

بررسی اثر پروتئین التهابی ماکروفاژ ($MIP1-\alpha$) بر تکثیر سلول‌های پایه خونساز خون بند ناف

دکتر کامران علی مقدم^۱، میترا خلیلی^۲، دکتر مسعود سلیمانی^۳، پانته آ قدسی^۴، مریم حیات^۵، علیرضا ارجمند^۶، لیلا معزی^۷، ماندانا محی‌الدین^۸، دکتر اردشیر قوامزاده^۹

چکیده

سابقه و هدف

خون بند ناف (UCB) یک منبع غنی از سلول‌های پایه خونساز (HSCs) است و می‌تواند به جای پیوند مغز استخوان مورد استفاده قرار گیرد. برای تسریع پیوند با خون بند ناف، لازم است سلول‌های پایه خونساز در محیط *ex vivo* تکثیر شوند. لذا در این مطالعه اثر پروتئین التهابی ماکروفاژ ($MIP1-\alpha$) در شرایط کشت مختلف بر تکثیر و ممانعت از تمایز سلول‌های خونساز خون بند ناف مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. سلول‌های تک هسته‌ای (MNCs) از خون بند ناف جداسازی و در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) و یا ۱۰ درصد پلاسمای خون بند ناف (CBP) و محیط فاقد سرم (SF) همراه با ۵۰ ng/ml از ترکیب سایتوکایینی اینترلوکین ۶ (IL-6)، اینترلوکین ۳ (IL-3)، ترمبوپوئین (TPO)، فاکتور رشد سلول‌های پایه (SCF) و لیگاند تیروزین کیناز کبد جنینی (FLt3-L) در حضور یا عدم حضور ۵۰ ng/ml از فاکتور $MIP1-\alpha$ به مدت دو هفته کشت داده شدند.

یافته‌ها

به طور کلی میانگین افزایش درصد سلول‌های $CD34^+$ و $CD34^+/CD38^-$ در تمامی محیط‌های حاوی $MIP1-\alpha$ نسبت به محیط‌های کنترل فاقد آن بالاتر بود.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که اثر $MIP1-\alpha$ به محتوای سایتوکایینی و حضور یا عدم حضور سرم در محیط بستگی دارد و حضور $MIP1-\alpha$ همراه با ترکیب سایتوکایینی ذکر شده باعث افزایش تعداد این سلول‌ها می‌شود.

کلمات کلیدی: پروتئین التهابی ماکروفاژ ($MIP1-\alpha$)، تکثیر سلول‌های پایه خونساز، خون بند ناف

تاریخ دریافت: ۱۴/۱۰/۲۵

تاریخ پذیرش: ۸۵/ ۴/۱۷

- ۱- فوق تخصص خون و انکولوژی- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران- مرکز تحقیقات هماتولوژی - انکولوژی و پیوند مغز استخوان
- ۲- مولف مسوول: کارشناس ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی تهران- مرکز تحقیقات هماتولوژی - انکولوژی و پیوند مغز استخوان- بیمارستان شریعتی- کدپستی: ۱۴۱۱۱
- ۳- PhD هماتولوژی- دانشگاه تربیت مدرس
- ۴- کارشناس بیولوژی- دانشگاه علوم پزشکی تهران- مرکز تحقیقات هماتولوژی - انکولوژی و پیوند مغز استخوان
- ۵- کارشناس فلوسایتومتری- دانشگاه علوم پزشکی ایران
- ۶- کارشناس ارشد هماتولوژی- دانشگاه علوم پزشکی تهران- مرکز تحقیقات هماتولوژی - انکولوژی و پیوند مغز استخوان
- ۷- کارشناس ارشد ایمونولوژی- دانشگاه علوم پزشکی تهران- مرکز تحقیقات هماتولوژی - انکولوژی و پیوند مغز استخوان
- ۸- فوق تخصص خون و انکولوژی- استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران- مرکز تحقیقات هماتولوژی - انکولوژی و پیوند مغز استخوان

مقدمه

در گذشته مغز استخوان و خون محیطی تنها منبع مورد استفاده جهت پیوند سلول‌های پایه خونساز (HSCs: Hematopoietic Stem Cells) به بیماران بودند. اما در دهه گذشته خون بند ناف (UCB: Umbilical Cord Blood) به عنوان منبع دیگری از سلول‌های پایه خونساز جهت پیوند آلوژنیک در بیماران فاقد دهنده با HLA مشابه مطرح شده است (۱). در استفاده از خون بند ناف امکان بروز بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD: Graft Versus Host Diseases) در مقایسه با پیوند مغز استخوان کمتر و شانس موفقیت پیوند بالاتر است. پتانسیل تکثیر سلول‌های خونساز در خون بند ناف بالاتر از مغز استخوان می‌باشد (قابلیت تکثیر تا ۳۰ هفته در برابر ۱۰ هفته در مغز استخوان) (۲).

