Sci J Iran Blood Transfus Organ 2024;21 (3): 197-206

Original Article

The effect of mild hypoxia on Stemness of $CD34^+$ cells isolated from umbilical cord blood cocultured with human bone marrow mesenchymal stem cells

Mohammadali F.[1], Abroun S.[2], Atashi A.[3]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute For Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2]Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran

Abstract

Background and Objectives

Cord blood (CB) is a rich source of Hematopoietic stem cells (HSCs). Beside the advantage the main disadvantages of CB are the limited number of stem cells and delayed engraftment. Identifying strategies to enhance expansion and maintain stemness of HSCs can improve transplant efficiency. The goal of this study was to examine different culture conditions on *HOXB4*, *c-Myc*, *Nanog*, *Sox2* gene expression of CB-HSCs.

Materials and Methods

In this interventional study, human cord blood $CD34^+$ HSC, were cultured in the serum-free medium supplemented with cytokines (TPO, FLT3L, SCF) with/without bone marrow mesenchymal stem cell (MSC) in 21% O_2 and 5% O_2 for 7 days. In day 7 the expression of, *HOXB4*, *c-Myc*, *Nanog*, *Sox2* genes were evaluated by Real time PCR. The data analyzed using the ANOVA test and Value < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Highest rates of *HOXB4*, *c-Myc*, *Nanog*, *SOX2* mRNA were seen in coculture of HSC with bone marrow MSC at 5% O_2. Our findings demonstrated statistically significant increase of expansion and stemness markers in 5% O_2 tension versus 21%.

Conclusions

Bone Marrow (BM) -MSC and 5% O_2 combination enhanced stemness of HSC and better mimicked the niche microenvironment conditions.

Key words: Cord Blood, Hematopoietic Stem Cells, Mesenchymal Stem Cell, Coculture, Hypoxia

Received: 8 Jun 2024
Accepted: 27 Aug 2024

Correspondence: Abroun S., PhD of Hematology and Blood Banking. Professor of Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14155-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82883860; Fax: (+9821) 82884507
E-mail: *Abroun@modares.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-01]

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۲۱ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۳ (۲۰۶-۱۹۷)

مقاله پژوهشی

تاثیر هیپوکسی خفیف بر بنیادینگی سلول‌های $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف در هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان

فاطمه محمدعلی[۱]، سعید آبرون[۲]، امیر آتشی[۳]

چکیده

سابقه و هدف

خون بند ناف منبعی غنی از سلول‌های بنیادی خونساز است که علاوه بر مزایای فراوان، معایب آن شامل تعداد محدود سلول‌های بنیادی و پیوندپذیری با تأخیر می‌باشد. مسلماً شناسایی استراتژی‌هایی که در کنار افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز یا HSC ، باعث حفظ بنیادینگی آن شوند، می‌تواند اثربخشی پیوند را افزایش دهد. هدف از این مطالعه، بررسی شرایط کشت مختلف در شرایط هیپوکسی (غلظت اکسیژن ۵٪) بر بیان ژن‌های *HOXB4* ، *c-Myc* ، *Nanog* و *SOX2* در سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مداخله‌ای، سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف انسان جداسازی گردید و در محیط کشت بدون سرم در حضور ترکیب سیتوکاینی (TPO، FLT3L ، SCF) با یا بدون حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (MSC) در غلظت اکسیژن ۲۱٪ و ۵٪ به مدت ۷ روز کشت داده شد (در ۵ گروه مختلف). در روز ۷ بیان ژن‌های *HOXB4* ، *c-Myc* ، *Nanog* ، *SOX2* با Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها در ۳ بار مستقل انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA انجام و $p< ۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بیشترین بیان ژن‌های *HOXB4* ، *c-Myc* ، *Nanog* و *SOX2* در شرایط کشت HSC با MSC مغز استخوان در غلظت اکسیژن ۵٪ بود. نتایج مطالعه افزایش معنادار از نظر آماری در میزان تکثیر و بیان ژن‌های بنیادینگی را در غلظت اکسیژن ۵٪ در مقایسه با ۲۱٪ نشان داد.

نتیجه گیری

ترکیب سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و غلظت اکسیژن ۵٪ باعث افزایش ظرفیت بنیادینگی HSC می‌شود و شرایطی شبیه به فضای نیچ را فراهم می‌آورد.

کلمات کلیدی: **خون بند ناف، سلول‌های بنیادی خونساز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هم‌کشتی، هیپوکسی**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۶

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

۲- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون ـ استاد دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۵۵

۳- PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شاهرود ـ شاهرود ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-01]

مقدمه

سلول های بنیادی خونساز (Hematopoietic : HSC Stem Cell) با قابلیت خودنوسازی و تمایز به تمامی رده‌های خونی بالغ، باعث حفظ سیستم ایمنی و هموستاز در تمام طول عمر موجود زنده می‌شوند (۱). به منظور جلوگیری از رد پیوند، سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان و خون محیطی باید از نظر آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی (HLA : Human leukocyte antigen) با گیرنده پیوند سازگار باشند اما تنها ۳۰-۲۵ درصد بیماران قادر به تهیه سلول‌های بنیادی مغز استخوان از دهنده خویشاوند و یا غیرخویشاوند سازگار از نظر HLA می‌باشند (۲). خون بند ناف منبعی غنی از HSC می‌باشد و از آن جا که الزام کمتری برای سازگاری HLA نیاز دارد، استفاده از سلول‌های بنیادی خون بند ناف افزایش یافته است (۳).

