خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۴ زمستان ۸۵(۳۵۳-۳۴۳)

ارزیابی پیوند هم‌زمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی و سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف به موش Balb/c اشعه دیده با روش سنجش کلونی طحال CFU-S

بهمن دلالت[۱]، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله[۲]، دکتر علی‌اکبر موثق‌پور[۳]، دکتر مسعود سلیمانی[۴]، دکتر حسین مزدارانی[۵]، دکتر سعید کاویانی[۴]، ثریا راثی قائمی[۶]

چکیده

سابقه و هدف

خون بند ناف حاوی تعداد زیادی سلول‌های پیش‌ساز ابتدایی است که برای پیوند بالینی استفاده می‌شوند ولی درصد موفقیت پیوند این سلول‌های بنیادی پایین است. لذا در این مطالعه سلول‌های $CD34^+$ هم‌زمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSC) به موش‌های Balb/c اشعه دیده، پیوند زده شد و نتایج به صورت شمارش تعداد کلون در سطح طحال ارزیابی گردید.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. نمونه‌گیری به روش تصادفی انجام شد. سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف انسانی از نمونه خون بند ناف به روش ایمونومگنتیک و MSC از مغز استخوان طبیعی انسان جدا شد. MSC از نظر مارکرهای سطحی CD166 و CD105 و درصد خلوص سلول‌های $CD34^+$ با فلوسایتومتری ارزیابی شد. سلول‌های $CD34^+$ با دوز $۰/۲\times۱۰^۶$ تا ۱ به طور هم‌زمان با MSC با دوز $۰/۲۵\times۱۰^۶$ تا ۱ به موش ۶ تا ۸ هفته‌ای اشعه دیده(۷Gy) پیوند شد. پس از گذشت ۱۱ روز، تعداد کلون‌ها در سطح طحال شمارش و به روش هماتوکسیلین و ائوزین(H&E) رنگ‌آمیزی شد. جهت ارزیابی وجود سلول‌های $CD34^+$ انسانی در کلون موجود در طحال، این سلول‌ها با ذرات آهن(SPIO) نشان‌دار شده و به موش اشعه دیده تزریق شدند. طحال این گروه به روش آبی پروس رنگ‌آمیزی شد. در آنالیز آماری جهت بررسی تعداد کلون از آزمایش کروسکال ـ والیس با نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

یافته‌ها

ارزیابی فلوسایتومتری، درصد سلول‌های تهیه شده از خون بند ناف و مغز استخوان را برای سلول‌های بنیادی $CD34^+$ حدود ۹۰٪ و MSC را بیش از ۹۶٪ نشان داد و ۱۰۰ درصد سلول‌ها زنده بودند. تعداد کلون‌های طحال در پیوند هم‌زمان دوزهای ۳×۱۰^۵ و ۲ $CD34^+$ و دوزهای ۱×۱۰^۶ و ۰/۵ MSC به طور معنی‌دار در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش یافت($p<۰/۰۱$). گرانول‌های آهن با رنگ‌آمیزی آبی پروس در کلون‌های طحال مشاهده شد.

نتیجه گیری

سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث تسریع پیوند سلول‌های $CD34^+$ می‌شود و استفاده از پیوند هم‌زمان سلول‌های بنیادی خون بند ناف به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند موفقیت پیوند سلول‌های بنیادی را افزایش دهد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی، پیوند هم‌زمان، خون بند ناف، سلول‌های مزانشیمی

تاریخ دریافت : ۸۵/ ۱/۱۸

تاریخ پذیرش : ۸۵/ ۷/۲۲

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی ـ دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۲- مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی ـ استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵

۳- PhD هماتولوژی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۴- PhD هماتولوژی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۵- PhD ژنتیک ـ استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۶- کارشناس ارشد آناتومی ـ دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]

مقدمه

پیوند سلول بنیادی خون‌ساز آلوژنیک، به عنوان روش درمانی برای تعدادی از بدخیمی‌های خونی پرخطر و سندرم‌های نارسایی مغز استخوان استفاده می‌شود. استفاده از پیوند سلول بنیادی خون‌ساز آلوژنیک به خاطر عدم دسترسی به آنتی‌ژن لکوسیت انسانی یکسان(HLA) بین اهداکننده و گیرنده، محدودیت دارد. علیرغم افزایش تعداد اهداکنندگان غیر خویشاوند، شانس یافتن یک اهداکننده با HLA سازگار برای بسیاری از بیماران پایین است. علاوه بر این، بیماری پیوند علیه میزبان(GVHD) یک منبع مهم مرگ و میر متعاقب پیوند به شمار می‌رود. بنابراین بررسی‌های بالینی در دهه گذشته نشان دادند که از خون بند ناف می‌توان به عنوان یک منبع جایگزین جهت سلول‌های بنیادی خون‌ساز استفاده کرد(۱). اولین پیوند خون بند ناف انسانی UCB(Umbilical Cord Blood) که با موفقیت انجام شد بر روی یک بیمار جوان مبتلا به آنمی فانکونی در سال ۱۹۸۸ صورت گرفت(۲). بعد از آن، بانک‌های UCB در سر تا سر جهان برای پیوند UCB خویشاوند و غیر خویشاوند به وجود آمدند(۳). تاکنون بیش از ۲۰۰۰ بیمار تحت عمل پیوند UCB قرار گرفته‌اند(۵، ۴). مزایای استفاده از خون بند ناف جهت پیوند، سهل‌الوصول بودن آن، نداشتن خطر برای اهدا کننده، کاهش عفونت متعاقب پیوند، دسترسی فوری به نمونه‌های فریز شده و عدم نیاز به سازگاری صد در صد HLA جهت انتخاب اهدا کننده و گیرنده می‌باشد(۸-۶). مطالعات متعددی که جهت کشف ماهیت سلول بنیادی خون‌ساز UCB صورت گرفت، نشان داد که UCB در مقایسه با مغز استخوان بالغین، نسبت بیشتری از پیش‌سازهای خون‌ساز ابتدایی را دارد و این مشخصه باعث شده است که این سلول‌ها پاسخ‌های تکثیری بالاتری در محیط آزمایشگاه و ظرفیت پیوندی بیشتری در بدن داشته باشند(۹). در برخی از مطالعات برای افزایش میزان پیوند از سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی پتانسیل تکثیر بالایی دارند و به طور ذاتی چندین سایتوکاین را ترشح می‌کنند(۱۰). از میان این سایتوکاین‌ها، تعدادی از آن‌ها در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز(HSC) نقش دارند. هم‌چنین سلول بنیادی مزانشیمی، لایه تغذیه کننده برای HSC کشت داده شده ایجاد می‌کند(۱۱). اخیراً نشان داده شده که پیوند هم‌زمان MSC انسانی به همراه HSC، میلوپوئزیس و مگاکاریوپوئزیس را در موش NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient) افزایش می‌دهد(۱۲). با جداسازی پیش سازهای مزانشیمی و دست‌کاری رشد آن‌ها در محیط کشت با شرایط معین، امکان استفاده از این سلول‌ها به عنوان یک مکمل برای پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز فراهم شده است(۱۳).