اما مشکل عمده در استفاده از خون بند ناف حجم اندک خون (۱۰۰ میلی‌لیتر) و تعداد کم سلول‌های هسته‌دار و خونساز لازم برای پیوند در فرد بالغ می‌باشد. حداقل سلول‌های هسته‌دار مورد نیاز برای فرد بالغ 2×10^7 NC/Kg و $2/5 \times 10^6$ CD34⁺/kg می‌باشد. در حالی که تعداد کل سلول‌های شمارش شده در نمونه‌های خون بند ناف به طور متوسط 11×10^8 است (۳). بنابراین جهت پیوند سلول‌های خونساز خون بند ناف به بیماران بالغ لازم است که این سلول‌ها در محیط *in vitro* توسط سایتوکاین‌های مختلف تکثیر شوند، بدون این‌که قابلیت پیوند و چند قوه‌ای (مولتی پتانسیل) بودن آن‌ها تغییر کند. علاوه بر فاکتورهای القاکننده رشد، فاکتورهای بازدارنده نیز نقش مهمی در تنظیم رشد سلول‌های پایه خونساز دارند. یکی از این فاکتورها پروتئین التهابی ماکروفاژی آلفا (MIP1- α) از اعضای خانواده کموکاین‌ها می‌باشد (۵). این خانواده بزرگ وزن مولکولی کم و فعالیت التهابی دارند (۱-۳). MIP1- α اثرات فعال‌کننده و شیمیوتاکتیک بر روی منوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های T دارد. بدین ترتیب که MIP1- α باعث تنظیم مهاجرت لکوسیت‌ها، افزایش اتصال سلول‌های T به سلول‌های اندوتلیال و افزایش فعالیت سلول‌های کشنده (NK) می‌شود (۴-۶). MIP1- α از تکثیر پیش‌سازهای خونساز اولیه ممانعت می‌کند اما باعث القا

تکثیر پیش‌سازهای بالغ‌تر بعدی (از جمله CFU-G، CFU-E و CFU-M) می‌گردد (۸-۴).

این پروتئین بیان پروتئین‌های p16 و p27 را در سلول‌های خونساز افزایش می‌دهد و بدین ترتیب این سلول‌ها را در فاز G0 نگه می‌دارد و باعث محافظت و مقاومت این سلول‌ها در برابر داروها و عوامل شیمیایی خصوصاً در طی شیمی درمانی بیمار می‌شود (۶-۴). در برخی مطالعات پیشنهاد شده است که حضور MIP1- α در محیط کشت مانع از تمایز سلول‌های خونساز به سمت رده‌های مختلف می‌شود (۷).

لذا از آن جایی که هدف ما پیوند سلول‌های خونساز به بیماران است، عدم تمایز این سلول‌ها در طی مدت کشت در *in vitro* از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. بنابراین در این مطالعه اثر MIP1- α بر ممانعت از تمایز سلول‌های CD34⁺/CD38⁻ در محیط فاقد سرم، نسبت به محیط‌های حاوی پلاسمای خون بند ناف و سرم جنین گاوی در حضور سایتوکاین‌های اینترلوکین ۶، اینترلوکین ۳، ترمبوپوئین، فاکتور رشد سلول‌های پایه و FLT3 لیگاند مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه خون بند ناف و جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای: مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پس از دریافت فرم رضایت تحقیق از بیماران بخش زایمان، خون بند ناف نوزاد تازه متولد شده تهیه (به طور متوسط ۷۰ میلی‌لیتر) و در کیسه‌های ۴۵۰ میلی‌لیتری حاوی ماده ضد انعقاد CPDA (مجموع صنعتی بعثت قم) جمع‌آوری شد. خون بند ناف با نسبت ۵ به ۱ با اتیل استارچ (سیگما) مخلوط و به مدت ۱-۲ ساعت باقی ماند تا گلبول‌های قرمز رسوب نمایند. سپس ۷ میلی‌لیتر از محلول رویی به آرامی روی ۳ میلی‌لیتر فایکول (جیکو) قرار گرفت و به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۲۵۰۰ سانتریفوژ شد تا گلبول‌های قرمز رسوب کنند.

