

اثر میکروپارتیکل‌های پلاکتی بر میزان بیان شاخص CXCR4 در سلول‌های CD133⁺ جدا شده از خون بند ناف

فرزانه مقدم^۱، آرزو اودی^۲، مهین نیکوگفتار ظریف^۳، ناصر امیری‌زاده^۴

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های CD133⁺ خون بند ناف قادرند برای مدت طولانی، خونسازی را برقرار کرده به رده‌های هماتوپوئیتیک و غیره تمایز یابند. افزایش بیان شاخص CXCR4 در لانه گزینی موفق سلول‌های بنیادی خونساز به مغز استخوان، نقش دارد. میکروپارتیکل‌های پلاکتی حاوی شاخص CXCR4 بوده و قادرند آن را به HSPC‌ها منتقل کنند. با توجه به موارد فوق، تاثیر میکروپارتیکل‌های پلاکتی بر میزان بیان شاخص لانه گزینی CXCR4 در سلول‌های CD133⁺ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سلول‌های CD133⁺ خون بند ناف به روش MACS جداسازی شدند. سپس یک گروه از این سلول‌ها به عنوان گروه کنترل کشت شدند و دو گروه دیگر با غلظت‌های پروتئینی ۵ μg/mL و ۱۰ μg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی تهیه شده به روش ذوب-فریز-سونیکاسیون، مجاور شدند. این سلول‌ها به مدت پنج روز در محیط "Stem SpanTM" کشت شدند و میزان چند برابر شدن سلول‌ها، کلنی‌زایی آن‌ها و بیان سطحی شاخص CXCR4 و CD34 توسط تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری بررسی گردید.

یافته‌ها

میزان چند برابر شدن سلول‌های CD34⁺ و CXCR4⁺ در سلول‌های کنترل و در حضور غلظت‌های ۵ μg/mL و ۱۰ μg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی به ترتیب ۵۲/۶ ± ۴/۱۶، ۶۴/۲ ± ۶/۹۱ و ۶۷/۲ ± ۶/۷۶ بود (p=۰/۰۴۷). هم چنین میزان بیان شاخص سطحی CXCR4 در سلول‌های مجاور شده با غلظت پروتئینی ۱۰ μg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی روز پنجم در مقایسه با سلول‌های کنترل (۶۳/۸ ± ۶/۴)، ۷۲/۸ ± ۴ تفاوت معناداری داشت (p=۰/۰۴۹).

نتیجه‌گیری

مجاورت سلول‌های CD133⁺ جدا شده از خون بند ناف با غلظت پروتئینی ۱۰ μg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی، باعث افزایش معنادار بیان مارکر CXCR4 گردید.

کلمات کلیدی: آنتی‌ژن CD133، سلول‌های بنیادی، رسپتور CXCR4

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۲

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- PhD هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی و بانک خون - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق

پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

مقدمه

سلول‌های بنیادی خونساز (HSCs) به عنوان ابزار درمانی مناسب برای بسیاری از بیماری‌ها مانند بدخیمی‌های خونی و مقاوم به شیمی درمانی، اختلالات ژنتیکی خونی و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱). استفاده از سلول‌های بنیادی خون بند ناف (UCB) به دلیل در دسترس قرار گرفتن آسان‌تر، احتمال کمتر بروز واکنش بافت پیوند علیه میزبان (GVHD) و نیاز به تطابق کمتر آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی (HLA) نسبت به سلول‌های بنیادی خونساز جدا شده از مغز استخوان، امروزه بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (۲).

از جمله شاخص‌های سطحی این سلول‌های بنیادی، CD133 می‌باشد که یک شاخص برای سلول‌های پیش‌ساز اولیه با پتانسیل بالا برای پیوند و عضوی از یک خانواده جدید گلیکوپروتئین‌های سطح سلولی است که بیان آن در سطح سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک $CD34^+$ ، $CD34^-$ ، انواع مختلف تومورها، و غیره مشاهده شده است (۳، ۴). سلول‌های بنیادی $CD133^+$ قادرند به رده‌های سلولی هماتوپوئیتیک، اندوتلیال و میوزینیک متعهد شوند (۴). استفاده از HSC های $CD133^+$ در پیوند آلورژیک انسانی و درمان بیماری‌های تحلیل برنده (Degenerative)، می‌تواند راهی به سوی درمان بسیاری از بیماری‌ها باشد (۵، ۴).

از جمله ظرفیت‌ها و توانایی‌های اصلی سلول‌های بنیادی، ویژگی‌های خود نوسازی (Self renewality) و تمایز به رده‌های مختلف سلولی (Pluripotency) می‌باشد که کلیدهای نگهداری عملکرد ارگان‌ها در طول مدت زندگی است. این سلول‌ها در محیطی از بدن به نام لانه (niche) جایگزین می‌شوند که قادر به حفظ عملکرد سلول‌های بنیادی (SCها) می‌باشد. سلول‌های نیچ و بنیادی از طریق مولکول‌های چسبندگی (مانند: $LFA-1$ ، $VLA-4$ ، N ، $cadherin$ و $CXCR-4$) به هم اتصال یافته و جهت حفظ توانایی‌هایشان، کنترل سرنوشت شان و در نهایت حفظ و نگهداری بافت یا ارگان سالم، روی یکدیگر تاثیر می‌گذارند (۶). گیرنده کموکائینی CXCR4 (CXC chemokine Receptor-4)، یک گیرنده دویل G پروتئین است که ۷ بار از غشا عبور می‌کند. اخیراً نشان داده شده

است که محور سیگنالینگ CXCR4-SDF1 نقشی ضروری در لانه‌گزینی، پیوند، خودنوسازی، زنده ماندن (Survival)، حرکت (Motility)، محدود کردن HSC ها در نیچ مناسب شان و کنترل تکثیرشان دارد (۸-۶). هم چنین افزایش CXCR4 در لایه لیپیدی، منجر به پاسخ بهتر HSPC ها به گرایان فاکتور مشتق از سلول‌های بنیادی (SDF1) می‌گردد، که می‌تواند منجر به پیوند بهتر شود (۷).

