

# خون

فصلنامه علمی پژوهشی  
دوره ۳ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۳-۱۴۰۲ (۸۵)

## ارزیابی پیوند هم زمان سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی و سلول های CD34<sup>+</sup> خون بند ناف به موش c/Balb اشعه دیده با روش سنجش کلونی طحال S-CFU

بهمن دلالت<sup>۱</sup>، دکتر علی اکبر پورفتح الله<sup>۲</sup>، دکتر علی اکبر موشق پور<sup>۳</sup>، دکتر مسعود سلیمانی<sup>۴</sup>، دکتر حسین مزدارانی<sup>۵</sup>،  
دکتر سعید کاویانی<sup>۶</sup>، ثریا راثی قائمی<sup>۷</sup>

### چکیده

سابقه و هدف

خون بند ناف حاوی تعداد زیادی سلول های پیش ساز ابتدایی است که برای پیوند بالینی استفاده می شوند ولی در صد موفقیت پیوند این سلول های بنیادی پایین است. لذا در این مطالعه سلول های CD34<sup>+</sup> هم زمان با سلول های بنیادی مزانشیمی (MSC) به موش های c/Balb اشعه دیده، پیوند زده شد و نتایج به صورت شمارش تعداد کلون در سطح طحال ارزیابی گردید.

### مواد و روشها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. نمونه گیری به روش تصادفی انجام شد. سلول های CD34<sup>+</sup> خون بند ناف انسانی از نمونه خون بند ناف به روش ایمونوگنتیک و MSC از مغز استخوان طبیعی انسان جدا شد. MSC از نظر مارکرهای سطحی CD166 و CD105 و در صد خلوص سلول های CD34<sup>+</sup> با فلوزایوتومتری ارزیابی شد. سلول های CD34<sup>+</sup> با دوز  $1 \times 10^6$  تا  $1 \times 10^7$  به طور هم زمان با MSC با دوز  $2 \times 10^6$  تا  $1 \times 10^7$  به موش ۶ تا ۸ هفتاهی اشعه دیده (7 Gy) پیوند شد. پس از گذشت ۱۱ روز، تعداد کلون ها در سطح طحال شمارش و به روش هماتوکسیلین و اتوژین (H&E) رنگ آمیزی شد. جهت ارزیابی وجود سلول های CD34<sup>+</sup> انسانی در کلون موجود در طحال، این سلول ها با ذرات آهن (SPIO) نشان دار شده و به موش اشعه دیده تزریق شدند. طحال این گروه به روش آبی پروس رنگ آمیزی شد. در آنالیز آماری جهت بررسی تعداد کلون از آزمایش کروسبکال - والیس با نرم افزار SPSS استفاده شد.

### یافته ها

ارزیابی فلوزایوتومتری، در صد سلول های تهیه شده از خون بند ناف و مغز استخوان را برای سلول های بنیادی CD34<sup>+</sup> حدود ۹۰٪ و MSC را بیش از ۹۶٪ نشان داد و ۱۰۰ در صد سلول ها زنده بودند. تعداد کلون های طحال در پیوند هم زمان دوز های  $3 \times 10^6$  و  $2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> و دوز های  $1 \times 10^6$  و  $0.5 \times 10^6$  MSC به طور معنی دار در مقایسه با سایر گروه ها افزایش یافت ( $p < 0.01$ ). گرانول های آهن با رنگ آمیزی آبی پروس در کلون های طحال مشاهده شد.

### نتیجه گیری

سلول های بنیادی مزانشیمی باعث تسریع پیوند سلول های CD34<sup>+</sup> می شود و استفاده از پیوند هم زمان سلول های بنیادی خون بند ناف به همراه سلول های بنیادی مزانشیمی می تواند موفقیت پیوند سلول های بنیادی را افزایش دهد.