با توجه به پیشینه گفته شده، هدف از این مطالعه افزایش کارایی پیوند خون بند ناف با استفاده از پیوند هم‌زمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان انسان نرمال در موش بالغ Balb/c اشعه دیده می‌باشد. نتیجه پیوند به صورت شمارش کلونی‌های تشکیل شده در طحال ارزیابی شد. برای تعیین دوز مناسب جهت پیوند $CD34^+$ و MSC، تاثیر دوزهای مختلف بر تعداد کلون‌ها در سطح طحال بررسی شد.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این پژوهش از موش‌های ماده(۸-۶ هفته‌ای) نژاد Balb/c (مؤسسه پاستور ایران) استفاده شد که در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد در حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس نگهداری می‌شدند. روش نمونه‌گیری تصادفی بود و تعداد ۲۰ نمونه خون بند ناف به همراه ۲۰ نمونه مغز استخوان مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه‌گیری خون بند ناف و نمونه آسپیره مغز استخوان:

نمونه خون بند ناف در شرایط کاملاً استریل توسط کارشناس مامایی از خانم‌هایی که زایمان کاملاً طبیعی داشتند گرفته شد. عمل آسپیراسیون مغز استخوان توسط فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی از اهداکنندگان نرمال از ناحیه ستیغ ایلیاک خلفی گرفته شد. نمونه‌های به دست آمده در لوله‌های فالکون ۵۰ml که حاوی ۰/۱ ml ضد انعقاد هپارین(۵۰۰ IU) بودند، جمع‌آوری شد و در

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]

دمای کمتر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل گشت.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از نمونه خون بند ناف و نمونه آسپیره مغز استخوان:

برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای، به نمونه خون بندناف به نسبت حجمی ۱ به ۴ هیدروکسی اتیل استارچ(فری فلکس ـ آلمان) در شرایط استریل اضافه شد و پس از رسوب گلبول‌های قرمز، محلول رویی را که محلول زرد رنگی است برداشته و هم حجم محلول باقی‌مانده، PBS(بیوتک ـ آلمان) اضافه شد و روی فایکول(آلمان، inno-TRAin) برده و به مدت ۴۰ دقیقه با دور ۴۰۰G(۱۴۱۰rpm) سانتریفوژ شد. برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از نمونه مغز استخوان به روش توضیح داده شده عمل شد، با این تفاوت که مرحله هیدروکسی اتیل استارچ حذف شد. سپس حلقه سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از نمونه خون بند ناف و از مغز استخوان به آرامی جمع‌آوری و با PBS حاوی EDTA(بیوتک ـ آلمان) شستشو داده شد.

جداسازی سلول‌های $CD34^+$ از سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از نمونه خون بند ناف:

به سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از نمونه خون بند ناف، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد CD34 نشان‌دار شده با ذرات آهن اضافه کرده و به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمودیم. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰G سانتریفوژ کرده و پس از اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر محلول PBS حاوی EDTA(بیوتک ـ آلمان)، سلول‌های $CD34^+$ با استفاده از ستون مینی مکس(بیوتک ـ آلمان) جدا شدند و با محلول PBS حاوی EDTA بدون گاز شستشو داده شدند و در محیط کشت استم لاین(سیگما) حاوی ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر TPO، ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر SCF(سیگما) به مدت ۱۴ روز در پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند.

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و کشت آن‌ها:

سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از نمونه مغز استخوان در محیط DMEM(جیبکو) محتوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS(جیبکو) در انکوباتور با CO_2 ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۱۰۰ درصد انکوبه شدند. در این شرایط سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از گذشت ۳ روز به کف فلاسک چسبیده و تکثیر می‌شوند و بدین ترتیب خالص و جداسازی می‌گردند.

شمارش سلولی:

سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده به وسیله لام نئوبار شمارش شد.

تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها (Viability test):

درصد سلول‌های زنده با رنگ‌آمیزی تریپان بلو تعیین شد. رنگ در سلول‌های مرده نفوذ کرده و آن‌ها را آبی رنگ می‌کند اما سلول‌های زنده رنگ نمی‌گیرند و بی‌رنگ می‌باشند. درصد زنده بودن سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر به دست می‌آید.

$$\text{درصد زنده بودن سلول‌ها} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد کل سلول‌های زنده و مرده}} \times ۱۰۰$$

فلوسایتومتری:

تعیین مارکر سطحی $CD34^+$ سلول‌های جدا شده از نمونه خون بند ناف:

محتویات یک چاهک با پیپت پاستور در یک لوله اپندروف ۱/۵ ml خالی شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. محلول رویی را دور ریخته، FCR بلوکینگ با هیومن سرم ۳٪ انجام شد و باقی‌مانده با ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS و ۷ میکرولیتر آنتی‌بادی CD34 FTIC (داکو) کلون نوع ۳ مخلوط شد. در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه نگهداری شد و با ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS حاوی پارافرم آلدئید(۱٪) فیکس شد. جهت نمونه کنترل به جای آنتی‌بادی CD34 FTIC، از محلول کنترل منفی(IgG1 موش) استفاده شد. برای انجام فلوسایتومتری، سلول‌ها به بخش فلوسایتومتری سازمان انتقال خون ایران فرستاده شدند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]

تعیین مارکر سطحی CD166 و CD105 بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان:

برای تعیین مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از آنتی‌بادی CD166 FITC و CD105 PE استفاده شد و بقیه مراحل کار مثل روند گفته شده در بالا انجام شد.

روش آماده‌سازی سلول‌ها جهت پیوند به موش اشعه دیده

آماده‌سازی سلول‌های $UCB\ CD34^+$:

با استفاده از پیپت پاستور، سلول‌های $CD34^+$ از چاهک‌ها برداشته و پس از شمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار، نمونه جمع‌آوری شده به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰G(۱۴۱۰rpm) سانتریفوژ گردید. مایع‌رویی برداشته و با استفاده از PBS به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد به طوری که هر ۱۰۰ میکرولیتر حاوی ۲×۱۰^۵ سلول $CD34^+$ بود. سلول‌ها توسط سرنگ انسولین شماره ۲۷ برداشته شد.

آماده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSC):

از آن‌جایی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبنده هستند و به کف فلاسک می‌چسبند برای جداسازی آن‌ها از کف فلاسک، ابتدا بایستی محیط کشت را به طور کامل برداشته و با استفاده از محلول PBS حاوی EDTA آن را شستشو داده سپس یک میلی‌لیتر آنزیم تریپسین حاوی EDTA ۰/۲۵٪ به فلاسک اضافه نموده و به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شود.

بعد از آن محیط کشت DMEM حاوی FBS به آن افزوده و بعد از پی‌پتاژ نمودن، سوسپانسیون سلولی در یک لوله فالکون ۵۰ml جمع‌آوری می‌گردد و بعد از شمارش سلولی با لام نئوبار، نمونه به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰G(۱۴۱۰rpm) سانتریفوژ و مایع‌رویی برداشته می‌شود. رسوب سلولی حاصل با PBS به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد به طوری که هر ۱۰۰ میکرولیتر حاوی ۵×۱۰^۵ سلول بنیادی مزانشیمی بود. سلول‌ها توسط سرنگ انسولین شماره ۲۷ برداشته شد.

تعیین دوز سلولی مناسب

تعیین دوز مناسب سلول $UCB\ CD34^+$ و MSC جهت پیوند:

برای انتخاب دوز سلولی مناسب، $CD34^+$ از $۱۰^۵$ تا $۱۰^۶$ سلول و سلول‌های بنیادی مزانشیمی از $۰/۵\times۱۰^۶$ و ۱×۱۰^۶ سلول به همراه سلول‌های $CD34^+$ به موش تزریق شد و بر اساس ایجاد کلون و تعداد کلون در طحال و دوز سلولی کمتر، مناسب‌ترین دوز انتخاب شد.

پیوند سلول‌های بنیادی $CD34^+$ و MSC به موش اشعه دیده

تهیه موش اشعه دیده:

موش‌های ماده نژاد Balb/c جهت دریافت اشعه به مرکز پزشکی نوین منتقل شده و در آن‌جا تحت تابش اشعه گاما قرار گرفتند. به هر موش ۷Gy اشعه گاما به صورت توتال داده شد. سپس موش‌ها به اتاق مخصوصی که برای نگهداری موش‌های اشعه خورده در نظر گرفته شده بود، منتقل شدند.

۴ تا ۶ ساعت بعد از اشعه، موش‌ها به گروه‌های ذیل تقسیم شدند:(الف) موش‌های اشعه دیده‌ای که هیچ سلولی به آن‌ها تزریق نشد، (ب) موش‌هایی که فقط ۲×۱۰^۵ و ۳×۱۰^۵ سلول $UCB\ CD34^+$ دریافت کردند، (ج) گروهی که فقط ۱×۱۰^۶ و $۰/۵\times۱۰^۶$ سلول MSC به آن‌ها تزریق شد، (د) گروهی که ۲×۱۰^۵ سلول $UCB\ CD34^+$ به همراه ۱×۱۰^۶ MSC به آن‌ها پیوند زده شد،(هـ) گروهی که ۳×۱۰^۵ سلول $UCB\ CD34^+$ به همراه ۵×۱۰^۵ سلول MSC به آن‌ها تزریق شد. در هر گروه، سلول‌ها به تعداد ۵ رأس موش اشعه دیده تزریق شد و نتایج حاصل به صورت شمارش کلونی‌های تشکیل شده در طحال بررسی گردید.

جهت تایید حضور سلول‌های $CD34^+$ پیوند شده در کلون‌های ایجاد شده در طحال، سلول‌های $CD34^+$ را با ذرات آهن نشان دار کرده و سپس به موش پیوند زده شدند. طحال‌های خارج شده در این گروه به روش آبی پروس رنگ آمیزی شد.

سلول‌ها از طریق رگ دمی به آرامی به درون رگ تزریق

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]

شد. موش‌های پیوندی در شرایط کاملاً استریل، اتاق ضدعفونی شده با دمای بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تهویه مناسب، آب دوبار تقطیر، غذا و قفس اتو کلاو شده، نگهداری شدند.

نشان‌دار کردن سلول‌های $UCB\ CD34^+$ با ذرات آهن:

برای نشان‌دار کردن سلول‌های $CD34^+$ از Super Para magnetic Iron Oxide(SPIO) و پروتامین استفاده شد.

مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول SPIO و ۶ میکرولیتر از محلول پروتامین را با ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت استم لاین حاوی ۲×۱۰^۶ سلول $CD34^+$ مخلوط کرده و پس از گذشت یک شبانه روز، سلول‌ها برداشته و بعد از سه مرتبه شستشو با PBS حاوی EDTA برای تزریق به موش اشعه دیده آماده شدند.

سنجش کلونی در طحال:

پس از گذشت ۱۱ روز از پیوند، موش‌ها به روش نخاعی کشته شدند و پس از بیرون آوردن طحال از شکم موش، آن‌را در الکل متانول فیکس کرده و زیر میکروسکوپ تشریح، تعداد کلون‌های موجود بر سطح رویی و زیرین طحال شمارش شدند.

طرز آماده‌سازی بافت طحال جهت میکروسکوپ نوری:

طحال خارج شده را با فرمالین ۱۰٪ به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق فیکس کرده و پس از تهیه برش‌های بافتی با ضخامت ۴μm، برش‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین الکلی رنگ‌آمیزی شدند. در این رنگ‌آمیزی، هسته آبی و سیتوپلاسم به رنگ قرمز قابل مشاهده است.

روش رنگ‌آمیزی آبی پروس برای نشان دادن آهن:

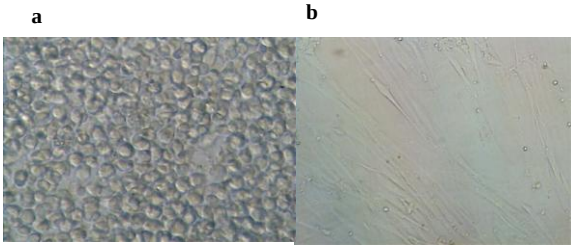
لام‌های دپارافینه شده تا مرحله آبدهی پیش برده شد و با محلول فری‌سیانید پتاسیم ۵٪(۲۵ میلی‌لیتر) و اسیدهیدروکلریک ۵٪(۲۵ میلی‌لیتر) و ائوزین رنگ شد. در این رنگ‌آمیزی گرانول‌های آهن به رنگ آبی تیره و سیتوپلاسم و هسته به رنگ قرمز تا صورتی مشخص خواهد شد.

آنالیز آماری:

جهت بررسی تعداد کلون از آزمایش کروسکال ـ والیس با نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

یافته ها

از هر نمونه خون بند ناف به طور متوسط ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلیون و از هر نمونه آسپیره مغز استخوان به طور متوسط ۲۰ تا ۲۵ میلیون سلول تک هسته‌ای جدا شد. پس از جداسازی سلول‌ها با استفاده از ستون مکس، به طور متوسط ۲۵۰ هزار تا ۵۰۰ هزار سلول $CD34^+$ به ازای هر نمونه جدا شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نظر مورفولوژی، به صورت سلول‌های دوکی شکل با زوایید سیتوپلاسمی بلند در زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده بود(تصویر ۱).



تصویر ۱. a: سلول‌های $CD34^+$ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×،
b: سلول‌های MSC با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×

رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو نشان داد که ۱۰۰٪ سلول‌های بنیادی مزانشیمی زنده و $CD34^+$ بودند. پس از انجام فلوسایتومتری سلول‌های جدا شده از مغز استخوان، بیش از ۹۶ درصد مارکر CD166 و بیش از ۳۵ درصد، مارکر CD105 را در سطح خود بیان کرده بودند. فلوسایتومتری $CD34^+$ نشان داد که ۹۱/۹٪ سلول‌های جدا شده از نمونه خون بند ناف، مارکرCD34 را در سطح خود بروز داده بودند.

بر اساس نتایج به دست آمده، دوز سلولی ۳×۱۰^۵ و ۲×۱۰^۵ از سلول‌های $UCB\ CD34^+$ و دوز سلولی ۵×۱۰^۵ و ۱×۱۰^۶ از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت پیوند مناسب بود(جداول ۱ و ۲).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]

جدول ۱: نتایج حاصل از تزریق دوزهای مختلف سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف به تنهایی در مقادیر مختلف و تعداد CFU-S ایجاد شده در طحال موش

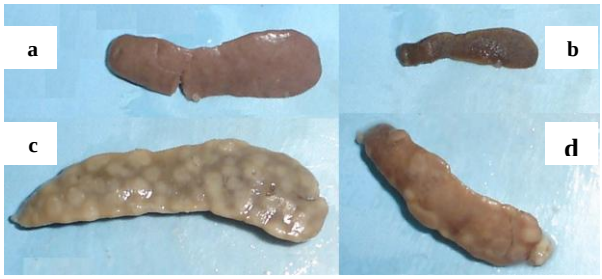
تعداد سلول $CD34^+$ تزریق شده	میانگین تعداد کلون Mean ± SD	حداقل تعداد کلون	حداکثر تعداد کلون
۱×۱۰^{۵}	۵ ± ۰/۷	۴	۶
۲×۱۰^{۵}	۷ ± ۲/۶	۵	۱۰
۳×۱۰^{۵}	۱۳ ± ۳	۱۰	۱۶
۵×۱۰^{۵}	۲۴ ± ۶	۱۸	۳۰
۶×۱۰^{۵}	۲۶ ± ۳	۲۳	۲۹
۸×۱۰^{۵}	۲۳ ± ۹/۱	۱۳	۳۱
۱×۱۰^{۶}	۸ ± ۴	۴	۱۲
۲×۱۰^{۶}	۵ ± ۲	۳	۷
۵×۱۰^{۶}	۳ ± ۱	۲	۴
۱۰×۱۰^{۶}	–	–	–

شمارش تعداد کلونی‌های طحال نشان داد که متوسط تعداد کلون‌ها در گروهی که فقط ۲×۱۰^{۵} و ۳×۱۰^{۵} سلول $CD34^+$ UCB دریافت کرده بودند به ترتیب ۷/۲ و ۱۴/۲، در گروهی که ۲×۱۰^{۵} سلول $CD34^+$ UCB به همراه ۱×۱۰^{۶} MSC به آن‌ها پیوند زده شد به طور متوسط ۳۹/۲ و در گروهی که ۳×۱۰^{۵} سلول $CD34^+$ UCB به همراه ۵×۱۰^{۵} سلول MSC به آن‌ها تزریق شد به طور متوسط ۵۵/۶ بود. اما در گروهی که فقط MSC به آن‌ها تزریق شد یا موش‌های اشعه دیده‌ای که هیچ سلولی به آن‌ها تزریق نشد هیچ کلونی مشاهده نگردید(تصویر ۲). نتایج حاصل از شمارش کلونی در طحال، در جدول ۳ آمده است.