میکروپارتیکل‌ها (MPs)، وزیکول‌های کوچک غشایی می‌باشند که از انواع مختلف سلولی مانند پلاکت‌ها، اریتروسیت‌ها، لکوسیت‌ها و اندوتلیال سل‌ها توسط فرآیند جوانه‌زدن از غشای پلاسمایی جدا می‌شوند (۱۰، ۹). فراوان‌ترین MP های جریان خون، تقریباً ۷۰٪ تا ۹۰٪، میکروپارتیکل‌های پلاکتی (PMP) می‌باشند که قطری کمتر از $1 \mu m$ دارند (۱۲، ۱۱). PMP ها مانند سایر MP ها با انتقال بین سلولی مولکول‌های بیواکتیو مانند لیپیدها، گیرنده‌های سطحی و حتی آنزیم‌ها مرتبط هستند که این مولکول‌ها منجر به ایجاد تغییرات عملکردی در سلول‌های دریافت‌کننده می‌شوند (۱۲). از جمله شاخص‌های سطحی PMP ها، گیرنده‌های پلاکتی اتصال به اندوتلیوم (CD62، CD61، $CD41$)، گیرنده‌های دویل G پروتئین غشایی ($CD41$ ، $CD61$)، گیرنده‌های سایتوکائینی و غیره می‌باشند (۱۵-۱۳، ۹).

PMP ها می‌توانند به سلول‌های هماتوپوئیتیک $CD34^+$ متصل شده و منجر به افزایش پیوند HSPC ها از طریق تحریک تکثیر، زنده ماندن، چسبندگی و کموتاکسی‌شان شوند (۱۰). دریافت‌اند که HSPC های $CD34^+$ پوشیده شده با PMP ها، چندین مولکول چسبندگی جدید را بیان می‌کنند و به طور معناداری بهتر به سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های ثابت بیان‌کننده SDF1، متصل می‌شوند (۱۴).

امروزه استفاده از میکروپارتیکل‌های پلاکتی جهت تکثیر سلول‌های بنیادی و کاربردهای کلینیکی آن، مورد توجه قرار گرفته است. از آن جایی که اثر افزایشی این میکروپارتیکل‌ها بر بیان چندین مولکول چسبندگی روی سلول‌های $CD34^+$ مشاهده شده است، هم چنین افزایش این مولکول‌ها در سطح سلول‌های بنیادی می‌تواند لانه‌گزینی آن‌ها را بهبود بخشد و با توجه به اهمیت‌های ذکر

داده‌های به دست آمده در این بررسی، توسط آزمایش آماری ANOVA در نرم‌افزار SPSS ۱۶ مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر $p < 0/05$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

جهت تهیه میکروپارتیکل‌های پلاکتی از روش فریز، ذوب و سونیکاسیون استفاده شد. آنتی‌ژن‌های سطحی CD61 و CD42b میکروپارتیکل‌های پلاکتی با استفاده از روش فلوسیتومتری سنجیده شدند.

در محدوده (gate) میکروپارتیکل‌ها، ۷۳/۷۰٪ آن‌ها به صورت دوگانه برای شاخص‌های مذکور، مثبت بودند (نمودار ۱). غلظت پروتئینی این میکروپارتیکل‌ها ۱۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

شمارش سلول‌های هسته‌دار جدا شده به روش MACS، توسط لام هماسیتومتر انجام پذیرفت. درصد خلوص سلول‌های $CD133^+$ ، $4/76 \pm 85/8$ درصد کل سلول‌های هسته‌دار جدا شده بود. میانگین درصد زنده ماندن سلول‌های جدا شده در روز صفر توسط روش تریپان‌بلو، حدود $4/3 \pm 90$ درصد بود. در سطح سلول‌های $CD133^+$ جدا شده به روش MACS، آنتی‌ژن‌های سطحی $CD133$ ، $CD34$ و $CXCR4$ توسط روش فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). سلول‌های $CD34^+$ جدا شده در روز صفر، به طور میانگین $3/9 \pm 73/1$ درصد از کل سلول‌های جدا شده را تشکیل می‌دادند. هم چنین سلول‌هایی که آنتی‌ژن $CXCR4$ در آن‌ها مثبت بود، به طور میانگین $4/45 \pm 56/4$ درصد کل سلول‌های جدا شده را تشکیل می‌دادند. بیان هم زمان آنتی‌ژن‌های $CD34$ و $CXCR4$ ، به طور میانگین $4/22 \pm 46/4$ درصد کل سلول‌های جدا شده بود.