سپس سلول‌های تک هسته‌ای (MNCs) از لایه وسط جداسازی و دوبار با محیط کشت RPMI 1640 (جیکو) شستشو داده شد. پلیت سلولی با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت

موشی کونزوگه با FITC و PE جهت انجام آزمایش کنترل به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۴°C انکوبه شدند و پس از شستشو با PBS حاوی ۲ درصد BSA، سلول‌های CD34⁺/38⁻ توسط دستگاه فلو سایتومتری (Partec, PASIII) تجزیه شد.

آنالیز داده‌ها:

برای مقایسه محیط‌های مختلف با یکدیگر افزایش درصد سلول‌های CD34⁺/38⁻ و سلول‌های CD34⁺ در روزهای ۷ و ۱۴ محاسبه شد و سپس داده‌های حاصل توسط نرم افزار SPSS ۱۱/۵ تجزیه و تحلیل و میانگین، ماکزیمم و میانه افزایش درصد سلول‌های CD34⁺/38⁻ و سلول‌های CD34⁺ در روزهای ۷ و ۱۴ به دست آمد. جهت مقایسه محیط‌های مختلف با یکدیگر از one-sample T test و paired-sample T test استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه تعداد ۲۰ نمونه خون بند ناف مورد استفاده قرار گرفت. میانگین تعداد سلول‌های MNC، CD34⁺ و CD34⁺/38⁻ در روز اول به ترتیب ۵/۳×۱۰^۵، ۱۹/۲۹×۱۰^۳ و ۸/۲۹×۱۰^۳ به دست آمد و میزان تکثیر سلول‌های CD34⁺ و CD34⁺/38⁻ در محیط‌های مختلف در حضور و عدم حضور MIP1-α با یکدیگر مقایسه شد.

نتایج محیط فاقد سرم (SF):

در روزهای هفتم و چهاردهم ماکزیمم، میانگین و میانه افزایش درصد سلول‌های CD34⁺/38⁻ (جدول ۱ و شکل ۲) و سلول‌های CD34⁺ (جدول ۲ و شکل ۳) در محیط SFM بالاتر از محیط SF بود. اما در محیط‌های SFM و SF در روزهای هفتم و چهاردهم میانگین افزایش درصد سلول‌های CD34⁺/38⁻ (به ترتیب $p=0/5$ و $p=0/1$) و میانگین افزایش درصد سلول‌های CD34⁺ (به ترتیب $p=0/08$ و $p=0/2$) تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

نتایج محیط RPMI همراه ۱۰ درصد سرم (FCS):

در محیط FCM در روزهای ۷ و ۱۴ میانگین افزایش درصد سلول‌های CD34⁺/38⁻ به ترتیب ۳۳/۵ و ۶۲/۱ و

RPMI 1640 سوسپانسیون شد و جمعیت سلولی حاصل توسط لام نئوبار و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو شمارش گردید.

انواع محیط‌های کشت و مخلوط سائیتوکاین‌های مورد استفاده:

در این مطالعه از ۲ محیط کشت RPMI 1640 (گیکو) همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و یا ۱۰ درصد پلاسمای خون بند ناف و محیط فاقد سرم برای سلول‌های خونساز (Stem spanTM, Stem cell) و از سائیتوکاین‌های FLT3 لیگاند، TPO، SCF، IL-6 و IL-3 (R&D) به مقدار ۵۰ ng/ml از هر سائیتوکاین استفاده شد.

کشت و تکثیر سلول‌های خونساز:

تعداد ۵×۱۰^۵ سلول MNC در یک میلی‌لیتر محیط کشت به هر ول از پلیت ۲۴ خانه افزوده شد. سلول‌ها در انواع محیط‌های کشت زیر حاوی سائیتوکاین‌های مختلف ذکر شده بودند به دو صورت همراه با ۵۰ ng/ml از MIP1-α (R&D) و یا بدون حضور MIP1-α به مدت دو هفته در CO₂ انکوباتور با ۱۰۰ درصد رطوبت انکوبه شدند.

- RPMI 1640 + FCS ۱۰ درصد (FCS)
- RPMI 1640 + FCS ۱۰ درصد + MIP1-α (FCM)
- RPMI 1640 + CBP ۱۰ درصد (CBP)
- RPMI 1640 + CBP ۱۰ درصد + MIP1-α (CBM)
- Serum Free (SF)
- Serum Free + MIP1-α (SFM)

برای هر نمونه ۲ چاهک (اول) اختصاص داده شد. در پایان هفته اول نیمی از محیط قبلی با محیط حاوی فاکتور تازه تهیه شده تعویض شد و سلول‌ها در روز اول، روز هفتم و روز چهاردهم شمارش شدند.