**کلمات کلیدی:** سلول های بنیادی، پیوند هم زمان، خون بند ناف، سلول های مزانشیمی

تاریخ دریافت: ۱۱/۱/۸۵

تاریخ پذیرش: ۲۲/۷/۸۵

- 
- ۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
  - ۲- مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی - استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - صندوق پستی ۱۱۱-۱۱۱۱-۱۱۱۱
  - ۳- PhD هماتولوژی - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
  - ۴- PhD هماتولوژی - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
  - ۵- PhD ژنتیک - استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
  - ۶- کارشناس ارشد آناتومی - دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

سلول‌های بنیادی خون‌ساز (HSC) نقش دارند. هم‌چنین سلول‌بنیادی 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 nonobese مگاکاریوپوئزیس را در موش NOD/SCID (diabetic/severe combined immunodeficient) افزایش می‌دهد (۱۲). با جداسازی پیش‌سازهای 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 اشعة دیده می‌باشد. نتیجه پیوند به صورت شمارش کلونی‌های تشکیل شده در طحال ارزیابی شد. برای تعیین دوز مناسب جهت پیوند CD34<sup>+</sup> و MSC، تاثیر دوزهای مختلف بر تعداد کلون‌ها در سطح طحال بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این پژوهش از موش‌های ماده (۶-۸ هفت‌ماهی) نژاد Balb/c ( مؤسسه پاستور ایران) استفاده شد که در شرایط ۱۲ ساعت روشناختی 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 ۵۰ ml که حاوی ۰/۱ ml ضد انعقاد هپارین (500 IU) بودند، جمع‌آوری شد و در

**نتیجه** پیوند سلول‌بنیادی خون‌ساز آلوژنیک، به عنوان روش درمانی برای تعدادی از بدخیمی‌های خونی پرخطر و سندرم‌های نارسایی مغز استخوان استفاده می‌شود. استفاده از پیوند سلول‌بنیادی خون‌ساز آلوژنیک به خاطر عدم دسترسی به آنتی‌ژن لکوسیت انسانی یکسان (HLA) بین اهداکننده و گیرنده، محدودیت دارد. علیرغم افزایش تعداد HLA سازگار برای بسیاری از بیماران پایین است. علاوه بر این، بیماری پیوند علیه میزان (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 سرتاسر جهان برای پیوند خویشاوند و غیر خویشاوند به وجود آمدند (۳). تاکنون بیش از ۲۰۰۰ بیمار تحت عمل پیوند UCB قرار گرفته‌اند (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 درصد HLA جهت انتخاب اهدا کننده و گیرنده می‌باشد (۶-۸). مطالعات متعددی که جهت کشف ماهیت سلول‌بنیادی 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

در محیط DMEM (جیکو) محتوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS (جیکو) در انکوباتور با  $CO_2$ ٪ ۵ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 رنگ آمیزی 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.

$$\frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد کل سلول‌های زنده و مرده}} \times 100 = \text{درصد زنده بودن سلول‌ها}$$

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

محتويات یک چاهک با پیپت پاستور در یک لوله اپندروف ۱/۵ ml خالی شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ 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 سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه نگهداری شد و با ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS حاوی پارافرم آلدئید (۱٪) فیکس شد. جهت نمونه کترل به جای آنتی‌بادی  $CD34$  FTIC از محلول کترل منفی (IgG1 موش) استفاده شد. برای انجام فلوسایتومنتری، سلول‌ها به بخش فلوسایتومنتری سازمان انتقال خون ایران فرستاده شدند.

دمای کمتر از ۱۰ درجه سانتی گراد 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 بند ناف به نسبت حجمی ۱ به ۴ هیدروکسی اتیل استارچ (فری فلکس - آلمان) در شرایط استریل اضافه شد و پس از رسوب گلوبول‌های قرمز، محلول رویی را که محلول زرد رنگی است برداشته و هم حجم محلول باقی‌مانده، PBS (بیوتک - آلمان) اضافه شد و روی فایکول (آلمان، inno-TRAin) برده و به مدت ۴۰ دقیقه با دور ۴۰۰ G (۱۴۱۰ rpm) سانتریفیوژ 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 - 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 ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰۰ G سانتریفیوژ نمودیم. سپس به مدت ۵ دقیقه با EDTA (بیوتک - آلمان)، محلول PBS حاوی  $CD34^+$  با استفاده از ستون مینی مکس (بیوتک - 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