با وجود تمام مزایای استفاده از خون بند ناف به علت حجم کم آن، تعداد سلول‌های بنیادی خون بند ناف تنها حدود ۱۰ درصد سلول‌های بنیادی موجود در نمونه مغز استخوان است که منجر به پیوندپذیری با تأخیر آن می‌شود (۴). برنامه ملی خون بند ناف (National Cord : NCBP Blood Program) اعلام کرده است که تنها ۲۰ درصد از واحدهای خون بند ناف حاوی مقادیر سلولی کافی برای یک بیمار ۷۵ کیلوگرمی می‌باشند (با توجه به آستانه مقدار سلول بیشتر از $۲/۵ \times ۱۰^{۷}$ سلول‌های هسته‌دار کل یا TNCs : Total nucleated cell count به ازای کیلوگرم)(۵). بنابراین پیوند خون بند ناف به طور معمول و موفقیت‌آمیزتری در پیوندهای کودکان استفاده می‌شود. بیماران دریافت‌کننده خون بند ناف با میزان سلول‌های تک هسته‌ای کل کمتر از $۱/۸ \times ۱۰^{۷}$ و سلول‌های $CD34^{+}$ کمتر از $۱/۷ \times ۱۰^{۵}$ به ازای هر کیلوگرم وزن گیرنده، پیوندپذیری و میزان بقای کمتری داشتند. یک راه برای غلبه بر این مشکل، پیوند هم‌زمان دو واحد خون بند ناف از دهنده‌های مناسب غیر خویشاوند است (۶). روش دیگر که در سال‌های اخیر به آن توجه بیشتری می‌شود، شناسایی عواملی است که باعث افزایش پیوندپذیری در کنار افزایش تعداد مطلق سلول‌های بنیادی موجود در خون بند ناف می‌شوند.

سلول‌های بنیادی خونساز با پیوندپذیری طولانی مدت و مورفولوژی اولیه به طور عمده در ناحیه اندوستئال مغز استخوان قرار دارند که ساختار عروقی ویژه‌ای دارد و فشار اکسیژن در این ناحیه کم است و نشان می‌دهد ریز محیط هیپوکسیک برای حفظ عملکرد صحیح HSC ضروری است (۷). مسلماً طراحی سیستم کشتی که تعاملات HSC با سلول‌های استرومایی نیچ را نشان دهد و شرایطی شبیه به فضای نیچ داشته باشد، در شناخت نیچ و حفظ HSC اولیه مفید خواهد بود.

فرضیه این تحقیق این گونه بود که هم کشتی HSC $CD34^{+}$ خون بند ناف با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان در شرایط هیپوکسی خفیف (اکسیژن ۵ درصد) منجر به تقلید فضای نیچ، حفظ سلول‌های اولیه‌تر، افزایش خودنوسازی و بنیادینگی HSC شود که می‌تواند بر پیوندپذیری با تأخیر HSC خون بند ناف غلبه کند. به منظور بررسی بنیادینگی سلول‌های بنیادی در این تحقیق به بررسی HSC اولیه با بیان $CD34^{+}$ و بررسی بیان ژن‌های *HOXB4* ، *c-Myc* ، *Nanog* و *SOX2* پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

پردازش خون بند ناف و استخراج سلول‌های $CD34^{+}$:

نوع مطالعه آزمایشگاهی مداخله‌ای و نوع نمونه‌گیری در دسترس بود. در هر بار انجام آزمایش، ۴ واحد کیسه خون از خون بند ناف نوزاد کامل پس از کسب رضایت‌نامه کتبی از والدین از مرکز خون بند ناف سازمان انتقال خون ایران و خون بند ناف رویان جمع‌آوری گردید. این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس به شماره ۴۵۰۶ تایید گردید. ۳ بار آزمایش‌ها به صورت مستقل تکرار شد. به طور خلاصه پس از جمع‌آوری نمونه خون بند ناف در ضد انعقاد CPD ، نمونه‌ها در دمای ۱۸ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد تا حداکثر ۱۲ ساعت فرآوری شدند. گلبول‌های قرمز با روش هیدروکسی اتیل استارچ ۶ درصد (گری‌فولد اسپانیا) رسوب داده شدند. سلول‌های تک هسته‌ای با سانتریفیوژ گرادیان حجم و فایکول هیپاک (لیمفودکس ـ اینوترین آلمان) جداسازی شدند. سلول‌های $CD34^{+}$ با ستون MACS (میلتنی بایوتک آمریکا) جداسازی شدند .خلوص سلول‌های $CD34^{+}$ با استفاده از آنتی‌بادی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-01]

FITC-CD34 (فارمین ژن) با روش فلوسایتومتری سنجیده شد.

کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان از مرکز تحقیقات بن یاخته (دپارتمان سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت بن یاخته، تهران، ایران) دریافت گردید. سه نمونه از سه فرد متفاوت در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS (جیبکو آمریکا) همراه با پنی‌سیلین (۰/۰۲۵ U/mL جیبکو BRL) و استرپتومایسین (۰/۰۲۵ U/mL جیبکو BRL) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. وقتی سلول‌ها به همشاری ۸۰٪-۷۰٪ رسیدند، تریپسینه شدند و در تعداد 1×10^4 Cell/cm^2 کشت داده شدند. سلول‌ها تا ۲-۴ پاساژ کشت داده شدند. خصوصیات مورفولوژیک و قابلیت تمایز استئوبلاستی و آدیپوسیتی مورد سنجش قرار گرفت. تمایز به استخوان با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و تمایز به چربی با رنگ‌آمیزی Oil red O انجام شد. سلول‌ها در تراکم 1×10^4 Cell/cm^2 در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند و به عنوان لایه فیدر استفاده شدند.

هم‌کشتی HSC با سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

سلول‌های $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف در پلیت ۲۴ خانه به تعداد 1×10^4 عدد چاهک/سلول به لایه فیدری که قبلاً کشت داده شده بود و به همشاری ۸۰-۷۰ درصد رسیده بود اضافه گردید. همراه با خارج نمودن محیط کشت DMEM از محیط کشت Stemline II (سیگما، آلمان) به همراه ترکیب سیتوکاینی FLT3-L (۵۰ ng/mL ORF ژنتیک ایسلند)، SCF (۵۰ ng/mL ORF ژنتیک ایسلند) و TPO (۵۰ ng/mL راکی‌هیل آمریکا) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 در شرایط مختلف اکسیژن ۵ و ۲۰ درصد برای ۷ روز کشت داده شدند. شرایط کشت مختلف به شرح ذیل بود:

در اولین شرایط کشت، سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف همراه با محیط کشت پایه بدون سرم Stemline II در حضور غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از سیتوکاین‌های FLT3L ، SCF و TPO کشت داده شد. در شرایط کشت دوم، سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف همراه با محیط کشت پایه بدون سرم Stemline II و بدون حضور سیتوکاین‌های فوق، به صورت مستقیم بر روی لایه فیدر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان کشت داده شد و در نهایت، در گروه سوم، سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف همراه با محیط کشت پایه بدون سرم Stemline II در حضور مخلوطی از سیتوکاین‌های فوق و برروی لایه فیدر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان کشت داده شد. علاوه بر شرایط کشت فوق در گروهی نیز سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف بدون سیتوکاین و لایه فیدر سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان گروه کنترل کشت داده شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA:

RNA سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک $CD34^+$ جدا شده با روش فنل ـ کلروفرم (Phenol-chloroform) از خون بند ناف (روز ۰) و سلول‌های جدا شده از شرایط کشت مختلف در روز ۷ با روش دستی استخراج گردید، سپس از روی آن cDNA (Primescript RT reagent Kit,Takara) ساخته شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در Real time PCR در جدول آورده شده است (جدول ۱).

انجام Real time PCR:

بیان کمی mRNA ژن‌های حاصل از نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف (روز ۰)، و سلول‌های کشت داده شده در شرایط مختلف (روز ۷) با استفاده از کیت آمپلیکون دانمارک انجام شد. به این ترتیب که ۱ میکرولیتر cDNA استخراج شده به همراه ۰/۳ میکرومول از آغازگرها و ۵ میکرولیتر از مستر میکس Real time PCR به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه دمایی شامل یک چرخه ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه بود. دمای آنیلینگ ۶۱ درجه سانتی‌گراد بود.