مطالعه میکروسکوپی، جمعیت سلولی به شدت بازوفیل و متراکم در بافت طحال به شکل مجتمع که تشکیل کلونی داده بودند را نشان داد. هم‌چنین مقاطع بافتی به دست آمده از طحال موش پیوند شده با سلول‌های $CD34^+$ نشان‌دار شده با SPIO و رنگ‌آمیزی آن‌ها با آبی پروس، وجود سلول‌های بنیادی $CD34^+$ انسانی پیوند شده را تایید کرد و گرانول‌های آهن به شکل ذرات ریز به رنگ آبی تیره مشخص شد(تصویر ۳).

جدول ۲: نتایج حاصل از پیوند(تزریق) هم‌زمان سلول‌های $CD34^+$ به همراه MSC جهت انتخاب دوز سلولی مناسب

تعداد سلول $CD34^+$ تزریق شده	تعداد سلول MCS تزریق شده	میانگین تعداد کلون Mean ± SD	حداقل تعداد کلون	حداکثر تعداد کلون
۱×۱۰^{۵}	۱×۱۰^{۶}	۹ ± ۳	۶	۱۲
۲×۱۰^{۵}	۱×۱۰^{۶}	۳۶ ± ۲/۱	۳۲	۳۷
۳×۱۰^{۵}	۵×۱۰^{۵}	۴۴ ± ۸/۳	۳۸	۵۴
۵×۱۰^{۵}	۵×۱۰^{۵}	۳۲ ± ۱۱	۲۶	۴۸
۱×۱۰^{۶}	۵×۱۰^{۵}	۱۸ ± ۶	۱۱	۲۲



تصویر ۲. طحال جدا شده از موش ماده نژاد Balb/c، a: طحال طبیعی b: طحال اشعه خورده ۷Gy ، c: طحال موشی که علاوه بر سلول‌های $CD34^+$، سلول‌های MSC را هم‌زمان دریافت نموده‌است، d: طحال موشی که فقط سلول $CD34^+$ دریافت نموده است.

جدول ۳: مقایسه تعداد کلونی‌های تشکیل شده در طحال موش‌های اشعه دیده حاصل از تزریق سلول‌های $CD34^+$ به همراه MSC جهت انتخاب دوز سلولی مناسب

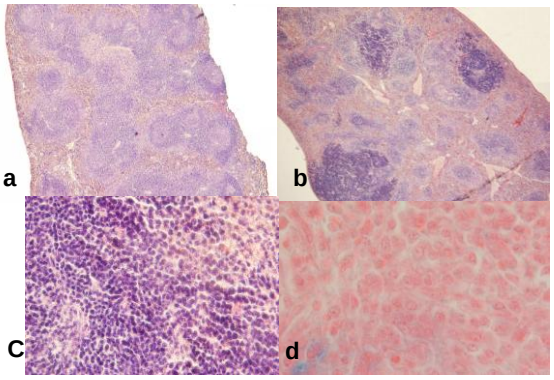
تعداد سلول $CD34^+$ تزریق شده	تعداد سلول MCS تزریق شده	میانگین تعداد کلون Mean ± SD	حداقل تعداد کلون	حداکثر تعداد کلون
۲×۱۰^{۵}	۱×۱۰^{۶}	۳۹/۲ ± ۸/۷[a]	۲۶	۴۸
۲×۱۰^{۵}	–	۷/۲ ± ۱/۹	۵	۱۰
۳×۱۰^{۵}	۵×۱۰^{۵}	۵۵/۶ ± ۱۳/۳[b]	۴۳	۷۷
۳×۱۰^{۵}	–	۱۴/۲ ± ۲/۴	۱۰	۱۶
–	۵×۱۰^{۶}	– *	–	–

a: وجود اختلاف معنی‌دار با گروه تزریق ۲×۱۰^{۵} $CD34^+$ بدون تزریق MCS در سطح $p<۰/۰۱$

b: وجود اختلاف معنی‌دار با گروه تزریق ۳×۱۰^{۵} $CD34^+$ بدون تزریق MCS در سطح $p<۰/۰۱$

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]

* در سایر گروه‌ها یعنی گروه‌های دریافت کننده مزانشیم بـه تنهـایی و گروهی که هیچ‌گونه سلولی دریافت نکرد، کلونی بر سطح طحال دیـده نشد.



تصویر ۳: نمای میکروسکوپی a: بافت طحال نرمال با بزرگ‌نمـایی ۴۰× b: بافت طحالی که سلول‌هـای $CD34^+$ و سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی به صورت هم‌زمان دریافت نموده است بـا بـزرگ‌نمـایی ۴۰× c: بافت طحالی که سلول‌هـای $CD34^+$ و سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی به صورت هم‌زمان پیوند زده شده است با بـزرگ‌نمـایی ۴۰۰× d: بافت طحال پیوند شده با سلول‌های $CD34^+$ نشاندار شده با SPIO با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×(گرانول‌های بسیار ریز آهن به رنـگ آبی تیره در سیتوپلاسم مشاهده می‌شود).