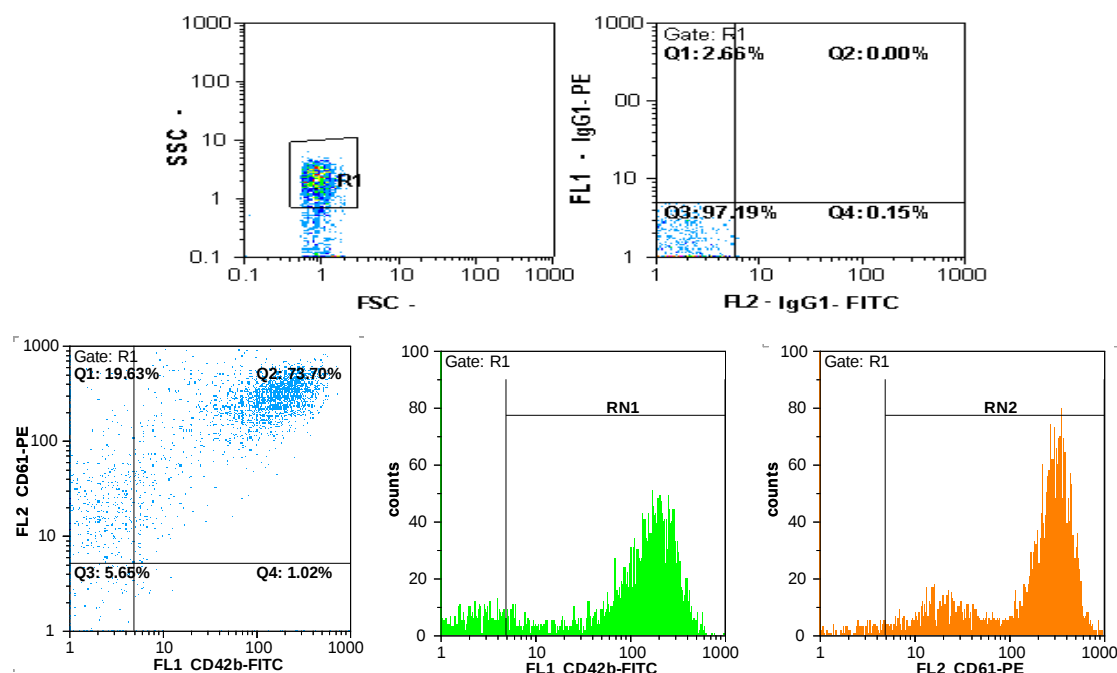
کشت سلول‌های هماتوپوئیک $CD133^+$ در محیط کشت Stem SpanTM در حضور سایتوکاین‌های مربوطه (SCF، Flt3L، TPO) به مدت پنج روز برای گروه کنترل و دو گروه آزمایش انجام پذیرفت. همان گونه که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود، میانگین درصد سلول‌های $CD133^+$ گروه کنترل در روز پنجم $3/11 \pm 79/8$ و میزان

شده برای سلول‌های بنیادی اولیه تر ($CD133^+$)، بر آن شدید تا تاثیر PMP ها بر میزان بروز شاخص لانه گزینی CXCR4 در سطح این سلول‌ها را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی، به منظور بررسی تاثیر میکروپارتیکل‌های پلاکتی بر روی میزان بیان شاخص لانه گزینی CXCR4 سلول‌های $CD133^+$ جدا شده از خون بند ناف انجام شد. جهت تهیه میکروپارتیکل‌های پلاکتی، از روش ذوب و فریز و سونیکاسیون بر روی کنسانتره پلاکتی که سه روز از تهیه آن‌ها گذشته بود، استفاده شد. این کنسانتره سه مرتبه در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد فریز و در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب شد. سپس به مدت ۵ دقیقه تحت سونیکاسیون ۶۰٪، سیکل ۰/۵ قرار گرفت و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ (rpm) سانتریفوژ شد. سپس بیان $CD61$ و $CD42b$ در سطح PMP ها در مایع‌رویی توسط روش فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت. میزان پروتئین این میکروپارتیکل‌ها نیز توسط روش برادفورد اندازه‌گیری گردید.

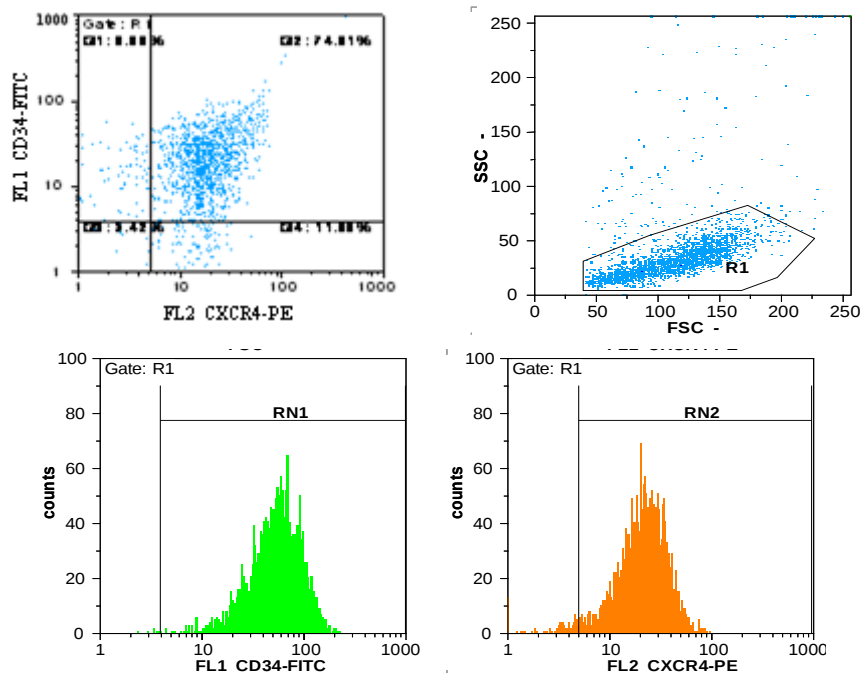
سلول‌های بنیادی خونساز $CD133^+$ با روش MACS از ۳ نمونه UCB که به طور تصادفی و بر اساس استانداردهای بانک خون و با کسب رضایت‌نامه از صاحبان خون بند ناف تهیه شده بودند، جداسازی شدند. یک گروه از این سلول‌ها به عنوان گروه کنترل کشت شد و دو گروه دیگر با غلظت‌های پروتئینی $5 \mu\text{g/mL}$ و $10 \mu\text{g/mL}$ میکروپارتیکل‌های پلاکتی تهیه شده به روش ذوب و فریز و سونیکاسیون، در محیط کشت مجاور شدند. این سلول‌ها به مدت پنج روز در محیط کشت فاقد سرم Stem Span حاوی ترکیب سایتوکاینی TPO، SCF، Flt3 Ligand و با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر کشت شدند. سپس شمارش سلولی توسط لام هماسیتومتر، تعیین درصد سلول‌های زنده توسط روش رنگ با تریپان‌بلو، میزان چند برابر شدن سلول‌ها، کلونی‌زایی آن‌ها با کشت در محیط Methocult و بیان سطحی شاخص‌های $CD133$ ، $CD34$ و توسط آنالیز فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت.