فلوسایتومتری

تعداد ۱×۱۰^۵ سلول از هر نمونه در روزهای اول، هفتم و چهاردهم با آنتی‌بادی‌های ضد CD34 کونزوگه با FITC و ضد CD38 کونزوگه با PE (داکو) و آنتی‌بادی‌های IgG1

جدول ۱: میانگین، ماکزیمم و میانه تعداد سلول‌های $CD34^+/38^-$ در روزهای هفتم و چهاردهم

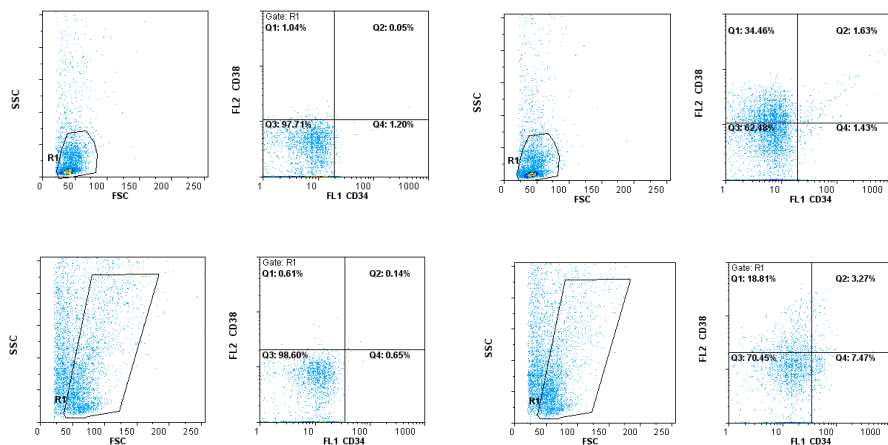
انواع محیط کشت	روز هفتم			روز چهاردهم		
	میانگین Mean ($\pm$ SD)	ماکزیمم Maximum	میانه Median	میانگین Mean ($\pm$ SD)	ماکزیمم Maximum	میانه Median
SF	۸۷ ($\pm$ ۱۲/۹)	۴۶	۴	۱۰/۳ ($\pm$ ۱۳/۶)	۵۱	۶/۳
SFM	۱۰/۸ ($\pm$ ۱۵/۵)	۵۶	۶/۴	۱۹/۲ ($\pm$ ۳۰/۶)	۱۰۶	۷/۳
FCS	۲۵/۵ ($\pm$ ۷۲/۴)	۲۶۳	۲	۵۷/۴ ($\pm$ ۹۳/۸)	۲۹۸	۹/۸
FCM	۳۳/۵ ($\pm$ ۱۰۵)	۳۹۵	۱/۴	۶۲/۱ ($\pm$ ۹۹/۴)	۳۳۷	۲۷/۹
CBP	۱۳/۵ ($\pm$ ۳۱/۲)	۱۱۲	۳/۳	۴/۷ ($\pm$ ۴/۳)	۱۱	۲/۸
CBM	۱۵/۵ ($\pm$ ۳۷/۲)	۱۳۲	۱/۷	۵/۷ ($\pm$ ۶/۱)	۱۹/۸	۴

انحراف معیار و میانگین داخل پرانتز آورده شده است. SF: محیط فاقد سرم Stem span™، FCS: محیط حاوی سرم جنین گاوی و CBP: محیط حاوی سرم خون بند ناف. SFM، FCSM و CBM به ترتیب محیط‌های SF، FCS و CBP حاوی MIP1- α هستند.

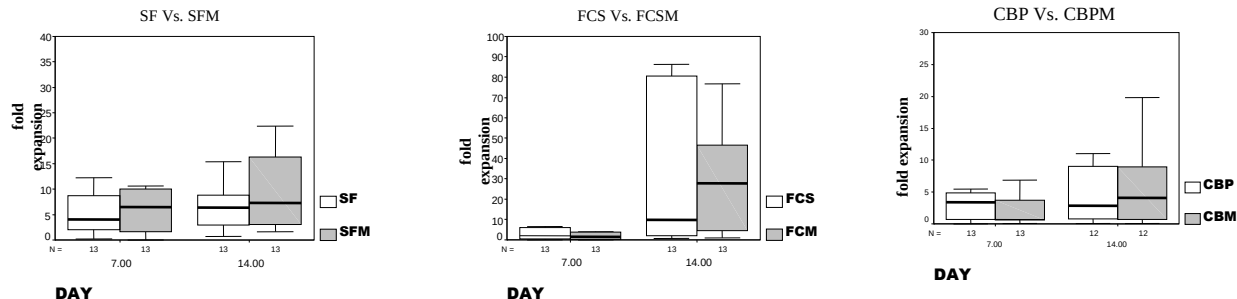
جدول ۲: میانگین، ماکزیمم و میانه افزایش تعداد سلول‌های $CD34^+$ در روزهای هفتم و چهاردهم

