خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۰ شماره ۴ زمستان ۹۲ (۳۶۳-۳۵۳)

مقاله پژوهشی

تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز $CD34^+$ بند ناف در همکشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در حضور TEPA

ناصر امیری‌زاده[۱]، فرهاد ذاکر[۲]، ناهید نصیری[۳]

چکیده

سابقه و هدف

استفاده از سلول‌های بنیادی خونساز(HSCs)، روش استانداردی جهت درمان بسیاری از بدخیمی‌های خونی و اختلالات غیرخونی محسوب می‌شود. خون بند ناف، دارای مزایای فراوانی نسبت به سایر منابع سلول‌های بنیادی است و یکی از محدودیت‌های مهم این منبع جهت پیوند، تعداد محدود سلول‌های بنیادی آن می‌باشد. از راه‌کارهای پیشنهادی برای غلبه بر این مشکل، تکثیر بدون تمایز این سلول‌ها در محیط‌های کشت است. در این مطالعه از TEPA به عنوان شلاتور مس و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جهت تکثیر UCB-HSCs استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع کاربردی بود. سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف با استفاده از آنتی‌بادی‌های نشان‌دار با Microbead و ستون MACS جدا شدند. سپس این سلول‌ها در چهار شرایط کشت مختلف شامل: ۱) محیط حاوی سایتوکاین ۲) محیط دارای فیدر و سایتوکاین ۳) محیط دارای TEPA و سایتوکاین و ۴) محیط دارای فیدر، سایتوکاین و TEPA کشت داده شدند. به منظور ارزیابی تکثیر HSCs، از شمارش سلولی، تعیین درصد سلول‌های $CD34^+$ به روش فلوسایتومتری و روش سنجش کلونی در روز ۱۰ تکثیر استفاده شد.

یافته‌ها

بیشترین میزان چند برابر شدن تعداد سلول‌های $CD34^+$، TNC ها و CFU-C در شرایط کشت چهارم(به ترتیب ۱۵/۳ ± ۱۱۰/۱۱، ۲۱/۷۸ ± ۱۱۸/۵ و ۴۴/۷ ± ۱۷۲/۹ برابر) در مقایسه با سایر شرایط مشاهده شد.

نتیجه گیری

نتایج بررسی نشان داد که همکشتی HSCs با سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور عامل شلاته‌کننده مس (TEPA)، قادر است میزان تکثیر UCB-HSCs را به طور قابل توجهی افزایش دهد. بنابراین، این استراتژی می‌تواند برای تکثیر HSCs مفید واقع شود.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی خونساز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، TEPA

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۴
تاریخ پذیرش: ۹۲/۱/۲۱

۱- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD هماتولوژی ـ استاد دانشکده پیراپزشکی ـ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران ـ تهران ـ ایران
۳- مؤلف مسؤول: کارشناس ارشد هماتولوژی ـ دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

مقدمه

پیوند سلول‌های بنیادی طی دهه‌های اخیر به موفقیت‌های درمانی بالایی رسیده است و یک راه‌کار درمانی مناسب و عملی برای بسیاری از بیماری‌هایی که در گذشته غیر قابل درمان بودند را به وجود آورده است(۳-۱). ویژگی‌های اصلی سلول‌های بنیادی خونساز(HSCs) ، پتانسیل خود نوسازی(selfrenewality) و تمایز به انواع مختلف سلول‌های خونی می‌باشد(۵، ۴).

خون بند ناف(UCB) به دلیل بالا بودن تعداد اهداکنندگان، دسترسی راحت و شیوع کمتر GVHD (بیماری پیوند علیه میزبان) علی‌رغم عدم سازگاری کامل HLA، جایگزین مناسبی برای مغز استخوان جهت پیوند سلول‌های بنیادی خونساز می‌باشد(۶). صرف نظر از این مزایا، محدودیت عمده خون بند ناف تعداد کم HSCs موجود در آن جهت پیوند به بیماران بزرگسال است.

