendritic cell generated from CD34+ hematopoietic progenitors can be transfected with adenovirus containing gene of HBsAg and induce antigen-specific cytotoxic T cell responses. Cell Immunol 2006; 240(1): 14-21.

38- Liu Y, Liu T, Fan X, Ma X, Cui Z. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood in rotating wall vessel. J Biotechnol 2006; 124(3): 592-601.

39- Petzer AL, Hogge DE, Landsdorp PM, Reid DS, Eaves CJ. Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(4):1470-4.

40- Bhatia M BD, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. Nat Med 1998; 4(9): 1038-45

41- Cabral JMS, Zanjani ED, Almeida-Porada GA. human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. Experimental Hematology 2005; 33: 828-5.

Downloaded from bloodjournal.ir at 20:12 +0430 on Tuesday September 21st 2021

Characterization of expanded cord blood cells in medium supplemented with different cytokines

Beiki B.[1](MS), Ebrahimi M.[2](PhD)

[1]*Rooyan Research Center,Tehran,Iran*

Abstract

Background and Objectives

Hematopoietic stem cells (HSCs) transplantation has been used for treating hematological disorders, immunodeficiencies, metabolic disorders and auto immune disease. In clinical application, the number of HSCs infused proved to be the major prognostic factor for engraftment and survival; however, cord blood transplantation is limited in adults cause of their low number of cells. Consequently, we evaluated the potential of cell expansion and differentiation of cord blood cells in presence of different combination of cytokines.

Materials and Methods

In this interventional experimental study, umblical cord blood mononuclear cells (UCB MNC) were taken from apparently healthy mothers without any historical sign of diabetes during their pregnancy. We quantified and characterized an *ex vivo* expansion capacity of umbilical cord blood mononuclear cells (UCB MNC) in IMDM supplemented with 10% fetal bovine serum and various combination of SCF, TPO, Flt-3, GM-CSF and IL-3 as FSG3 T, FS3T, and FST for 3 weeks. Immunophenotyping and colony forming assay were performed at day 0, 7, 14 and 21 to characterize expanded cells in different groups.

Results

Total cell number was multiplied 5 times by all groups after 14 days of culture and the group with three cytokines of SCF, TPO, Flt-3 was shown to produce the highest percentage of hematopoitic stem cells and myeloid precursor cells among all groups during 2 weeks.

Conclusions

In this study, we showed an economical method for the expansion of umbilical cord blood stem cells with usage of UCB MNC and combination of SCF, TPO, and Flt-3.

Key words: Fetal blood, Hematopoietic Stem Cell, Cytokines, Interlukin-3, Granulocyte-macrophage Colony, Stimulating factor

SJIBTO 2009; 6(2): 95-105

Received: 17 June 2008
Accepted: 8 Aug 2009

Correspondence: Ebrahimi M., PhD of Immunology. Rooyan Research Center.
P.O.Box: 19395-4644, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22518282; Fax: (+9821) 22514652
E-mail: *ebrahimi@royaninstitute.org*