انواع محیط کشت	روز هفتم			روز چهاردهم		
	میانگین Mean ($\pm$ SD)	ماکزیمم Maximum	میانه Median	میانگین Mean ($\pm$ SD)	ماکزیمم Maximum	میانه Median
SF	۴/۵ ($\pm$ ۸/۱۷)	۲۶/۸	۱/۱	۵/۶ ($\pm$ ۷/۹)	۲۹/۷	۳/۴
SFM	۴/۵ ($\pm$ ۴/۲)	۱۴/۴	۳	۱۰/۹ ($\pm$ ۱۶/۸)	۵۹/۴	۴/۳
FCS	۱۰/۱ ($\pm$ ۱۱/۳)	۲۹/۴	۵/۸	۲۰/۴ ($\pm$ ۲۶/۸)	۸۴/۷	۸/۴
FCM	۱۱/۶ ($\pm$ ۱۴/۴)	۳۹	۴/۲	۲۲/۳ ($\pm$ ۲۲/۸)	۶۵/۸	۲۰
CBP	۶/۴ ($\pm$ ۱۰)	۳۱/۱	۱/۳	۱۰ ($\pm$ ۲۰/۱)	۶۸	۱/۱
CBM	۸/۲ ($\pm$ ۱۵/۳)	۵۴/۹	۲/۴	۱۰ ($\pm$ ۱۸/۳)	۶۳/۸	۵/۲

انحراف معیار میانگین داخل پرانتز آورده شده است. SF: محیط فاقد سرم Stem span™، FCS: محیط حاوی سرم جنین گاوی و CBP: محیط حاوی سرم خون بند ناف. SFM، FCSM و CBM به ترتیب محیط‌های SF، FCS و CBP حاوی MIP1- α هستند.

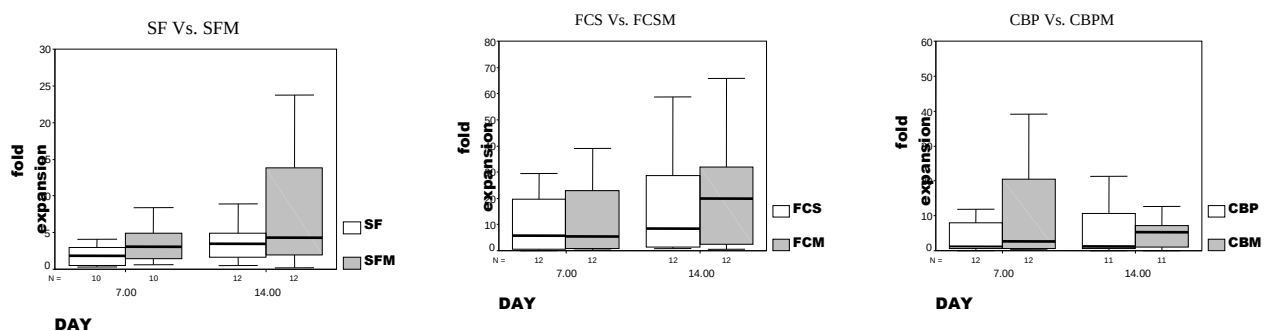
شکل ۱: فلوسایتمتری برای سلول‌های $CD34^+/38^-$ در محیط SF حاوی MIP1- α

(A) کنترل و تست در روز اول (B) کنترل و تست در روز هفتم



شکل ۲: مقایسه افزایش درصد سلول‌های CD34⁺/38⁻ در محیط‌های (FCS (FCS، RPMI + ۱۰٪، Serum free (SF) و CBP (CBP، RPMI + ۱۰٪ در روزهای هفتم و چهاردهم

SF: محیط فاقد سرم Stem spanTM، FCS: محیط حاوی سرم جنین گاوی و CBP: محیط حاوی سرم خون بند ناف. SFM، FCSM و CBM به ترتیب محیط‌های SF، FCS و CBP حاوی MIP1- α هستند. خط نمایش داده شده در داخل هر باکس نمایانگر میانه می‌باشد و ۵۰ درصد نمونه‌ها در محدوده باکس قرار می‌گیرند.