### تعیین دوز سلولی مناسب

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

برای انتخاب دوز سلولی مناسب،  $CD34^+$  از  $10^5$  تا  $10^6$  سلول و سلول‌های بنیادی مزانشیمی از  $10^6 \times 10^6$  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 بزشکی نوین منتقل شده و در آنجا تحت تابش اشعه گاما قرار گرفتند. به هر موش  $7\text{Gy}$  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 دیده که هیچ سلولی به آن‌ها تزریق نشد، (ب) موش‌هایی که فقط  $2 \times 10^5$  و  $3 \times 10^5$  سلول  $CD34^+$  UCB دریافت کردند، (ج) گروهی که فقط  $1 \times 10^6$  و  $0.5 \times 10^6$  سلول  $MSC$  به آن‌ها تزریق شد، (د) گروهی که  $2 \times 10^5$  سلول  $CD34^+$  UCB به همراه  $1 \times 10^6$   $MSC$  به آن‌ها پیوند زده شد، (ه) گروهی که  $3 \times 10^5$  سلول  $CD34^+$  UCB به همراه  $5 \times 10^5$  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 پرسون رنگ آمیزی شد. سلول‌ها از طریق رگ دمی به آرامی به درون رگ تزریق

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 FITC و  $CD166$  PE و  $CD105$  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 نوبار، نمونه جمع‌آوری شده به مدت ۵ دقیقه در دور  $400\text{G}$  ( $1410\text{rpm}$ ) سانتریفوژ گردید. مایع رویی برداشته و با استفاده از PBS به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد به طوری که هر  $100\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر حاوی  $2 \times 10^5$  سلول  $CD34^+$  بود. سلول‌ها توسط سرنگ انسولین شماره ۲۷ برداشته شد.

### آماده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ( $MSC$ ):

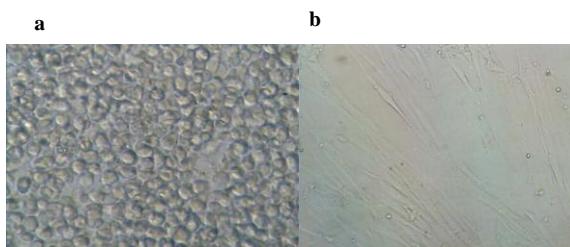
از آنجایی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبنده هستند و به کف فلاسک می‌چسبند برای جداسازی آن‌ها از کف فلاسک، ابتدا باستی محیط کشت را به طور کامل برداشته و با استفاده از محلول PBS حاوی  $EDTA$  آن را شستشو داده سپس یک میلی‌لیتر آنزیم تریپسین حاوی  $25\text{ }\mu\text{l}$  به فلاسک اضافه نموده و به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شود.

بعد از آن محیط کشت DMEM حاوی  $FBS$  به آن افزوده و بعد از پی‌پتاز نمودن، سوسپانسیون سلولی در یک لوله فالکون  $50\text{ ml}$  جمع‌آوری می‌گردد و بعد از شمارش سلولی با لام نوبار، نمونه به مدت ۵ دقیقه در دور  $400\text{G}$  ( $1410\text{rpm}$ ) سانتریفوژ و مایع رویی برداشته می‌شود. رسوب سلولی حاصل با PBS به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد به طوری که هر  $100\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر حاوی  $5 \times 10^5$  سلول بنیادی مزانشیمی بود. سلول‌ها توسط سرنگ انسولین شماره ۲۷ برداشته شد.

خواهد شد.  
آنالیز آماری:  
جهت بررسی تعداد کلون از آزمایش کروسکال - والیس با نرم افزار SPSS استفاده شد.

### بافت‌ها

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 زواید سیتوپلاسمی بلند در زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده بود (تصویر ۱).



تصویر ۱. a: سلول‌های  $CD34^+$  با بزرگنمایی  $\times 1000$ ، b: سلول‌های MSC با بزرگنمایی  $\times 1000$

رنگ آمیزی تریپان بلو 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، مارکر  $CD34$  را در سطح خود بروز داده بودند.

بر اساس نتایج به دست آمده، دوز سلولی  $2 \times 10^5$  و  $2 \times 10^5$  از سلول‌های  $CD34^+$  UCB و دوز سلولی  $5 \times 10^5$  و  $1 \times 10^6$  از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت پیوند مناسب بود (جداول ۱ و ۲).