بحث

در این بررسی از روش جداسازی ایمونومگنتیک جهت به دست آوردن تعـداد بیشـتری از سـلول‌هـای $CD34^+$ از خون بند نـاف اسـتفاده شـد کـه بـه طـور متوسـط حـدود $۲/۵-۵\times۱۰^۵$ سلول به ازای هر نمونه خون بنـد نـاف جـدا شـد و درصـد خلـوص سـلول‌هـای $CD34^+$ بـا روش جداسازی ایمونومگنتیـک پـس از ارزیـابی فلوسـایتومتری بالای ۹۰٪ بود. در حـالی‌کـه در مطالعـات گذشـته درصـد خلوص $CD34^+$ جدا شده با سیسـتم جداسـازی بیـوتین ـ آویدین حدود ۵۰٪ تـا ۶۰٪ بـود(۲۱-۱۴). شـاید خلـوص بالای سلول‌های $CD34^+$ با روش جداسازی ایمونومگنتیک به علت مقدار سلول‌های بـاردار شـده‌ای اسـت کـه تحـت میدان مغناطیسی قوی در ستون باقی می‌ماندند. همـان‌طـور که اشاره شد علاوه بر خون بند ناف، خون محیطـی و مغـز استخوان هم دارای سلول‌های $CD34^+$ می‌باشند که درصـد $CD34^+$ جدا شده و هم‌چنین میـزان تکثیـر ایـن سـلول‌هـا نسبت به سلول‌های $CD34^+$ جدا شده از سایر منابع، بـالاتر و بیشتر است(۲۳، ۲۲).

در این تحقیق سلول‌های $CD34^+$(بـه تعـداد ۱×۱۰^۶ تـا ۰/۲) و MSC(به تعـداد ۱×۱۰^۶ تـا ۰/۲۵) بـه مـوش مـاده Balb/c(۶ تا ۸ هفته‌ای) به صـورت هـم‌زمـان یـا جداگانـه پیوند زده شد و نتایج حاصل از پیوند به صورت کلونی در طحال ارزیابی شد. بررسی‌ها نشان داد که تعـداد کلـون در طحال در پیونـد هـم‌زمـان دوزهـای پـایین $CD34^+$(یعنـی $۲-۳\times۱۰^۵$) و دوزهای $۰/۵-۱\times۱۰^۶$ سلول بنیادی مزانشیمی، به طور معنی‌دار در مقایسـه بـا گـروه‌هـای دیگـر افـزایش یافت($p<۰/۰۱$). یعنی حضور سلول‌های بنیـادی مزانشـیمی باعث بهبود پیوند $CD34^+$ شد. چنانچـه در پیونـد $CD34^+$ به تنهایی چنین نتیجه‌ای حاصل نشد. هـم‌چنـین در پیونـد سلول‌های بنیادی مزانشیمی به تنهایی هیچ کلونی در طحال مشاهده نشد. بنابراین واضح است کـه سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی نقش حمایت کننده‌ای در تسریع و بهبـود پیونـد سـلول‌هـای هماتوپوئیتیـک $CD34^+$ دارد. آنجلوپولـو و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که سلول‌های بنیـادی مزانشیمی چه به صورت اتولوگ و چه به صورت آلوژنیک به میـزان یکسـان قـادر بـه حمایـت از پیونـد سـلول‌هـای هماتوپوئیتیک هستند و باعـث افـزایش پیونـد سـلول‌هـای $CD34^+$ انسـانی بـه مـوش NOD/SCID مـی‌شـوند(۲۴). بنابراین می‌توان از سلول‌های بنیـادی مزانشـیمی آلوژنیـک جهت پیوند در موارد عدم دست‌یابی به سلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی خود فرد مثلاً به علت آلودگی با تومـور اسـتفاده کرد.

البته این افزایش در پیوند بـا محدود شدن دوز $CD34^+$ به تعداد $۲-۳\times۱۰^۵$ سلول $CD34^+$، رابطه مستقیم داشت بـه طوری که بـا افـزایش تعـداد سـلول‌هـای $CD34^+$ جهـت پیوند، تعداد کلون‌های به وجود آمـده در طحـال بـه طـور معنی‌دار کاهش داشت. اگر چه نتیجه پیوند از نمونـه‌ای بـه نمونه دیگر متفـاوت اسـت امـا تعـداد کلـون‌هـا در پیونـد هم‌زمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌هـای $CD34^+$ در همه نمونه‌ها نسبت بـه پیونـد سـلول‌هـای $CD34^+$ بـه تنهایی، افزایش داشت و با محدود شدن دوزهـای بـه کـار گرفته، تعداد کلون‌ها به صـورت معنـی‌دار افـزایش یافـت.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]

مشابه همین نتایج را فیبه و همکارانش در سال ۲۰۰۱ و آنجلوپولو و همکارانش در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند (۲۵، ۲۴). البته در تحقیقات انجام شده، کمتر به شمارش کلونی تشکیل شده در طحال به عنوان نتیجه پیوند، پرداخته شده است و در بیشتر موارد بیان ژن‌های سلول‌های خون‌ساز انسانی با RT-PCR ارزیابی شده و میزان سلول‌های میلوئیدی، مگاکاریوسیتی، لنفوئیدی و ماکروفاژی با فلوسایتومتری بررسی شده است. مکانیسمی که توسط آن، سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث افزایش خون‌سازی می‌شوند تا حدودی مشخص شده است. به طوری که سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فاکتورهای رشد مختلفی مانند اینترلوکین ۶ و ۱۱، فاکتور مهارکننده لوکمی، فاکتور سلول بنیادی و Flt-3-Ligand را ترشح می‌کنند که این فاکتورها برای افزایش تکثیر سلول‌های خون‌ساز ضروری هستند(۲۸-۲۶). هم‌چنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی، گیرنده‌های چسبندگی را بر سطح خود بیان می‌کنند که این گیرنده‌ها برای تکوین سلول‌های خون‌ساز انسانی لازم است. از طرفی برخی از محققین نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث سرکوب سیستم ایمنی شده و گرفتن پیوند را افزایش می‌دهند(۳۰، ۲۹). نتایج به دست آمده از این مطالعه توسط تحقیقات گسترده‌ای که بر روی پیوند هم‌زمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های $CD34^+$ صورت گرفته، به اثبات رسیده است(۳۲، ۳۱).