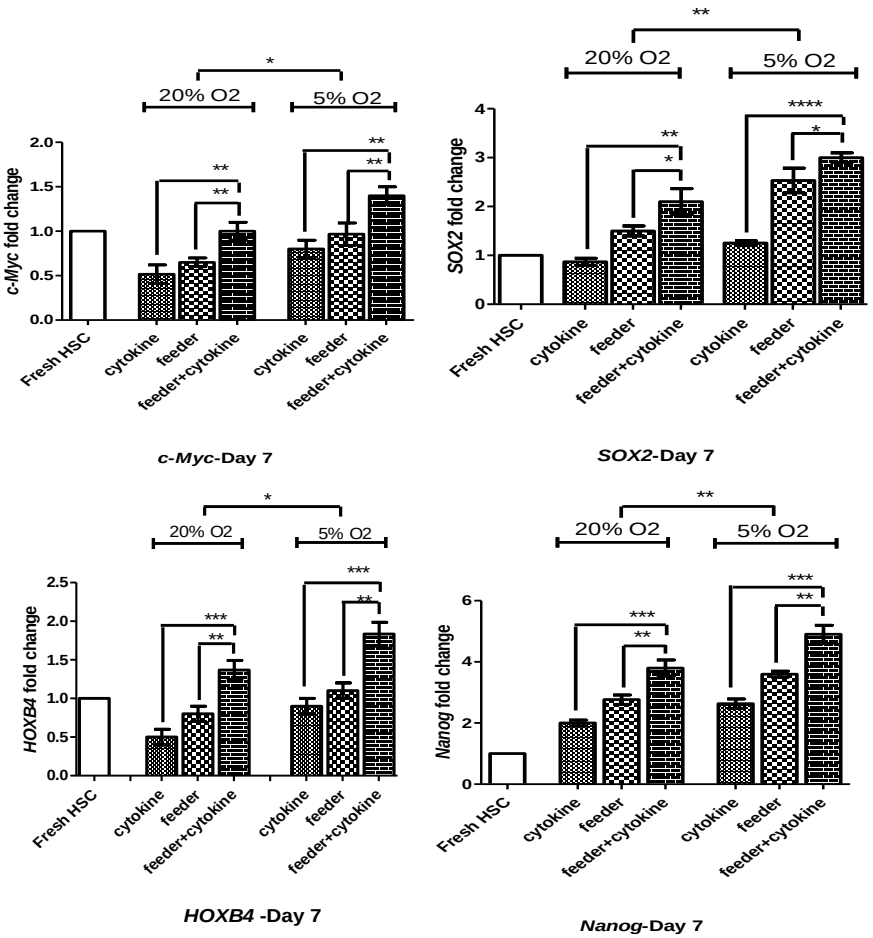
تجزیه و تحلیل آماری:

چرخه آستانه Ct. (threshold cycle) مربوط به واکنش‌ها

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-01]

جدول ۱: توالی، دمای آنیلینگ و طول آغازگرهای مورد استفاده

نام ژن	توالی	Tm آنیلینگ	طول
c-Myc-F	AGC GAC TCT GAG GAG GAA C	۵۹	۱۸۳
c-Myc-R	CTG CGT AGT TGT GCT GAT G	۵۷	
SOX2-F	GGA CTG AGA GAA AGA AGA GGA G	۶۲	۱۹۶
SOX2-R	GAA AAT CAG GCG AAG AAT AAT	۵۴	
Nanog-F	GCT AAG GAC AAC ATT GAT AGA AG	۵۷/۱	۱۲۸
Nanog-R	CTT CAT CAC CAA TTC GTA CTT G	۵۶/۵	
HOXB4-F	TGCAAAGAGCCCGTCGT-3′	۵۷/۴	۶۹
HOXB4-R	GGCGTAATTGGGGTTTACCG	۵۶/۴	
HPRT -F	CCTGGCGTCGTGATTAGTG	۶۰	۱۹۸
HPRT -R	TCAGTCCTGTCCATAATTAGTCC	۶۰	



نمودار ۱: نتایج quantitative Real Time PCR ژن‌های *Nanog* ، *HOXB4* ، *SOX2* ، *c-Myc* در روز ۷ در شرایط مختلف کشت و مقایسه آن با روز صفر (N= ۳). نتایج مقایسه بین گروه‌های مختلف و بین شرایط اکسیژن ۵٪ و ۲۱٪ با آزمون آماری ANOVA آنالیز گردید و نتایج $p<$ ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

(* : $p\leq$ ۰/۰۵ ، ** : $p\leq$ ۰/۰۱ *** : $p\leq$ ۰/۰۰۱ و **** : $p\leq$ ۰/۰۰۰۱)

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-01]

توسط نرم‌افزار دستگاه Real-time PCR استخراج و ثبت گردید. در نهایت اختلاف بیان نسبت به نمونه کنترل با فرمول Pfaffl محاسبه گردید و توسط نرم‌افزار GraphPad Parism 5 مورد آنالیز قرار گرفت (۸). نتایج به صورت بیان نسبی ژن (Relative Gene Expression) گزارش شدند. مقایسه بین دو گروه اکسیژن ۵٪ و ۲۱٪ و مقایسه بین سه گروه مختلف با روش آماری ANOVA انجام شد. مقادیر $p< ۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تایید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان:

سلول‌های بنیادی مزانشیمی با آنتی‌بادی بر علیه مارکرهای CD90,CD105,CD73,CD45 تعیین هویت شدند که از نظر CD90 ، CD105 و CD73 مثبت و از نظر CD45 منفی بودند (۹).

نتایج quantitative Real-time PCR ژن‌های *c-Myc* ، *SOX2* ، *Nanog* ، *HOXB4*:

میزان تغییرات بیان mRNA ژن‌های *c-Myc* ، *SOX2* ، *Nanog* و *HOXB4* در شرایط کشت مختلف در روز ۷ در نمودار آورده شده است (نمودار ۱). نتایج بررسی بیان ژن‌های بنیادینگی *c-Myc* ، *SOX2* ، *Nanog* و *HOXB4* نشان داد که بیشترین میزان بیان در شرایط کشت هم‌زمان سلول‌های مزانشیمی در حضور سیتوکاین در هر دو گروه اکسیژن ۲۰٪ و ۵٪ بود. بیان این ژن‌ها در شرایط کشت سیتوکاین به تنهایی کمتر از بیان آن در شرایط کشت سلول مزانشیمی به تنهایی بود. در کلیه موارد اکسیژن ۵٪ در مقایسه با اکسیژن ۲۰٪ بیان ژن بالاتری مشاهده شد و این تفاوت از نظر آماری معنادار بود ($p< ۰/۰۵$). در شرایط اکسیژن ۵ درصد نسبت به ۲۰ درصد افزایش معنادار بیان ژن‌های بنیادینگی شامل *HOXB4* (۱/۸–۱/۳ برابر)، *SOX2* (۱/۶–۱/۴ برابر)، *Nanog* (۱/۳–۱/۲ برابر) و *c-Myc* (۱/۹–۱/۴ برابر) در روز ۷ مشاهده شد.