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

نشان دار کردن سلول‌های  $UCB CD34^+$  با ذرات آهن: برای نشان دار کردن سلول‌های  $CD34^+$  از Super Para magnetic Iron Oxide(SPIO) استفاده شد.

مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول SPIO و ۶ میکرولیتر از محلول پروتامین را با  $0/5$  میلی لیتر محیط کشت استم لاین حاوی  $2 \times 10^6$  سلول  $CD34^+$  مخلوط کرده و پس از گذشت یک شبانه روز، سلول‌ها برداشته و بعد از سه مرتبه شستشو با PBS EDTA برای تزریق به موش اشعه دیده آماده شدند.

### سنجه 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 تشریع، تعداد کلون‌های موجود بر سطح رویی و زیرین طحال شمارش شدند.

طرز آماده‌سازی بافت طحال جهت میکروسکوپ نوری: طحال خارج شده را با فرمالین  $10\%$  به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق فیکس کرده و پس از تهیه برش‌های بافتی با ضخامت  $4\mu\text{m}$ ، برش‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین الکلی رنگ آمیزی شدند. در این رنگ آمیزی، هسته آبی و سیتوپلاسم به رنگ قرمز قابل مشاهده است.

روش رنگ آمیزی آبی پروس برای نشان دادن آهن: لام‌های دیارافینه شده تا مرحله آبدی پیش برد و با محلول فری‌سیانید پتابسیم  $(25\% / 5\text{ میلی لیتر})$  و اسیدهیدروکلریک  $(25\% / 5\text{ میلی لیتر})$  و ائوزین رنگ شد. در این رنگ آمیزی گرانول‌های آهن به رنگ آبی تیره و سیتوپلاسم و هسته به رنگ قرمز تا صورتی مشخص

جدول ۲: نتایج حاصل از پیوند (تریق) هم‌زمان سلول‌های CD34<sup>+</sup> به همراه MSC جهت انتخاب دوز سلولی مناسب

تعداد کلون	حداکثر تعداد	حداکل	میانگین تعداد کلون	تعداد سلول	تعداد سلول CD34 <sup>+</sup> تزریق شده
			Mean ± SD	MCS	تزریق شده
۱۲	۶	۹ ± ۳	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	
۳۷	۳۲	$36 \pm 2/1$	$1 \times 10^6$	$2 \times 10^5$	
۵۴	۳۸	$44 \pm 8/3$	$5 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	
۴۸	۲۶	$32 \pm 11$	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	
۲۲	۱۱	$18 \pm 6$	$5 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	



تصویر ۲. طحال جدا شده از موش ماده نژاد a: طحال طبیعی b: طحال اشعه خورده 7Gy c: طحال موشی که علاوه بر سلول‌های CD34<sup>+</sup>, سلول‌های MSC را هم‌زمان دریافت نموده است، d: طحال موشی که فقط سلول CD34<sup>+</sup> دریافت نموده است.

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

تعداد کلون	حداکثر تعداد	حداکل	میانگین تعداد کلون	تعداد سلول	تعداد سلول CD34 <sup>+</sup> تزریق شده
			Mean ± SD	MCS	تزریق شده
۴۸	۲۶	$29/2 \pm 8/7^a$	$1 \times 10^7$	$2 \times 10^5$	
۱۰	۵	$7/2 \pm 1/9$	-	$2 \times 10^5$	
۷۷	۴۳	$55/6 \pm 12/3^b$	$5 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	
۱۶	۱۰	$14/2 \pm 2/4$	-	$3 \times 10^5$	
-	-	- *	$5 \times 10^6$	-	

a: وجود اختلاف معنی‌دار با گروه تزریق  $2 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> بدون تزریق p<0.01 MCS در سطح  
b: وجود اختلاف معنی‌دار با گروه تزریق  $3 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> بدون تزریق p<0.01 MCS در سطح