مطالعه میکروسکوپی کلونی‌های طحال موش پیوند شده پس از رنگ‌آمیزی H & E نشان داد که مناطقی که کلون وجود دارد به شدت رنگ هماتوکسیلین را به خود گرفته و خاصیت بازوفیلیک شدید را از خود نشان می‌دهند که این نشان‌دهنده تکثیر بالای سلولی در این مناطق است (تصویر ۳). هم‌چنین وجود سلول‌های بلاست در این مناطق کاملاً مشهود است اما افتراق دقیق رده‌های مختلف سلولی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ـ ائوزین میسر نمی‌باشد.

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی آبی پروس نشان داد که گرانول‌های آهن در داخل سلول به صورت آبی تیره مشخص است و سلول‌های حاوی ذرات آهن به صورت کلونی و در کنار هم مشاهده می‌شود(تصویر ۳). بدین ترتیب حضور سلول‌های انسانی پیوند شده در کلونی‌های طحال اثبات شد. اگر چه مشابه این روش در مقاله‌ها بررسی نشده است ولی نشان می‌دهد که پیوند گزنوژنیک سلول‌های $UCB\ CD34^+$ به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی با موفقیت انجام شده است.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که:

۱- با استفاده از روش جداسازی ایمونومگنتیک (سلول‌های $CD34^+$ یک بار از ستون عبور داده شد) درصد خلوص سلول‌های $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف به بیش از ۹۰٪ افزایش می‌یابد.

۲- پیوند هم‌زمان سلول‌های $CD34^+$ به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث افزایش تعداد کلون در طحال موش، در مقایسه با پیوند سلول‌های $CD34^+$ به تنهایی می‌شود.

۳- سلول‌های بنیادی مزانشیمی به تنهایی قادر به ایجاد کلون و در نتیجه پدیده خون‌سازی نیستند و تنها نقش حمایت کنندگی از سلول‌های $CD34^+$ جهت پیوند را دارند.

۴- محدود شدن دوز سلول‌های $CD34^+$ به $۲-۳\times۱۰^۵$ باعث افزایش تعداد کلون در طحال می‌شود. در نتیجه پیوند هم زمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی همراه با سلول‌های $CD34^+$ باعث افزایش تعداد کلون در طحال شده است.

۵- با رنگ‌آمیزی Prussian blue مشخص شد که سلول‌های $CD34^+$ انسانی در طحال، کلونی تشکیل داده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات و همکاری صمیمانه خانم‌ها طاهری کارشناس مامایی بیمارستان طالقانی، نیکوگفتار کارشناس ارشد بخش فلوسایتومتری سازمان انتقال خون ایران، آقای دکتر علی مقدم و مرکز پزشکی نوین تشکر می‌کنم. هم‌چنین هزینه این طرح توسط دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]

References :

1- Confer DL. Unrelated marrow donor registries. Curr Opin Hematol 1997; 4: 408-12.
2- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989; 321: 1174-1178.
3- Ballen K, Broxmeyer HE, McCullough J, Piaciabello W, Rebulla P, Vefaillie CM. Current status of cord blood banking and transplantation in the United States and Europe. Bio Blood Marrow Transplant 2001; 7: 635-45.
4- Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. Curr Opin Oncol 2002; 14: 160-4.
5- Barker JN, Krepski TP, Defor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor Hematopoietic stem cells: avability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. Biol Blood Marrow Transplant 2002; 8: 257-60.
6- Rocha V, Wagner JE, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 2000; 342: 1846-54.
7- Gluckman E. Current status of umbilical cord blood Hematopoietic stem cell transplantation. Exp Hematol 2000; 28: 1197-205.
8- Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. Onco Hematol 2003; 48: 35-43.
9- Tse W, Laughlin M. Umbilical Cord Blood Transplantation: A New Alternative Option. Hematology 2005; 377-383.
10- Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesidi A. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. J Cell Sci 2003; 116: 1827-1835.
11- Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived Mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. J Hematother Stem Cell Res 2000; 9: 841-848.
12- Angelopoulou M, Novelli E, Grove JE, Rinder HM. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoieisis and megakaryocytopoeisis in NOD/SCID mice. Exp Hematol 2003; 31:413-420.
13- Koc¸ ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. Bone Marrow Transplant 2001; 27: 244-255.
14- Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI. Transplantation of enriched CD34-positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: influence of CD34-positive peripheral-blood progenitors and growth factors on engraftment. J Clin Oncol 1994; 12: 28-36.
15- Brugger W, Henschler R, Heimfeld S. Positively selected autologous blood CD34+ cells and unseparated peripheral blood progenitor cells mediate identical hematopoietic engraftment after high-dose VP16, ifosfamide, carboplatin, and epirubicin. Blood 1994; 84: 1421-1426.
16- Gorin N C, Lopez M, Laprote J P. Preparation and successful engraftment of purified CD34+ bone marrow progenitor cells in patients with non-Hodgkin's lymphoma. Blood 1995; 85: 1657-1654.
17- Shiller G, Vescio R, Freytes C. Transplantation of CD34+ peripheral blood progenitor cells after high-dose chemotherapy for patients with advanced multiple myeloma. Blood 1995; 86: 390-397.
18- Aversa F, Tabilio A, Terenzi A. Successful engraftment of T cell-depleted haploidentical 'three-loci' incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. Blood 1994; 84: 3948-3955.
19- Bensinger WI, Buckner CD, Shannon-Dorcy K. Transplantation of allogeneic CD34+ peripheral blood stem cells in patients with advanced hematologic malignancy. Blood 1996; 88: 4132-4138.
20- Lemoli RM, Fortuna A, Motta MR. Concomitant mobilization of plasma cells and hematopoietic progenitors into peripheral blood of multiple myeloma patients: positive selection and transplantation of enriched CD34+cells to remove circulating tumor cells. Blood 1996; 87: 1625-1634.
21- Link J, Arseniev L, Bahre O. Transplantation of allogeneic CD34+ blood cells. Blood 1996; 87: 4903-4909.
22- Oudenrijn S, Borne V, Haas M. Differences in megakaryocyte expansion potential between CD34+ stem cells derived from cord blood, peripheral blood, and bone marrow from adults and children. Exp Hematol 2000; 28: 1054-1061.
23- Weekx SFA, Van Bockstaele DR, Plum J. CD3411CD382 and CD341CD381 human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hematopoietic cytokines depending on the ontogenic source. Exp Hematol 1998; 26:1034.
24- Angelopoulou M, Novelli E, Joanna E, Henry M, Civin C, Cheng L, *et al*. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. Exp Hematol 2003; 31: 413-420.
25- Fibbe WE, Noort WA, Schipper F, Willemze R. Ex vivo expansion and engraftment potential of cord blood-derived CD34+ cells in NOD/SCID mice. Ann NY Acad Sci 2001; 938: 9-17.
26- Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. J Cell Physiol. 1998; 176: 57-66.
27- McNiece IK, Almeida-Porada G, Shpall EJ, Zanjani E. Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engrafting potential. Exp Hematol 2002; 30: 612–616.
28- Mbalaviele G, Jaiswal N, Meng A, Cheng L, Van Den Bos C, Thiede M. Human mesenchymal stem cells