شکل ۳: مقایسه افزایش درصد سلول‌های CD34⁺ در محیط‌های (FCS (FCS، RPMI + ۱۰٪، Serum free (SF) و CBP (CBP، RPMI + ۱۰٪ در روزهای هفتم و چهاردهم

SF: محیط فاقد سرم Stem spanTM، FCS: محیط حاوی سرم جنین گاوی و CBP: محیط حاوی سرم خون بند ناف. SFM، FCSM و CBM به ترتیب محیط‌های SF، FCS و CBP حاوی MIP1- α هستند. خط نمایش داده شده در داخل هر باکس نمایانگر میانه می‌باشد و ۵۰ درصد نمونه‌ها در محدوده باکس قرار می‌گیرند.

ترتیب $p=0/3$ و $p=0/6$ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

نتایج محیط RPMI همراه ۱۰ درصد سرم (CBP):

در روز هفتم و چهاردهم میانگین افزایش درصد سلول‌های CD34⁺/38⁻ (جدول ۱ و شکل ۲) و میانگین میانه افزایش درصد سلول‌های CD34⁺ (جدول ۲ و شکل ۳) در محیط CBM بالاتر از CBP به دست آمد. در محیط‌های CBM و CBP در روزهای هفتم و چهاردهم میانگین افزایش درصد سلول‌های CD34⁺/38⁻ (به ترتیب $p=0/2$ و $p=0/4$) و میانگین افزایش درصد سلول‌های

میانگین افزایش درصد سلول‌های CD34⁺ به ترتیب ۱۱/۶ و ۲۲/۳ برابر به دست آمد که بالاترین درصد افزایش در کل محیط‌ها می‌باشد (جدول ۱ و ۲). همچنین در روز چهاردهم میانه در محیط FCM بالاتر از محیط FCS و در روز هفتم نزدیک به آن به دست آمد (شکل‌های ۲ و ۳ و جدول‌های ۱ و ۲). اما در محیط‌های FCS و FCM در روزهای هفتم و چهاردهم میانگین افزایش درصد سلول‌های CD34⁺/38⁻ (به ترتیب $p=0/3$ و $p=0/7$) و میانگین افزایش درصد سلول‌های CD34⁺ (به

CD34⁺ (به ترتیب $p=0/4$ و $p=0/5$) در محیط‌های CBP و CBM با هم مقایسه شدند اما تفاوت معنی‌داری بین این دو محیط به دست نیامد.

بحث

خون بند ناف منبع مهمی از سلول‌های پایه خونساز جهت پیوند آلوژنیک در بیماران می‌باشد. به دلیل تعداد ناکافی سلول‌های خونساز جهت پیوند لازم است که این سلول‌ها در محیط *in vitro* تکثیر شوند، بدون آن‌ها قابلیت پیوند و چند قوه‌ای (مولتی پتانسیل) بودن آن‌ها تغییر کند یا این‌که به رده‌های دیگر تمایز یابند. برای این منظور در مطالعات مختلف از ترکیب سایتوکاین‌های متفاوتی استفاده شده است. در مطالعه کمپانی و همکاران سلول‌های CD34⁺ در محیط فاقد سرم همراه با سایتوکاین‌های IL-3، IL-6، FLT3 و SCF نسبت به محیط مشابه که در آن فقط فاکتور FLT3-L حذف شده بود افزایش درصد بالاتری را نشان داد (۳۰ برابر در مقابل ۱۱ برابر) (۸). گیلومر و همکاران نیز نشان دادند که در محیط کشت IMDM همراه با ۱۰ درصد FCS که حاوی ۴ فاکتور TPO، FLT3-L، IL-6 و SCF می‌باشد، محتوای سلول‌های CD34⁺ در مدت ۵ روز به میزان ۲ برابر افزایش می‌یابد در حالی‌که در محیط مشابه که تنها حاوی ۲ فاکتور FLT3-L و TPO است در این مدت افزایش کم و یا هیچ‌گونه افزایشی مشاهده نمی‌شود. بنابراین حضور IL-6 و SCF باعث تسریع تکثیر سلول‌های خونساز در محیط کشت می‌شود (۹). یکی از مشکلات استفاده از خون بند ناف، تأخیر در پیوند پلاکت‌ها می‌باشد که با تکثیر سلول‌های پیش‌ساز مگاکاریوسیتی قابل حل است. شاو و همکاران برای این منظور از ترکیب سایتوکاینی TPO، FLT3-L، IL-3 و SCF در محیط فاقد سرم استفاده نمودند و سلول‌های پیش‌ساز مگاکاریوسیتی (CD34⁺/CD41⁺) را به میزان ۶ برابر در مدت ۱۱ روز تکثیر کردند (۱۰). لذا با توجه به نتایج ذکر شده در این تحقیق برای تکثیر سلول‌های CD34⁺ و سلول‌های CD34⁺/CD38⁻ از ترکیب سایتوکاینی IL-3، IL-6، TPO، SCF و FLT3-L استفاده گردید و اثر MIP1- α بر میزان تکثیر و ممانعت از تمایز سلول‌های CD34⁺/CD38⁻ در محیط‌های مختلف مورد