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

تعداد سلول CD34 <sup>+</sup> تزریق شده	میانگین تعداد کلون	حداکل تعداد	میانگین تعداد کلون	تعداد سلول
	Mean ± SD		کلون	کلون
$1 \times 10^5$	$5 \pm 0/7$	۶	۴	$1 \times 10^5$
$2 \times 10^5$	$7 \pm 2/6$	۱۰	۵	$2 \times 10^5$
$3 \times 10^5$	$13 \pm 3$	۱۶	۱۰	$3 \times 10^5$
$5 \times 10^5$	$24 \pm 6$	۳۰	۱۸	$5 \times 10^5$
$6 \times 10^5$	$26 \pm 3$	۲۹	۲۳	$6 \times 10^5$
$8 \times 10^5$	$23 \pm 9/1$	۳۱	۱۳	$8 \times 10^5$
$1 \times 10^6$	$8 \pm 4$	۱۲	۴	$1 \times 10^6$
$2 \times 10^6$	$5 \pm 2$	۷	۳	$2 \times 10^6$
$5 \times 10^6$	$3 \pm 1$	۴	۲	$5 \times 10^6$
$10 \times 10^6$	-	-	-	-

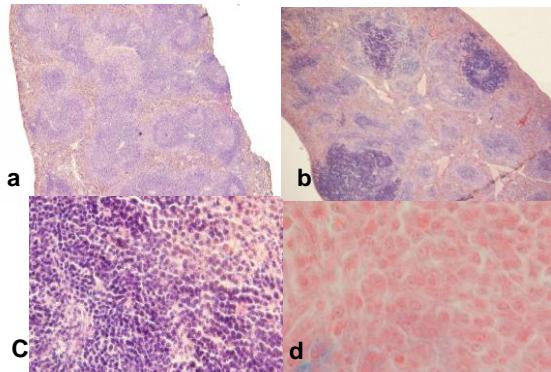
شمارش تعداد کلونی‌های طحال نشان داد که متوسط تعداد کلون‌ها در گروهی که فقط  $2 \times 10^5$  و  $3 \times 10^5$  سلول UCB CD34<sup>+</sup> دریافت کرده بودند به ترتیب  $7/2$  و  $14/2$  در گروهی که  $2 \times 10^5$  سلول UCB CD34<sup>+</sup> به همراه  $1 \times 10^5$  MSC به آن‌ها پیوند زده شد به طور متوسط  $5 \times 10^5$  سلول UCB CD34<sup>+</sup> به همراه  $5 \times 10^5$  سلول MSC به آن‌ها تزریق شد به طور متوسط  $55/6$  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 بازویل 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<sup>+</sup> نشان دار شده با SPIO و رنگ‌آمیزی آن‌ها با آبی پروس، وجود سلول‌های بنیادی CD34<sup>+</sup> انسانی پیوند شده را تایید کرد و گرانول‌های آهن به شکل ذرات ریز به رنگ آبی تیره مشخص شد (تصویر ۳).

نسبت به سلول‌های  $CD34^+$  جدا شده از سایر منابع، بالاتر و بیشتر است (۲۲، ۲۳).

در این تحقیق سلول‌های  $CD34^+$  (به تعداد  $1 \times 10^6$  تا  $0/2$  و  $MSC$ ) (به تعداد  $1 \times 10^6$  تا  $0/25$ ) به موش ماده  $6$  تا  $8$  هفته‌ای (Balb/c) به صورت هم‌زمان یا جداگانه پیوند زده شد و نتایج حاصل از پیوند به صورت کلونی در طحال ارزیابی شد. بررسی‌ها نشان داد که تعداد کلون در طحال در پیوند هم‌زمان دوزهای پایین  $CD34^+$  (یعنی  $2-3 \times 10^5$  و دوزهای  $1 \times 10^6-5 \times 10^6$  سلول بنیادی مزانشیمی، به طور معنی دار در مقایسه با گروههای دیگر افزایش یافت ( $p < 0.01$ ). یعنی حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث بهبود پیوند  $CD34^+$  شد. چنانچه در پیوند  $CD34^+$  به تنها ی چنین نتیجه‌ای حاصل نشد. هم‌چنین در پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی به تنها ی هیچ کلونی در طحال مشاهده نشد. بنابراین واضح است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی نقش حمایت کننده‌ای در تسريع و بهبود پیوند سلول‌های هماتوپوئیتیک  $CD34^+$  دارد. آنجلوپلتو و همکارانش در سال  $2003$  نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی چه به صورت اتو لوگ و چه به صورت آلوژنیک به میزان یکسان قادر به حمایت از پیوند سلول‌های هماتوپوئیتیک هستند و باعث افزایش پیوند سلول‌های  $CD34^+$  انسانی به موش NOD/SCID می‌شوند (۲۴). بنابراین می‌توان از سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوژنیک چهت پیوند در موارد عدم دست‌یابی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی خود فرد مثلاً به علت آلدگی با تومور استفاده کرد.