نمودار ۱: بررسی میزان بیان CD61 و CD42b در سطح میکروپارتیکل های پلاکتی با روش فلوسیتومتری (ردیف بالا سمت راست: واکنش میکروپارتیکل های پلاکتی با ایزوتیپ کنترل، ردیف پایین: واکنش آن ها با آنتی CD61 کنژوگه با PE و آنتی CD42b کنژوگه با FITC). (SSC= Side Scatter, FSC= Forward Scatter)

جدول ۱: بررسی شاخص های $CD34^+$ ، $CXCR4^+$ و $CD133^+$ به روش فلوسیتومتری و درصد زنده بودن و میزان چند برابر شدن سلول ها در گروه های مورد بررسی در روزهای صفر و پنج

گروه های آزمایش				شاخص ها
Mean $\pm$ SD گروه آزمایش با غلظت پروتئینی ۱۰ $\mu\text{g/mL}$ میکروپارتیکل پلاکتی	Mean $\pm$ SD گروه آزمایش با غلظت پروتئینی ۵ $\mu\text{g/mL}$ میکروپارتیکل پلاکتی	Mean $\pm$ SD گروه کنترل (روز پنج)	Mean $\pm$ SD روز صفر	
۷۲ $\pm$ ۴/۹۵	۷۸ $\pm$ ۴/۱۲	۷۹/۸ $\pm$ ۳/۱۱	۸۵/۸ $\pm$ ۴/۷۶	%CD133
۵ $\pm$ ۰/۵۹	۵/۵۲ $\pm$ ۰/۵۷	۵/۳۶ $\pm$ ۰/۶۵	—	میزان چند برابر شدن CD133
۷۲/۸ $\pm$ ۴/۰۶	۷۱ $\pm$ ۵/۵۷	۶۳/۸ $\pm$ ۶/۳۸	۵۶/۴ $\pm$ ۴/۴۵	%CXCR4
۷/۱۸ $\pm$ ۰/۷۳	۶/۸۴ $\pm$ ۰/۹۶	۵/۹۳ $\pm$ ۱/۰۸	—	میزان چند برابر شدن CXCR4
۷۹/۶ $\pm$ ۵/۷۸	۷۵/۱ $\pm$ ۶/۲۵	۶۸/۸ $\pm$ ۵/۲۶	۷۳/۱ $\pm$ ۳/۹	%CD34
۶/۸۶ $\pm$ ۰/۴۶	۶/۷۹ $\pm$ ۰/۴۵	۵/۴۷ $\pm$ ۰/۶۸	—	میزان چند برابر شدن CD34
۶۷/۲ $\pm$ ۶/۷۶	۶۴/۲ $\pm$ ۶/۹۱	۵۲/۶ $\pm$ ۴/۱۶	۴۶/۴ $\pm$ ۴/۲۲	CD34 و %CXCR4 Dual
۷/۵۱ $\pm$ ۱/۲۹	۶/۹ $\pm$ ۱/۴۹	۵/۸۵ $\pm$ ۱/۰۰	—	میزان چند برابر شدن CD34 و %CXCR4 Dual
۵/۶۸ $\pm$ ۰/۴۸	۵/۷۷ $\pm$ ۰/۵۸	۵/۵۹ $\pm$ ۰/۴۸	—	میزان چند برابر شدن کل سلول های هسته دار (TNC)
۸۴/۴ $\pm$ ۴/۲۲	۸۵/۴ $\pm$ ۴/۷۲	۸۶/۸ $\pm$ ۴/۴۹	۹۰ $\pm$ ۴/۳	درصد زنده ماندن سلول ها (%Viability)



نمودار ۲: بررسی میزان بیان آنتی‌ژن‌های CD34 و CXCR4 بر روی سلول‌های گروه آزمایش با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر میکروپارتیکل‌های پلاکتی در روز پنجم

کنترل روز پنجم مشاهده شد.

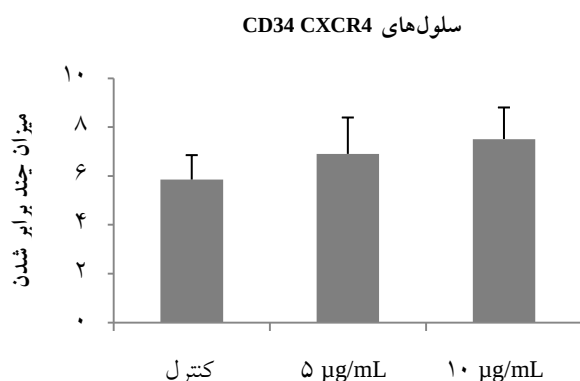
میانگین درصد سلول‌های CD34⁺ گروه آزمایش حاوی غلظت پروتئینی ۵ µg/mL میکروپارتیکل پلاکتی در روز پنجم ۷۵/۱ ± ۶/۲۵ و میانگین درصد سلول‌های CXCR4 در این گروه ۷۱ ± ۵/۵۷ و میزان چند برابر شدن نسبت به روز صفر، ۶/۸۴ ± ۰/۹۶ بود. بیان هم‌زمان آنتی‌ژن‌های CD34 و CXCR4 در ۶۴/۲ ± ۶/۹۱ درصد از سلول‌های آزمایش با غلظت پروتئینی ۵ µg/mL میکروپارتیکل پلاکتی در روز پنجم مشاهده شد که میزان چند برابر شدن آن‌ها ۶/۹ ± ۱/۴۹ بود.