بحث

خون بند ناف منبعی فراوان و در دسترس از سلول‌های بنیادی است که در زمینه تحقیقات و سلول درمانی کاربرد دارد. نتایج مطالعه ما نشان داد که سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک خون بند ناف که مارکر $CD34^+$ را بیان می‌کنند، در خون بند ناف حضور دارند. علت انتخاب جمعیت $CD34^+$ این است که این جمعیت بسیار هتروژن بوده و قابلیت تمایز و تعهد به همه رده‌ها را دارد. مطالعه‌های *in vitro* نشان می‌دهد که تقریباً تمام سلول‌های $CD34^+$ خاصیت مولتی‌پوتنتی و یا الیگوپوتنتی را دارند. حدود ۹۰ درصد سلول‌های $CD34^+$ مارکر CD38 را بیان می‌کنند که توانایی تبدیل به کلنی چند رده‌ای لنفوئیدی–میلوئیدی را دارد (۱۱–۱۰).

تعادل بین خودنوسازی و تمایز سلول‌های پروژنیتور خونساز توسط تعاملات خاصی در فضای مغز استخوان تنظیم می‌شود. انواع سلول‌های مختلف فاکتورهای محلول و اجزای ماتریکس خارج سلولی در نیچ حضور دارند (۱۳، ۱۲)، با این حال نقش اصلی را سلول‌های بنیادی مزانشیمی به علت خاصیت تمایز چند رده‌ای و تنظیم عملکرد HSC دارند (۱۴، ۱۳). نتایج مطالعه‌های مختلف نشان داده است که در مقایسه بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت خون بند ناف، مغز استخوان و چربی، چسبندگی HSC جدا شده از خون بند ناف به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بیش از همه بوده است (۹۰ درصد) (۱۵). به همین دلیل در این مطالعه جهت ارزیابی اثر هم‌کشتی بر میزان تکثیر و بنیادینگی سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف، این سلول‌ها را با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان کشت داده و به بررسی اثرات آن پرداختیم.

در این مطالعه سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف به مدت ۷ روز در شرایط کشت مختلف کشت داده شدند، علت انتخاب مدت زمان ۷ روز برای هم‌کشتی این بود که نگهداری طولانی در محیط بدون سرم با فاکتور منجر به تغییرات مورفولوژیکی و از دست دادن خاصیت فنوتیپی سلول‌ها می‌شود (۱۶).

در این تحقیق از محیط کشت بدون سرم استفاده شد، زیرا در کاربرد بالینی، محیط کشت بدون سرم برخی نگرانی‌های سرم مانند خطر ابتلا به ویروس‌ها یا پریون‌ها

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-01]

(Proins)، اختلاف بین بسته‌های (Batch) مختلف و حضور مهارکننده‌ها یا عوامل تحریک‌کننده را ندارد و در نهایت استفاده از محیط بدون سرم امکان استفاده از شرایط کشت تعریف شده از نظر بیوشیمیایی را فراهم می‌آورد (۱۸، ۱۷).

مطالعه‌های مختلف به بررسی ترکیبات مختلف سیتوکاینی که باعث حفظ خودنوسازی و محدود کردن آپوپتوز می‌شوند پرداخته‌اند و ترکیب سیتوکاینی شامل SCF، TPO و FLT3L را به عنوان یکی از بهترین ترکیبات سیتوکاینی پیشنهاد کرده‌اند (۲۱-۱۹). بنابراین در این مطالعه از ترکیب سیتوکاینی فوق استفاده شد. TPO به تنهایی و یا همراه با سایر سیتوکاین‌ها که سریع اثر هستند مثل SCF و FLT3L ، باعث افزایش پرولیفراسیون سلول‌های هماتوپوئیتیک اولیه در *in vitro* می‌شود (۲۲). TPO را می‌توان جایگزین IL-3 ، IL-6 و G-CSF بدون تغییر در تعداد SRC (SCID Cell repopulating) نمود و از آپوپتوز جلوگیری کرد و با ممانعت از تخریب تلومر (Telomere)، از خودنوسازی سلول‌های بنیادی اولیه حمایت نمود (۲۵-۲۳).

در خصوص سیستم هماتوپوئیتیک تعادل بالانس بین تکثیر سلولی و خاموشی برای HSC با غلظت اکسیژن حدود ۵ درصد گزارش شده است (۲۶). بنابراین در این مطالعه به منظور حفظ تکثیر سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف در کنار حفظ بنیادینگی آن از غلظت اکسیژن ۵ درصد جهت بررسی استفاده شد.