البته این افزایش در پیوند با محدود شدن دوز  $CD34^+$  به تعداد  $2-3 \times 10^5$  سلول  $CD34^+$ ، رابطه مستقیم داشت به طوری که با افزایش تعداد سلول‌های  $CD34^+$  جهت پیوند، تعداد کلون‌های به وجود آمده در طحال به طور معنی دار کاهش داشت. اگر چه نتیجه پیوند از نمونه‌ای به نمونه دیگر متفاوت است اما تعداد کلون‌ها در پیوند هم‌زمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌های  $CD34^+$  در همه نمونه‌ها نسبت به پیوند سلول‌های  $CD34^+$  به تنها ی، افزایش داشت و با محدود شدن دوزهای به کار گرفته، تعداد کلون‌ها به صورت معنی دار افزایش یافت.

\* در سایر گروه‌ها یعنی گروه‌های دریافت کننده مزانشیم به تنها ی و گروهی که هیچ گونه سلولی دریافت نکرد، کلونی بر سطح طحال دیده نشد.



تصویر ۳: نمای میکروسکوپی a: بافت طحال نرمال با بزرگنمایی  $\times 40$  b: بافت طحالی که سلول‌های  $CD34^+$  و سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت هم‌زمان دریافت نموده است با بزرگنمایی  $\times 40$  c: بافت طحالی که سلول‌های  $CD34^+$  و سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت هم‌زمان پیوند زده شده است با بزرگنمایی  $\times 400$  d: بافت طحال پیوند شده با سلول‌های  $CD34^+$  نشاندار شده با بزرگنمایی  $\times 400$  (گرانولهای بسیار ریز آهن به رنگ آبی تیره در سیتوپلاسم مشاهده می‌شود).

## بحث

در این بررسی از روش جداسازی ایمونومگنتیک جهت به دست آوردن تعداد بیشتری از سلول‌های  $CD34^+$  از خون بند ناف استفاده شد که به طور متوسط حدود  $5-5 \times 10^5$  سلول به ازای هر نمونه خون بند ناف جدا شد و درصد خلوص سلول‌های  $CD34^+$  با روش جداسازی ایمونومگنتیک پس از ارزیابی فلوسایتومتری بالای  $90\%$  بود. در حالی که در مطالعات گذشته درصد خلوص  $CD34^+$  جدا شده با سیستم جداسازی بیوتین - آویدین حدود  $50\%$  تا  $60\%$  بود (۲۱-۲۴). شاید خلوص بالای سلول‌های  $CD34^+$  با روش جداسازی ایمونومگنتیک به علت مقدار سلول‌های باردار شده‌ای است که تحت میدان مغناطیسی قوی در ستون باقی می‌مانند. همان‌طور که اشاره شد علاوه بر خون بند ناف، خون محیطی و مغز استخوان هم دارای سلول‌های  $CD34^+$  می‌باشند که درصد  $CD34^+$  جدا شده و هم‌چنین میزان تکثیر این سلول‌ها

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 CD34<sup>+</sup> UCB 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 ایمونوگتیک (سلول‌های CD34<sup>+</sup> یک بار از ستون عبور داده شد) درصد خلوص سلول‌های CD34<sup>+</sup> جدا شده از خون بند ناف به بیش از ۹۰٪ افزایش می‌یابد.

۲- پیوند هم‌زمان سلول‌های CD34<sup>+</sup> به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث افزایش تعداد کلون در طحال موش، در مقایسه با پیوند سلول‌های CD34<sup>+</sup> به تنها بیان می‌شود.