بررسی قرار گرفت. در مقایسه کلی میزان افزایش درصد سلول‌های CD34⁺/CD38⁻ و CD34⁺ در محیط‌های حاوی MIP1- α (FCS، SFM، CBM) نسبت به محیط‌های فاقد آن (FCS، SF و CBP)، اختلاف معنی‌داری نداشت. اما تمامی محیط‌های حاوی MIP1- α نسبت به محیط‌های فاقد آن از میانگین بالاتری برخوردار بودند. در مطالعه کامنی و همکاران با افزودن MIP1- α به محیط فاقد سرم که حاوی فاکتورهای IL-3، IL-6 و SCF در میزان تکثیر سلول‌های پیش‌ساز نابالغ CD34⁺ و سلول‌های بالغ CD34⁻ و NC افزایش معنی‌داری مشاهده نشد اما با افزودن FLT3-L در کنار فاکتورهای IL-3، IL-6 و SCF، در محیط حاوی MIP1- α کاهش معنی‌داری در تکثیر پیش‌سازهای بالغ نسبت به محیط فاقد آن مشاهده شد. در حالی‌که در تکثیر سلول‌های پیش‌ساز اولیه تفاوتی وجود نداشت (۸) بنابراین اثر MIP1- α به محتوای سایتوکاینی محیط بستگی دارد. برخی مطالعات نشان می‌دهند که MIP1- α از رشد پیش‌سازهای نابالغ در پیش‌سازهای گرانولوسیت، اریتروئید، ماکروفاژ و مگاکاریوسیت (CFU-GEMM) و سلول‌های تشکیل دهنده کلونی با پتانسیل تکثیر زیاد (HPP-CFU) ممانعت می‌کند (۹). در حالی‌که برخی دیگر چنین اثرات ممانعت کننده‌ای بر HPP-CFU به دست نیاوردند. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد که MIP1- α با ممانعت از تمایز سلول‌های CD34⁺/CD38⁻ باعث افزایش تعداد این سلول‌ها می‌شود. همچنین در مطالعات مختلف گزارش شده است که MIP1- α باعث محافظت و مقاومت سلول‌های خونساز در برابر داروها و عوامل شیمیایی خصوصاً در طی شیمی درمانی بیماران می‌شود (۵). (۴). لرد و همکاران نشان دادند در موشی که با داروهای سیتوتوکسیک و MIP1- α تیمار شده است در مقایسه با گروه کنترل که MIP1- α دریافت نکرده است، سلول‌های خونساز سریع‌تر و به میزان بالاتری جایگزین می‌شوند (۹). از آن جایی‌که هدف از تکثیر سلول‌های CD34⁺/CD38⁻ استفاده جهت پیوند به بیماران می‌باشد بنابراین بهتر است در کشت این سلول‌ها از MIP1- α استفاده شود.

نتیجه‌گیری

پزشکی مولکولی و همکاران محترم در مرکز تحقیقات هماتولوژی - انکولوژی آقایان دکتر احمدرضا شمشیری و دکتر پویا علیجانی پور، دکتر سینا وطن دوست و خانم‌ها آسیه عشوری و دکتر فروغ فروغی، دکتر زهرا گلیایی و دکتر فریما فروزیا که در این طرح مشارکت داشتند کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

در نتیجه‌گیری کلی توسط نتایج ذکر شده ثابت گردید که در شرایط *ex vivo* حضور MIP1- α در غلظت ۵۰ng/ml همراه با ترکیب سایتوکائینی لیگاند FLT3، TPO، SCF، IL-6 و IL-3 باعث افزایش بیشتر تعداد سلول‌های CD34⁺/CD38⁻ و نسبت به محیط فاقد آن می‌شود.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت شبکه پزشکی مولکولی و مرکز تحقیقات هماتولوژی - انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی انجام شده‌است. بدین وسیله از شبکه

References :