میانگین درصد سلول‌های CD34⁺ گروه آزمایش حاوی غلظت پروتئینی ۱۰ µg/mL میکروپارتیکل پلاکتی در روز پنجم ۷۹/۶ ± ۵/۷۸ و میانگین درصد سلول‌های CXCR4 در این گروه ۷۲/۸ ± ۴/۰۶ و میزان چند برابر شدن نسبت به روز صفر، ۷/۱۸ ± ۰/۷۳ بود. بیان هم‌زمان آنتی‌ژن‌های CD34⁺ و CXCR4 در ۶۷/۲ ± ۶/۷۶ درصد از سلول‌های کنترل روز پنجم مشاهده شد. میزان چند برابر شدن آن‌ها ۷/۵۱ ± ۱/۲۹ بود (نمودار ۲).

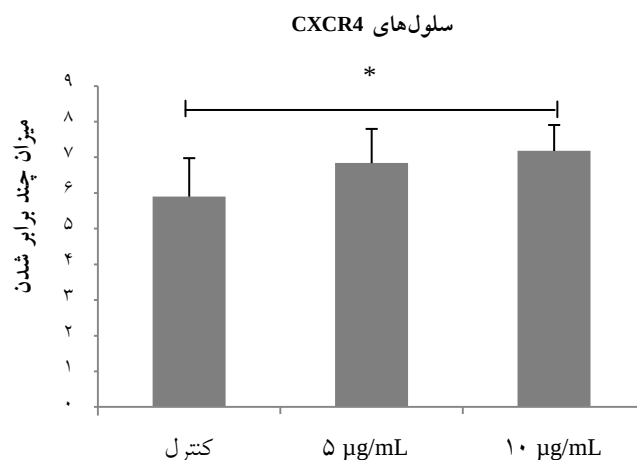
چند برابر شدن آن‌ها ۵/۳۶ ± ۰/۶۵ بود. در گروه آزمایش با غلظت پروتئینی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر میکروپارتیکل‌های پلاکتی، میانگین درصد این سلول‌ها در روز پنجم ۷۸ ± ۴/۱۲ و میزان چند برابر شدن آن‌ها ۰/۵۷ ± ۵/۵۲ بود و این میزان‌ها به ترتیب برای گروه آزمایش با غلظت پروتئینی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر میکروپارتیکل‌های پلاکتی در روز پنجم ۷۲ ± ۴/۹۵ و ۵ ± ۰/۵۹ بود. تفاوت میزان چند برابر شدن میان این سه گروه غیر معنادار بود.

میزان چند برابر شدن کل سلول‌های هسته‌دار برای هر یک از شاخص‌های مورد بررسی در روز پنجم و درصد سلول‌های زنده برای هر سه گروه، مورد بررسی قرار گرفت که در جدول ۱ آورده شده است.

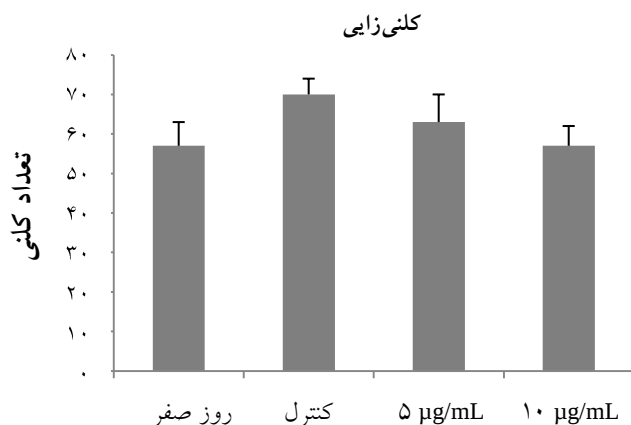
میانگین درصد سلول‌های CD34⁺ گروه کنترل در روز پنجم ۶۸/۸ ± ۵/۲۶ و میانگین درصد سلول‌های CXCR4 در این گروه ۶۳/۸ ± ۶/۳۸ و میزان چند برابر شدن نسبت به روز صفر، ۵/۹۳ ± ۱/۰۸ بود. بیان هم‌زمان آنتی‌ژن‌های CD34 و CXCR4 در ۵۲/۶ ± ۴/۱۶ درصد از سلول‌های



نمودار ۴: مقایسه میزان چند برابر شدن سلول‌های دوگانه مثبت CD34 و CXCR4 در گروه‌های کنترل روز پنجم، سلول‌های مجاور با غلظت پروتئینی 5 µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی و سلول‌های مجاور با غلظت پروتئینی 10 µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی به میزان سلول‌های دوگانه مثبت CD34 و CXCR4 وارد شده به محیط کشت در روز صفر ($p=0/047$ و تفاوت میان سه گروه معنادار بود).