از آن جا که در نتیجه مطالعه‌ای گزارش شده بود که میزان اکسیژن ۵ درصد از حدود ۴ ساعت پس از قرار دادن در انکوباتور تا ۱۹۲ ساعت (۷ روز) ثابت می‌ماند، ما از هیپوکسی مزمن استفاده نمودیم و سلول‌های گروه اکسیژن ۵٪ به مدت هفت روز در انکوباتور نگهداری شدند (۲۷).

به منظور بررسی بنیادینگی سلول‌های بنیادی در این تحقیق به بررسی بیان ژن‌های، *HOXB4* ، *c-Myc Nanog* و *SOX2* پرداختیم.

نتایج مطالعه ما نشان داد بیشترین بیان ژن‌های بنیادینگی (*HOXB4, c-Myc, Nanog, SOX2*) در شرایط هم کشتی همراه با سیتوکاین‌ها در غلظت اکسیژن ۵ درصد بود که می‌تواند نقش مهمی در افزایش خودنوسازی HSC داشته باشد. در گروه سلول‌های مزانشیمی و سیتوکاین با غلظت اکسیژن ۲۱ درصد بیان ژن‌ها بالاتر از بیان آن در شرایط کشت سیتوکاین به تنهایی و سلول مزانشیمی به تنهایی بود.

نتایج ما نشان داد که با وجود تکثیر بیشتر HSC در گروه سیتوکاین به تنهایی، بیان ژن‌های بنیادینگی در این گروه نسبت به سایر گروه‌ها پایین‌تر بود. از آن‌جا که سیتوکاین‌ها باعث پیشروی تمایز به سلول‌های بالغ‌تر می‌شوند، بنابراین در شرایط کشت سیتوکاین به تنهایی بیان مارکرهای مرتبط با خودنوسازی کاهش می‌یابد. مطالعه‌های متعددی گزارش کرده‌اند که سیتوکاین‌ها مانند GM-CSF، IL-3، SCF و TPO موجب افزایش تکثیر HSC موشی و انسانی می‌شود اما با افزایش سریع ROS در سلول‌ها نیز همراه هستند (۲۸). به نظر می‌رسد که هم کشتی با MSC از عوارض جانبی ROS کاسته و باعث حفظ بهتر خودنوسازی HSC می‌شود. علت انتخاب ژن *HOXB4* به عنوان مارکر بنیادینگی HSC این بود که *HOXB4* یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های خودنوسازی HSC می‌باشد (۲۹). در سلول‌های بنیادی بیان می‌شود و سپس در طی تمایز در انسان و موش کاهش بیان می‌یابد (۳۱، ۳۰). مطالعه‌های متعددی نشان داده‌اند که *HOXB4* باعث تکثیر *ex vivo* و HSCs *in vivo* می‌شود (۳۴-۳۲).

در غیاب *c-Myc* تمایز HSC به سمت پروژنیتورهای تعهد یافته مهار می‌شود، برعکس افزایش بیان اجباری *c-Myc* درHSC منجر به افزایش خودنوسازی در شروع تمایز می‌گردد (۳۵). این‌ها پیشنهاد می‌کند که *c-Myc* باعث کنترل تمایز اولیه LT-HSC در *in vivo* می‌شود و حذف ژنی *c-Myc* منجر به پان‌سیتوپنی و مرگ HSC و آپوپتوز به علت تجمع مولکول گرانزیم B (Granzyme B) می‌شود (۳۶). بنابراین *c-Myc* باعث کنترل فعالیت عملکردی HSC مثل پرولیفراسیون و بقا و تمایز آن می‌شود. نتایج مطالعه‌های مختلف نشان داده است *c-Myc* با HIF-1α در تعامل است (۳۷). *c-Myc* باعث حفظ خودنوسازی HSC در پایین دست سیگنالینگ *Notch* و *HOXB4* می‌شود.

مطالعه‌ای تاکنون به بررسی بیان ژن‌های بنیادینگی در سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف در شرایط غلظت اکسیژن ۵ درصد نپرداخته است اما بیان این ژن‌ها در سایر

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-01]

سلول‌های بنیادی مورد ارزیابی قرار گرفته است:

در سلول‌های بنیادی رویانی تیمار شده با اکسیژن ۲ درصد، ژن‌های *Nanog* ، *SOX2* افزایش بیان داشتند. مجموعه *Nanog* ، *SOX2* ، *OCT4* باعث مهار ژن‌های درگیر در تمایز می‌شوند. حذف ژنی HIF2α که OCT4 را هدف قرار می‌دهد، باعث مهار تکثیر سلول‌های بنیادی رویانی می‌شود. با افزایش غلظت O_2 میزان بیان مارکرهای *SOX2* ، *Nanog* ، *OCT4* در سلول‌های ESC کاهش می‌یابد (۳۸).