۳- سلول‌های بنیادی مزانشیمی به تهایی قادر به ایجاد کلون و در نتیجه پدیده خونسازی نیستند و تنها نقش حمایت کنندگی از سلول‌های CD34<sup>+</sup> جهت پیوند را دارند.

۴- محدود شدن دوز سلول‌های CD34<sup>+</sup> به ۲-۳×۱۰<sup>۵</sup> باعث افزایش تعداد کلون در طحال می‌شود. در نتیجه پیوند هم‌زمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی همراه با سلول‌های CD34<sup>+</sup> باعث افزایش تعداد کلون در طحال شده است.

۵- با رنگ‌آمیزی Prussian blue مشخص شد که سلول‌های CD34<sup>+</sup> انسانی در طحال، کلونی تشکیل داده‌اند.

### تشکر و قدردانی

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

مشابه همین نتایج را فیله و همکارانش در سال ۲۰۰۱ و آنجلوپولو و همکارانش در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند (۲۴، ۲۵). 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 میلوبیوتی، مگاکاربیوسیتی، لفوئیدی و ماکروفازی با فلورسایتومتری 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 ایترولوکین 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 (۲۶-۲۸). 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 (۲۹، ۳۰). نتایج به دست آمده از این مطالعه توسط تحقیقات گسترده‌ای که بر روی پیوند هم‌زمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های CD34<sup>+</sup> صورت گرفته، به اثبات رسیده است (۳۱، ۳۲).

مطالعه میکروسکوپی کلونی‌های طحال موش پیوند شده پس از رنگ‌آمیزی E & H نشان داد که مناطقی که کلون وجود دارد به شدت رنگ هماتوکسیلین را به خود گرفته و خاصیت بازووفیلیک شدید را از خود نشان می‌دهند که این نشان دهنده 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 - اتوزین 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





## 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, Krebski TP, Defor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor Hematopoietic stem cells: availability 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- Grontos 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 myelopoiesis and megakaryocytopoiesis 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, Laporte 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 haploididentical '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- Oudenhijn 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 ontogenetic 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

- 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<sub>+</sub> cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002; 30: 870.

## Evaluation of cotransplantation of human mesenchymal stem cells and umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells with CFU-S assay

Delalat B.<sup>1</sup>(MS), Pourfathollah A.A.<sup>1,3</sup>(PhD), Movassaghpoor A.A.<sup>2</sup>(MS), Soleimani M.<sup>1</sup>(PhD), Mozdarani H.<sup>1</sup>(PhD), Kaviani S.<sup>2</sup>(PhD), Rasi Ghaemi S.<sup>1</sup>(MS)

<sup>1</sup>School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences

<sup>3</sup>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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> cells in irradiated Balb/c mice.

#### Materials and Methods

Human UCB CD34<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> UCB stem cells was also determined by flowcytometry. Irradiated (7 Gy) Balb/c mice were transplanted intravenously with 0.2 to 1.0 × 10<sup>6</sup> human UCB CD34<sup>+</sup> cells in the presence or absence of 0.25 to 1 × 10<sup>6</sup> 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<sup>+</sup> cells were labeled with super paramagnetic iron oxide (SPIO) before transplantation. The colonies in spleen then underwent Prussian blue staining. In the statistical analysis, 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<sup>+</sup> and 96% marker positive for MSCs. Viability of cells was 100%. Cotransplantation of low doses of UCB CD34<sup>+</sup> cells (0.2 and 0.3 × 10<sup>6</sup>) and MSC (0.5 and 1 × 10<sup>6</sup>) resulted in a significant increase of the number of colony forming units spleen, in comparison with the engraftment of UCB CD34<sup>+</sup> stem cells without MSC after 11 days ( $p < 0.01$ ). Prussian blue staining showed the Fe<sup>2+</sup> granules in UCB stem cells. This indicated that cells in the colonies were engrafted UCB CD34<sup>+</sup> stem cells.

#### Conclusions

The results showed that cotransplantation of MSC with UCB CD34<sup>+</sup> cells promotes engraftment of UCB CD34<sup>+</sup> 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 Modares University. P.O.Box: 14155-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88011001; Fax : (+9821)88013030  
E-mail: pourfa@modares.ac.ir