نمودار ۳: مقایسه میزان چند برابر شدن سلول‌های CXCR4⁺ در گروه‌های کنترل روز پنجم، سلول‌های مجاور با غلظت پروتئینی 5 µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی و سلول‌های مجاور با غلظت پروتئینی 10 µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی. (* تفاوت میزان CXCR4 سطح سلولی میان دو گروه سلول‌های کنترل در روز پنجم با سلول‌های مجاور با غلظت 10 µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی معنادار ($p=0/049$) بود).



نمودار ۵: مقایسه میزان کلنی‌زایی سلول‌های جدا شده در روز صفر (Fresh cells)، سلول‌های کنترل روز پنجم و سلول‌های مجاور با غلظت پروتئینی 5 µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی و سلول‌های مجاور با غلظت پروتئینی 10 µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی در محیط Methocult ($p=0/001$ و تفاوت میان سه گروه معنادار بود).

بحث

در مطالعه حاضر، سلول‌های CD133⁺ خون بند ناف به روش MACS (با درجه خلوص $4/76 \pm 85/8$ و درصد زنده ماندن $4/3 \pm 90$) جداسازی شدند. میزان چند برابر شدن سلول‌های CD34⁺ و بیان هم زمان CD34 و CXCR4 و کلونی‌زایی سلول‌ها تفاوت معنادار داشتند. هم چنین

تفاوت میزان CXCR4 سطح سلولی میان دو گروه سلول‌های کنترل در روز پنجم با سلول‌های مجاور با غلظت 10 µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی، معنادار بود (نمودار ۳) ($p=0/049$).

مقایسه میزان چند برابر شدن سلول‌های دوگانه مثبت CD34 و CXCR4 در گروه‌های کنترل روز پنجم، سلول‌های مجاور با غلظت پروتئینی 5 µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی و سلول‌های مجاور با غلظت پروتئینی 10 µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی به میزان سلول‌های دوگانه مثبت CD34 و CXCR4 وارد شده به محیط کشت در روز صفر بیانگر تفاوت معنادار میان سه گروه بود ($p=0/047$) (نمودار ۴).

در نمودار ۵ میزان کلونی‌زایی سلول‌های جدا شده در روز صفر، سلول‌های کنترل روز پنجم و سلول‌های مجاور با غلظت پروتئینی 5 µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی و سلول‌های مجاور با غلظت پروتئینی 10 µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی در محیط Methocult مقایسه شده است که $p=0/001$ و تفاوت میان سه گروه معنادار بود.

میزان بیان شاخص سطحی CXCR4 در سلول‌های مجاور شده با غلظت پروتئینی ۱۰ µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی در مقایسه با سلول‌های کنترل روز پنجم دارای تفاوت معنادار بودند.

سلول‌های دارای شاخص CD133⁺، برای طولانی مدت (Long term repopulation) خونسازی را برقرار کرده و دارای توانایی تمایز به رده‌های هماتوپوئیک، اندوتلیال و میوژنیک می‌باشند (۱۶، ۴). تعدادی از سلول‌های CD133⁺ احتمالاً شامل سلول‌های CFU-GM (Colony Forming Unit- Granulocyte Monocyte) می‌باشد که برای پیوند کوتاه مدت نیاز است و ممکن است جایگزینی برای سلول‌های CD34⁺ باشد که به طور گسترده در پیوند HSPC ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۶). لانه‌گزینی سلول‌های HSC در مغز استخوان در نتیجه بخش بودن پیوند نقش اساسی دارد (۱۷، ۸). در این خصوص تعامل HSC های اولیه از طریق سیگنالینگ SDF1/CXCR4 اهمیت بالایی برخوردار است (۸). این سیگنالینگ برای مهاجرت و آغاز لنگر اندازی (Anchoring) سلول‌های بنیادی پیوند شده به اندوتلیال مغز استخوان در *in vivo* حیاتی است (۱۹، ۱۸). میکروپارتیکل‌های پلاکتی (PMP) چسبندگی سلول‌های CD34⁺ را به اندوتلیوم افزایش داده و در نتیجه در لانه‌گزینی آن‌ها در مغز استخوان تاثیرگذار خواهند بود (۱۵).

امروزه مسأله تعداد کم سلول‌های بنیادی خونساز، توسط تکثیر آن‌ها در حضور سایتوکاین‌ها در محیط‌های *ex-vivo* مورد توجه قرار گرفته است (۲۰، ۷). افزایش دوز سلول‌ها، لانه‌گزینی سلول‌های بنیادی و پروژنیوتوری خونساز را به بافت هماتوپوئیک تسریع بخشیده که به طور قابل توجهی می‌تواند پیوند را بهبود بخشیده و دوز مورد نیاز سلول‌ها برای پیوند را کاهش دهد (۲). در پژوهش حاضر بررسی میزان چند برابر شدن کل سلول‌های هسته‌دار (TNC) و سلول‌های CD133⁺ میان گروه‌های مختلف کشت شده در محیط stem span در روز پنجم نسبت به سلول‌های جدا شده در روز صفر، بیانگر تغییر غیر معنی دار بود. در حالی که این میزان برای شاخص CD34⁺ و بیان هم زمان شاخص CD34 و CXCR4 و میزان