در مطالعه‌ای در کشت سلول‌های شبه فیبروبلاست بافت چربی (ASC : Adipose-derived stromal/stem cells) در غلظت اکسیژن ۲ درصد، میزان بیان ژن‌های *Sox2* و *Nanog* به ترتیب ۱/۲۵ و ۱/۳۹ برابر بالاتر از نرموکسی بود و غلظت اکسیژن ۲ درصد پرولیفراسیون ASC را تا ۱۰ روز افزایش داد (۳۹).

در مطالعه‌ای دیگر سلول‌های بنیادی رویانی مشتق از امبریوی (Embryo) ۸ سلوله در اکسیژن ۵ درصد پلوری پوتنسی بهتری را حفظ کردند (۴۰). اکسیژن ۵ درصد، باعث ورود مجدد سلول‌های متعهد به سمت پلوری پوتنسی می‌شود (در اکسیژن ۲ درصد).

آن چه که مشخص است این است که نیچ هیپوکسیک HSC از طریق القای ژن‌های مهاری چرخه سلول باعث خاموشی می‌شود. اکسیژن ۵٪ هم‌چنین با کاهش فعالیت متابولیکی و محافظت HSC ها از آسیب ناشی از ROS باعث حفظ HSC ها در طول زندگی می‌گردد، بنابراین قرار گرفتن در شرایط اکسیژن ۵٪ می‌تواند بر حفظ بنیادینگی این سلول‌ها تأثیر مثبت داشته باشد.

نتیجه‌گیری

مکانیسم درگیر در سرنوشت HSC ، خاموشی و تمایز آن در انسان هنوز به طور کامل شناخته نشده است. مسلماً طراحی سیستم کشت *in vitro* ای که به طور دقیق تعاملات HSC را نشان دهد، ارزش بالایی دارد و می‌تواند جایگاهی مناسب برای بررسی اثرات داروهای مختلف بر HSC قبل از آزمایش‌ها در مدل حیوانی باشد. تاکنون روش‌های مختلفی برای کشت HSC انجام شده است هدف همه این روش‌ها تکثیر HSC اولیه و نابالغ و تقلید نیچ است.

اکسیژن ۵ درصد یک روش کارآمد برای تکثیر در شرایط آزمایشگاهی HSC می‌باشد. نقش حمایتی رشد HSC خون بند ناف در هم‌کشتی با سلول‌های مزانشیمی در شرایط اکسیژن ۵ درصد به طور قابل توجهی افزایش یافت. ژن‌های مؤثر در بنیادینگی و خودنوسازی در شرایط اکسیژن ۵ درصد افزایش بیان داشت. روی هم‌رفته، نتایج حاصل از سیستم هم‌کشتی و اکسیژن ۵ درصد می‌تواند به ما در درک نقش واقعی هیپوکسی به عنوان فاکتور مهم نیچ و پتانسیل حمایت سلول‌های استرومایی برای پروژنیتورهای خونساز و فعالیت سلول‌های بنیادی کمک کند.

حمایت مالی

این تحقیق برگرفته از رساله مقطع دکترای دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس با شماره ۴۵۰۶ مجوز گرفته است.

عدم تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌کنند هیچ‌گونه تعارض منافعی در این مطالعه وجود نداشته است.

نقش نویسندگان

دکتر فاطمه محمد علی: طراحی تحقیق، انجام آزمایش‌ها و نگارش پیش‌نویس مقاله

دکتر سعید آبرون: راهنمایی درخصوص انجام آزمایش‌ها و ویرایش مقاله

دکتر امیر آتشی: مشاوره در خصوص انجام آزمایش‌ها و ویرایش مقاله

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-01]

References:

1- Lee JY, Hong SH. Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration. Int J Stem Cells 2020; 30; 13(1): 1-12.
2- Laver JH, Hulsey TC, Jones JP, Gautreaux M, Barredo JC, Abboud MR. Assessment of barriers to bone marrow donation by unrelated African-American potential donors. Biol Blood Marrow Transplant 2001; 7(1): 45-8.
3- Waller-Wise R. Umbilical Cord Blood Banking: An Update For Childbirth Educators. J Perinat Educ 2022; 31(4): 199-205.
4- Petropoulou A، Rocha V. Risk factors and options to improve engraftment in unrelated cord blood transplantation. Stem Cells Int 2011; 2011: 610514.
5- Rubinstein P، Rosenfield RE، Adamson JW، Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. Blood 1993; 81(7): 1679-90.
6- Pipes BL، Tsang T، Peng SX، Fiederlein R، Graham M، Harris DT. Telomere length changes after umbilical cord blood transplant. Transfusion 2006; 46(6): 1038-43.
7- Oh IH, Kwon KR. Concise Review: Multiple Niches for Hematopoietic Stem Cell Regulations. Stem Cells 2010;28(7):1243-9.
8- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29: e45
9- Mohammadali F, Abroun S, Atashi A. Mild hypoxia and human bone marrow mesenchymal stem cells synergistically enhance expansion and homing capacity of human cord blood $CD34^+$ stem cells. Iran J Basic Med Sci 2018; 21(7): 709-716
10- Miller JS. Single adult human CD34(+)/Lin−/CD38(−) progenitors give rise to natural killer cells، B-lineage cells، dendritic cells، and myeloid cells. Blood 1999; 93(1):96–106.
11- Uchida N. HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(20): 11939-44.
12- Nwajei F, Konopleva M. The bone marrow microenvironment as niche retreats for hematopoietic and leukemic stem cells. Adv Hematol 2013; 2013: 953982.
13- Mendelson A, Frenette PS. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. Nat Med 2014; 20(8): 833-46.
14- Batsali AK, Georgopoulou A, Mavroudi I, Matheakakis A, Pontikoglou CG, Papadaki HA. The Role of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles (MSC-EVs) in Normal and Abnormal Hematopoiesis and Their Therapeutic Potential. J Clin Med 2020; 9: 856.
15- Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, *et al*. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. Stem Cells 2007; 25(10): 2638-47.
16- Perucca S, Di Palma A, Piccaluga P, Gemelli C, Zoratti E, Bassi G, *et al*. Mesenchymal stromal cells (MSCs) induce *ex vivo* proliferation and erythroid commitment of cord blood haematopoietic stem cells (CB-$CD34^+$ cells). PLoS One 2017; 12(2): e0172430.
17- Möbest D, Mertelsmann R, Henschler R. Serum free *ex vivo* expansion of CD34(+) hematopoietic progenitor cells. Biotechnol Bioeng 1998; 60(3): 341-7.
18- Lebkowski JS, Schain LR, Okarma TB. Serum-free culture of hematopoietic stem cells: a review. Stem Cells 1995; 13(6): 607-12.
19- Levac K, Karanu F, Bhatia M. Identification of growth factor conditions that reduce *ex vivo* cord blood progenitor expansion but do not alter human repopulating cell function *in vivo*. Haematologica 2005; 90: 166-72.
20- Wang Y, Sugimura R. *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells. Exp Cell Res 2023; 427(1): 113599.
21- Yamaguchi M, Hirayama F, Kanai M, Sato N, Fukazawa K, Yamashita K, *et al*. Serum-free coculture system for *ex vivo* expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. Exp Hematol 2001; 29(2): 174-82.
22- Bozhilov YK, Hsu I, Brown EJ, Wilkinson AC. *In vitro* Human Haematopoietic Stem Cell Expansion and Differentiation. Cells 2023; 12(6): 896.
23- Levac K، Karanu F، Bhatia M. Identification of growth factor conditions that reduce *ex vivo* cord blood progenitor expansion but do not alter human repopulating cell function *in vivo*. Haematologica 2005; 90: 166-72.
24- Goyama S, Mulloy JC. Making Healthy Stem Cells: The New Role of TPO. Cell Stem Cell 2013; 12(1): 8-9.
25- Gammaitoni L, Weisel KC, Gunetti M, Wu KD, Bruno S, Pinelli S. Elevated telomerase activity and minimal telomere loss in cord blood long-term cultures with extensive stem cell replication. Blood 2004; 103: 4440-8.
26- Guitart AV, Hammoud M, Dello Sbarba P. Slow-cycling/quiescence balance of hematopoietic stem cells is related to physiological gradient of oxygen. Exp Hematol 2010; 38(10): 847–51.
27- Tiwari A, Wong CS, Nekkanti LP, Deane JA, McDonald C, Jenkin G, Kirkland MA. Impact of Oxygen Levels on Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Expansion. Stem Cells Dev 2016; 25(20): 1604-1613.
28- Kumar S, Geiger H. HSC Niche Biology and HSC Expansion *ex vivo*. Trends Mol Med 2017; 23(9): 799-819.
29- Fares, I, Calvanese V, Mikkola HKA. Decoding Human Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal. Curr Stem Cell Rep 2022; 8: 9-106 .
30- Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS. Differential expression of

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-01]

homeobox genes in functionally distinct $CD34^+$ subpopulations of human bone marrow cells. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 12223–7.
31- Pineault N, Helgason CD, Lawrence HJ. Differential expression of Hox، Meis1، and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. Exp Hematol 2002; 30: 49-57.
32- Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. Exp Hematol 2001; 29: 1125-34.
33- Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK. Enhanced *in vivo* regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. Blood 1999; 94: 2605-12.
34- Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. Cell 2002; 109: 39-45.
35- Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM, *et al*. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. Genes Dev 2004; 18(22): 2747-63.
36- Laurenti E, Varnum-Finney B, Wilson A, Ferrero I, Blanco-Bose WE, Ehninger A, et al. Hematopoietic stem cell function and survival depend on c-Myc and N-Myc activity. Cell Stem Cell 2008; 3(6): 611-24.
37- Huang LE. Carrot and stick: HIF-alpha engages c-Myc in hypoxic adaptation. Cell Death Differ 2008; 15(4): 672-7.
38- Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, *et al*. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function، embryonic development، and tumor growth. Genes Dev 2006; 20(5): 557-70.
39- Yamamoto Y, Fujita M, Tanaka Y. Low Oxygen Tension Enhances Proliferation and Maintains Stemness of Adipose Tissue–Derived Stromal Cells. Bio Res 2013; 2(3): 199-205.
40- Lengner A.Deriviation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. Cell 2010; 141: 872-83.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-01]