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]

promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors. Endocrinology 1999; 140: 3736-3743.
29- Bonnet D, Bhatia M,Wang JC, Kapp U, Dick JE. Cytokine treatment or accessory cells are required to initiate engraftment of purified primitive human hematopoietic cells transplanted at limiting doses into NOD/SCID mice. Bone Marrow Transplant 1999; 23: 203-209.
30- Bittencourt MC, Perruche S, Contassot E. Intravenous injection of apoptotic leukocytes enhances bone marrow engraftment across major histocompatibility barriers. Blood 2001; 98: 224-230.
31- Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. Curr Opin Hematol 2000; 7: 358-363.
32- Noort W, Kruisselbrink A. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34_cells in NOD/SCID mice. Exp Hematol 2002; 30: 870.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]

خون
فصلنامه پژوهشی

Evaluation of cotransplantation of human mesenchymal stem cells and umbilical cord blood CD34$^+$ cells with CFU-S assay

Delalat B.[1](MS), Pourfathollah A.A.[1,3](PhD), Movassaghpour A.A.[2](MS), Soleimani M.[1](PhD), Mozdarani H.[1](PhD), Kaviani S.[2](PhD), Rasi Ghaemi S.[1](MS)

[1]School of Medical Sciences,Tarbiat Modarres University
[2]Faculty of Medicine ,Tabriz University of Medical Sciences
[3]Iranian Blood Transfusion Organization - Research Center

Abstract

Background and Objectives

Umbilical cord blood (UCB) contains a high number of primitive progenitor cells for transplantation. However, the rate of UCB CD34$^+$ stem cell engraftment is low. In this study we examined the effect of human MSCs (mesenchymal stem cell) on engraftment of human UCB-derived CD34$^+$ cells in irradiated Balb/c mice.

Materials and Methods

Human UCB CD34$^+$ cells were obtained from full-term normal deliveries by immunomagnetic techniques and MSCs were isolated by a standard methodology from bone marrow aspirates. Isolated MSCs were evaluated for cell-surface antigens of CD166 and CD105 by flowcytometry. The absolute count of CD34$^+$ UCB stem cells was also determined by flowcytometry. Irradiated (7 Gy) Balb/c mice were transplanted intravenously with 0.2 to 1.0 $\times 10^6$ human UCB CD34$^+$ cells in the presence or absence of 0.25 to 1 $\times 10^6$ human bone marrow-derived MSCs. The mice in every group on day 11 after transplantation were killed and their spleen dissected. In every group, colony assay and H and E staining were performed. To make sure of the presence of human stem cells in spleen colonies, UCB CD34$^+$ cells were labeled with super paramagnetic iron oxide (SPIO) before transplantation. The colonies in spleen then underwent Prussian blue staining. In the statistical analyis, Kruskal-Wallis test using SPSS software was employed to determine the number of colonies.

Results

Flowcytometry assay showed that after purification, 90% of the cells were CD34$^+$ and 96% marker positive for MSCs. Viablity of cells was 100%**.** Cotransplantation of low doses of UCB CD34$^+$ cells (0.2 and 0.3 $\times 10^6$) and MSC (0.5 and 1 $\times 10^6$) resulted in a significant increase of the number of colony forming units spleen, in comparison with the engraftment of UCB CD34$^+$ stem cells without MSC after 11 days ($p<0.01$). Prussian blue staining showed the Fe^{+2} granules in UCB stem cells. This indicated that cells in the colonies were engrafted UCB CD34$^+$ stem cells.

Conclusions

The results showed that cotransplantation of MSC with UCB CD34$^+$ cells promotes engraftment of UCB CD34$^+$ cells.

Key words: Stem cell, Cotransplantation, Umbilical cord blood, Mesenchymal stem cell
SJIBTO 2006; 3(3): 343-353
Received: 28 Mar 2006
Accepted: 14 Oct 2006

Correspondence: Pourfathollah A.A. PhD of Immunology. Tarbiat Modarres University.
P.O.Box: 14155-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88011001; Fax : (+9821)88013030
E-mail: *pourfa@modares.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-16]