کلونی‌زایی سلول‌ها معنادار بود. جانوسکا و همکاران نشان داده‌اند که سلول‌های مغز استخوان موشی مجاور شده با PMP ها، به طور معناداری سریع‌تر از گروه کنترل (فاقد PMP) پیوند می‌یابند که بیانگر این مطلب است که PMP ها نقش مهمی در لانه‌گزینی HSPC ها دارند. این یافته بیانگر نقش جدید میکروپارتیکل‌های پلاکتی در پیوند سلول‌های بنیادی می‌باشد و ممکن است کاربرد بالینی جهت بهبود بخشیدن پیوندها را داشته باشند (۱۴). هم چنین بیان داشتند که سلول‌های بنیادی خونساز و پروژنیوتور CD34⁺ انسانی و موشی (Murine) که با میکروپارتیکل‌های پلاکتی مجاور شده بودند، نسبت به گروه کنترل در تکثیر و کلونوژنیسیته تفاوت غیر معنادار داشتند (۱۴). شاید این تفاوت نتایج به علت اولیه‌تر بودن سلول‌های CD133⁺ در مقابل سلول‌های CD34⁺ باشد. کاهش معنادار کلونی‌زایی در گروه آزمایش مجاور با غلظت پروتئینی ۱۰ µg/mL میکروپارتیکل‌های پلاکتی نسبت به گروه کنترل در روز پنج، شاید به این دلیل باشد که سلول‌ها در حالت اولیه بیشتر باقی می‌مانند که توانایی کلونی‌زایی شان کم می‌شود اما خاصیت اولیه‌تر بودن سلول‌های بنیادی خونساز (Stemness) را حفظ می‌کنند که این پتانسیل آن‌ها برای پیوند طولانی مدت مناسب‌تر است.

سلول‌های بنیادی خونساز تزریق شده داخل عروقی برای تکثیر نهایی و تمایزشان بایستی به محیط (microenvironment) مغز استخوان رفته و جایگزین شوند (۲۱). تعدیل سازی محور سیگنالینگ SDF-1/CXCR4 ممکن است برای افزایش لانه‌گزینی سلول‌های بنیادی بافت یا ارگان جهت تولید رده‌های مختلف و برقراری خونسازی طبیعی، جابه‌جایی سلول‌های بنیادی هماتوپوئیک و غیر هماتوپوئیک طبیعی و غیر طبیعی به خون محیطی و غیره مهم باشد (۲۲).

CXCR4 روی تمام سلول‌های رده مگاکاریوسیتی، از پروژنیوتورها (CFU-Meg) تا پلاکت‌های خون محیطی بیان می‌شود و سطح بیان آن به طور موازی با بلوغ مگاکاریوسیت‌ها افزایش می‌یابد (۲۳). کرزیورزکا و همکاران وی معتقدند که میکروپارتیکل‌های پلاکتی، گیرنده‌های پلاکتی مانند PAR1، CD41، CD62،

مورد بررسی قرار گرفتند که در آن بیان سطحی شاخص CXCR4 در سلول‌های مجاور با غلظت پروتئینی $10 \mu\text{g/mL}$ میکروپارتیکل‌های پلاکتی نسبت به سلول‌های کنترل روز پنجم، تفاوت معنادار مشاهده شد. در حالی که سلول‌های مجاور با غلظت پروتئینی $5 \mu\text{g/mL}$ میکروپارتیکل‌های پلاکتی نسبت به سلول‌های کنترل روز پنجم و نسبت به سلول‌های آزمایش با غلظت $10 \mu\text{g/mL}$ میکروپارتیکل‌های پلاکتی، تفاوت غیر معنادار در بیان سطحی شاخص CXCR4 داشتند. این داده‌ها می‌توانند بیانگر تاثیر غلظت بالاتر PMP ها بر روی سلول‌های CD133⁺ در بیان سطحی شاخص CXCR4 باشد.

نتیجه‌گیری

در بررسی حاضر مشاهده شد که مجاورت غلظت $10 \mu\text{g/mL}$ میکروپارتیکل‌های پلاکتی با سلول‌های CD133⁺ جدا شده از خون بند ناف، روی تکثیر این سلول‌ها تداخلی ایجاد نکرد و میزان بیان سطحی شاخص CXCR4 افزایش معناداری داشت.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد هماتولوژی مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. بدین وسیله از مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون به دلیل حمایت‌های مالی در انجام این پروژه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

CXCR4 را به سلول‌های CD34⁺ انسانی انتقال می‌دهند و منجر به افزایش پیوند، تحریک تکثیر، زنده ماندن و چسبندگی و کموتاکسی آن‌ها شده و تردد (Trafficking) و لانه‌گزینی این سلول‌ها را در ارگان‌های هماتوپوئیتیک تنظیم می‌کنند (۲۴، ۱۵، ۱۴، ۱۰). هم چنین جانوسکا - وی‌زورکا و همکاران نیز مشاهده کرده‌اند که سلول‌های بنیادی و پروژنیتری خونساز مجاور شده با میکروپارتیکل‌های پلاکتی چندین گیرنده غشایی پلاکت مانند: CXCR4، CD41، CD62 و PAR1 را بیان می‌کنند (۲۴).

نتایج به دست آمده توسط یاجون نای و همکاران وی بیانگر این است که فقدان ژن CXCR4 در سلول‌های بنیادی خونساز می‌تواند منجر به نقص در لانه‌گزینی، خودبازسازی و یا تمایز آن‌ها شود (۸). هم چنین مشاهده شده است که موش‌های ناکوت شده برای محور SDF-1/CXCR4، در کلونیزه شدن سلول‌های بنیادی خونساز در مغز استخوان نقص دارند (۱۸).

از آن جایی که در تحقیقات مختلف از جمله هندگری‌تینگر و همکاران نشان داده‌اند که سلول‌های CD34⁺/CD133⁺ با پتانسیل بالا در پیوند به موش NOD/SCID شرکت می‌کنند، می‌توان به این نتیجه دست یافت که جمعیت سلول‌های CD133⁺ که CXCR4 را بیان می‌کنند، در پیوند مغز استخوان نقش دارند (۳).