- 1- Watt SM, Contreras M. Stem cell medicine: Umbilical cord blood and its stem cell potential. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2005; 10: 209-220.
- 2- Gammaitoni L, Bruno S, Sanavio F, Gunetti M, Kollet O, *et al.* Ex vivo expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hematopoietic reconstitution. *Experimental Hematology* 2003; 31(3): 261-27.
- 3- Gilmore GL, DePasquale DK, Lister J, Shaddock RK. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34⁺ hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2000; 28: 1297-1305.
- 4- Jiesveld JL, Harbol A W, Belanger T, Rosell E, *et al.* MIP1- α and TGF- β production in CD34⁺ progenitor-stromal cell coculture system: effects of progenitor isolation method and cell-cell contact. *Blood cells, Molecular and Disease* 2000; 26(4): 261-75.
- 5- Huang K, Huang S, Pan J, Wu Y. Protection of hematopoietic stem cells by MIP1- α and PF4 against the cytotoxicity of chemotherapeutic agents. 2000; 21(7): 355-8.
- 6- Suehiro Y, Muta K, Umemura T, Abe Y, Nishimura J, Nawata H. Macrophage inflammatory protein 1 α enhances in a different manner adhesion of hematopoietic progenitor cells from bone marrow, cord blood, and mobilized peripheral blood. *Exp Hematol* 1999; 27(11): 1637-45.
- 7- De Wynter EA, Durig J, Cross MA, Heyworth CM, Testa NG. Differential response of CD34⁺ cells isolated from cord blood and bone marrow to MIP1- α and the expression of MIP1- receptors on these immature cells. *Stem Cells* 1998; 16: 349-356.
- 8- Campany G, Querol S, Cancelas JA, Gardia J. Short-term, serum-free, static culture of cord blood-derived CD34⁺ cells: effects of Flt3-L and MIP1- α on *in vitro* expansion of hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 1999; 84: 675-682.
- 9- Lord BI, Dexter TM, Clements JM, *et al.* Macrophage inflammatory protein protects multipotent hematopoietic cells from the cytotoxic effects of hydroxyurea *in vivo*. *Blood* 1992; 79: 2605-2609.
- 10- Shaw PH, Gilligan D, Wang XM, Thall PF, Corey S. Ex vivo expansion of megakaryocyte precursors from umbilical cord blood CD34⁺ cells in a closed liquid culture system. *American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2003; 9: 151-156.

Evaluation of the effects of MIP1- α on *ex vitro* expansion of hematopoietic progenitor cells in different culture media for the purpose of cord blood transplantation

Alimoghaddam K.¹(MD), Khalili M.¹(MS), Soleimani M.²(PhD), Ghodsi P.¹(BS), Hayat P.³(BS),
Mohyedin M.¹(MS), Moezi L.¹(MS), Arjmand A.¹(MS), Ghavamzadeh A.¹(MD)

¹Hematology-Oncology and Bone Marrow Transplantation Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences

²Department of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Moddares University

³Molecular and Cellular Research Center, Iran University of Medical Sciences

Abstract

Background and Objectives

Umbilical cord blood (CB) has been identified both as a rich source for hematopoietic stem cells (HSCs) and as an alternative to bone marrow transplantation. To accelerate the pace of engraftment in cord blood (CB) transplantation, HSCs should be *ex vivo* expanded. So the aim of this study was to evaluate the effects of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP1- α) on *ex vivo* expansion of HSCs and its role in prevention of HSCs differentiation in different conditions.

Materials and Methods

Mononuclear cells (MNCs) were separated from cord blood and cultured in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum (FCS) or 10% cord blood plasma (CBP) or serum free media (SF). Culture media contained 50 ng/ml of interleukin 6 (IL-6), interleukin 3 (IL-3), thrombopoietin (TPO), stem cell factor (SCF), and flt3-ligand. MNCs were cultured for 2 weeks in the presence or absence of MIP1- α in CO₂ incubator; expansion potential was then studied by MNCs counting and flowcytometry for CD34⁺/CD38⁻ cells in 7 and 14 days.

Results

In all MIP1- α contained media, more increase in expansion of CD34⁺/CD38⁻ and CD34⁺ cells was observed.

Conclusions

These results suggest that the effect of MIP1- α depends on type of medium and the cytokines present in the culture; it also shows that addition of MIP1- α is useful for clinically *ex vivo* expansion of cord blood-derived progenitor cells.

Key words: MIP1- α , Cord blood, *Ex vivo* expansion, Hematopoietic progenitor cells
SJIBTO 2006; 3(2):145-152

Received: 15 Jan 2006

Accepted: 8 Jul 2006

Correspondence: Khalili M. MS of Cellular and Molecular Biology. BMT- Resaech Center, Tehran University of Medical Sciences. Postal Code: 14114, Tehran, Iran. Tel: (09821)84902626 ; Fax : (09821) 88004140
E-mail: mitrakhalili@yahoo.com