در بررسی حاضر، میکروپارتیکل‌های پلاکتی با غلظت پروتئینی $5 \mu\text{g/mL}$ و $10 \mu\text{g/mL}$ با سلول‌های CD133⁺ جدا شده از خون بند ناف مجاور شدند و پس از ۵ روز

References :

- Appasani K, Appasani RK. Stem Cells and Regenerative Medicine. New York: Humana Press; 2011. p. 3-4.
- Kita K, Lee JO, Finnerty CC, Herndon DN. Cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells: current challenges in engraftment, infection, and ex vivo expansion. Stem Cells Int 2011; 2011: 276193.
- Handgretinger R1, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhning HJ, Niethammer D, et al; Biology and plasticity of CD133⁺ hematopoietic stem cells. Ann N Y Acad Sci 2003; 996: 141-51.
- Meregalli M, Farini A, Belicchi M, Torrente Y. CD133(+) cells isolated from various sources and their role in future clinical perspectives. Expert Opin Biol Ther 2010; 10(11): 1521-8.
- Mizrak D, Brittan M, Alison M. CD133: molecule of the moment. J Pathol 2008; 214(1): 3-9.
- Kondo M. Hematopoietic Stem Cell Biology. New York: Humana Press; 2010. p. 1-36.
- Wysoczynski M, Reza R, Ratajczak J, Kucia M, Shirvaikar N, Honczarenko M, et al. Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. Blood 2005; 105(1): 40-8.
- Nie Y, Han YC, Zou YR. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. J Exp Med 2008; 205(4): 777-83.
- Rank A, Nieuwland R, Delker R, Köhler A, Toth B, Pihusch V, et al. Cellular origin of platelet-derived microparticles in vivo; Thromb Res 2010; 126(4):

- e255-9.
- 10- Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb Res* 2008; 123(1): 8-23.
 - 11- Flaumenhaft R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36(2): 182-7.
 - 12- Siljander PR. Platelet-derived microparticles-an updated perspective. *Thromb Res* 2011; 127 Suppl 2: S30-3.
 - 13- Nomura S, Fukuhara S. Platelet microparticles. *Methods Mol Biol* 2004; 272: 269-77.
 - 14- Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reca R, Turner AR, *et al.* Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 2001; 98(10): 3143-9.
 - 15- Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, *et al.* Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 2002; 30(5): 450-9.
 - 16- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, *et al.* AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90(12): 5002-12.
 - 17- Cohen BA, Gluckman E. *Cord Blood Characteristics: Role in Stem Cell Transplantation*. 1st ed. USA: CRC Press; 2000. p. 255 .
 - 18- Goichberg P, Kalinkovich A, Borodovsky N, Tesio M, Petit I, Nagler A, *et al.* cAMP-induced PKCzeta activation increases functional CXCR4 expression on human CD34⁺ hematopoietic progenitors. *Blood* 2006; 107(3): 870-9.
 - 19- Papayannopoulou T, Priestley GV, Bonig H, Nakamoto B. The role of G-protein signaling in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization; *Blood* 2003; 101(12): 4739-47.
 - 20- Szilvassy SJ; The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 2003; 34(6): 446-60.
 - 21- Lee YH, Lee YA, Noh KT, Kim KH, Han JY, Seo SY, *et al.* Homing-associated cell adhesion molecules and cell cycle status on the nucleated cells in the bone marrow, mobilized peripheral blood and cord blood. *J Korean Med Sci* 2004; 19(4): 523-8.
 - 22- Kucia M, Reca R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, *et al.* Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 2005; 23(7): 879-94.
 - 23- Wang JF, Liu ZY, Groopman JE. The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood* 1998; 92(3): 756-64.
 - 24- Italiano JE Jr, Mairuhu AT, Flaumenhaft R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol* 2010; 17(6): 578-84.

Original Article

Evaluation of platelet microparticles effect on the expression of CXCR4 in umbilical cord blood derived CD133⁺ cells

Moghaddam F.¹, Oodi A.¹, Nikougoftar Zarif M.¹, Amirizadeh N.¹

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Cord blood CD133⁺ cells are able to maintain long-term hematopoiesis and to differentiate to different hematopoietic lineages. CXCR4 overexpression is involved in successful transplantation of hematopoietic stem cells in the bone marrow. Platelet micro particles (PMP) contain CXCR4 markers and are able to transfer them into hematopoietic stem cells. Therefore, considering the importance of CD133⁺ cells as primitive HSCs, the effect of platelet micro particles on the expression levels of CXCR4 and CD34 markers in these cells was examined.

Materials and Methods

In this experimental study, cord blood CD133⁺ cells were isolated by MACS. Isolated cells were cultured into three groups one as control without adding PMP and the other two groups with PMP with concentrations of 5 and 10 µg/mL. The cells were cultured for five days in stem span medium. Expression of CXCR4 surface marker was analyzed by flow cytometry; the total cell number was counted by hemocytometer and colony forming units (CFU) were measured by colony assay.

Results

Fold increase of CD34⁺ and CXCR4⁺ cells in the control group and in the presence of 5 and 10 µg/mL of PMP were 52.6 ± 4.16 , 64.2 ± 6.91 , and 67.2 ± 6.76 , respectively ($p = 0.047$). CXCR4⁺ cell percentage in the presence of 10 µg/mL PMP compared to control cells (63.8 ± 6.4) was 72.8 ± 4 ($p = 0.049$).

Conclusions

Exposure of CD133⁺ cells isolated from cord blood to PMP with 10 µg/mL concentration increased the expression of CXCR4 surface marker significantly.

Key words: CD133 antigen, Stem Cells, CXCR4 Receptor

Received: 20 Aug 2014

Accepted: 23 May 2015

Correspondence: Amirizadeh N., PhD of Hematology and Blood Banking. 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) 88601599; Fax : (+9821) 88601599
E-mail: n.amirizadeh@ibto.ir