سرعت پیوند به تعداد سلول‌های بنیادی $CD34^+$ خون بند ناف بستگی دارد. دوز مطلوب جهت انجام پیوند در بزرگسالان بیشتر یا مساوی $۲/۵ \times ۱۰^۶$ $CD34^+$ cell/kg می‌باشد. اگر نمونه خون بند ناف به صورت مناسب جمع‌آوری شود، دارای $۱۰^۷$ سلول $CD34^+$ خواهد بود که این تعداد تنها جهت استفاده در یک نوزاد کافی می‌باشد(۱۲-۷). راه‌کار پیشنهادی که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است، تکثیر HSCs در محیط‌های *ex vivo* می‌باشد. می‌توان این سلول‌ها را در حضور سایتوکاین‌ها در محیط کشت تکثیر نمود اما متاسفانه تکثیر HSCs در آزمایشگاه با مشکلاتی مواجه است زیرا HSCs در *in vitro* به تدریج توانایی خودسازی و چند قوه‌ای بودن خود را از دست داده و به رده‌های خاصی تمایز می‌یابند(۱۴، ۱۳). احتمالاً تمایز سلول‌ها در شرایط *in vitro* ناشی از عدم وجود تنظیماتی است که در *in vivo* توسط ریز محیط اعمال می‌شود. در مغز استخوان HSCs عمدتاً در تعامل با ریز محیط ویژه‌ای به نام نیچ قرار دارند که سرنوشت سلول‌ها را از نظر خاموشی(quiescence)، خودنوسازی و تمایز تنظیم می‌کند. مطالعه‌های اخیر نشان داده‌اند که تماس مستقیم بین سلول‌های استرومال و HSCs ، برای بقا، تنظیم سیکل سلولی، مهاجرت و پیوند مهم می‌باشد. در بسیاری از مطالعه‌ها، اثرات سینرژیستیکی با استفاده از سایتوکاین‌های نوترکیب و لایه فیدر مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSCs) در تکثیر و تمایز HSCs گزارش شده است(۲۱-۱۵). راه‌کار دیگری که اخیراً جهت تکثیر بدون تمایز سلول‌های بنیادی خونساز در شرایط *in vitro* به کار گرفته شده است، استفاده از شلاتور مس(TEPA) همراه با سایتوکاین‌های Early acting از جمله SCF ، TPO و FL جهت ازدیاد تکثیر سلول‌های پیش‌ساز خونساز(HPCs) و سلول‌های بنیادی خونساز(HSCs) بند ناف می‌باشد. از آن جایی که میزان بالای مس درون سلولی به دلیل نقش آن در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن توکسیک است، کاهش میزان این رادیکال‌ها جهت حفظ HSCs در مغز استخوان و اریتروپوئز طبیعی ضروری است. عمده مس سلولی به اجزای سلولی از جمله سرولوپلاسمین و آنزیم‌های مختلف متصل است و تنها مقدار کمی از آن به فرم یونیزه و آزاد وجود دارد. فرم یونیزه مس قابلیت اتصال به شلاتورها را دارد که به آن Chelatable CU می‌گویند(۲۷-۲۲). بدین منظور در این مطالعه تاثیر شلاتور مس بر میزان تکثیر سلول‌های $CD34^+$ بند ناف در همکشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، به عنوان لایه فیدر، در شرایط مختلف کشت بررسی و مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های $CD34^+$:

در این مطالعه کاربردی، سلول‌ها از خون بند ناف پس از دریافت فرم رضایت‌نامه جدا شدند. ابتدا سلول‌های تک هسته‌ای(MNCs) مربوط به ۵ نمونه خون بند ناف به کمک فایکول(سیگما، kg/L ۰/۰۰۱ ± ۱/۰۷۷) جدا شد. سپس این سلول‌ها با آنتی CD34 کونژوگه شده با ذرات میکروبید(آمریکا، میلتنی بیوتک) انکوبه گردیده و در نهایت با استفاده از روش MACS (آمریکا، میلتنی بیوتک)، سلول‌های $CD34^+$ موجود در بین MNCها با دو بار عبور از ستون LS از سایر سلول‌ها جدا شدند .در نهایت جهت ارزیابی درجه خلوص سلول‌های $CD34^+$ جدا شده، آنالیز فلوسایتومتری با استفاده از آنتی‌بادی‌های آنتی CD34

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

(آمریکا، بیوسایینس) و آنتی CD38 انجام شد. میانگین متوسط سلول‌های $CD34^+$ حدود ۶۲٪ بود(۲۸).

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

MSCs از نمونه آسپیره مغز استخوان اهداکنندگان سالم در ضد انعقاد هپارین جداسازی شد(رضایت‌نامه از آن‌ها گرفته شد). سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان به وسیله گرادیان شیب غلظت فایکول(سیگما، ۰/۰۰۱ kg/L ± ۱/۰۷۷) جدا شده و پس از شستشو در محیط DMEM (آمریکا، سیگما) Low glucose ، حاوی ۱۰٪ FBS کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌های غیر چسبنده با تعویض محیط خارج گردیدند.

پس از ۳ پاساژ، سلول‌های چسبنده مزانشیمی از محیط قابل برداشت بودند. فنوتیپ MSCs با استفاده از آنتی‌بادی‌های (Copenhagen ، دانمارک، داکو) آنتی CD45 ، CD37 ، CD166 ، CD105 ، CD90 و CD34 توسط فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس ۱×۱۰^۴ سلول مزانشیمی در پلیت‌های ۶ خانه(Roskilde ، دانمارک و Nunc) کشت داده شدند تا به ۸۰٪ از پوشیدگی سطح رسیدند. به منظور جلوگیری از تکثیر بیشتر، سلول‌ها با میتومایسین C تیمار شدند(۱۹).

بررسی پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

هم چنین به منظور تایید این سلول‌ها، تمایز آن‌ها به سمت رده استئوبلاستی با استفاده از محیط تمایزی حاوی ۱۰ mM دگزامتازون(آمریکا، کمیکون) ، ۰/۱ M آسکوربیک اسید ، DMEM-Low glucose (آمریکا، سیگما) و ۱ mol گلیسرول دو فسفات(آمریکا، کمیکون) انجام شد. در نهایت سلول‌های استئوبلاست با دو رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد(آمریکا، سیگما) و آلکالن فسفاتاز(آمریکا، سیگما) مورد تایید قرار گرفتند(۲۹).

بررسی MTT:

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) روشی است که فعالیت سلول‌های زنده را از طریق دهیدروژنازهای میتوکندریایی مورد ارزیابی قرار می‌دهد. با استفاده از روش MTT ، اثرات سایتوتوکسیک احتمالی TEPA (آمریکا، سیگما) بر روی MSCs در محیط کشت، پس از ۳ روز انکوباسیون تعیین شد. در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای بر روی MSCs ، رقت‌های مختلف TEPA اضافه شد(هر رقت به صورت ۳ تایی تکرار شد). سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط کشت‌ها کاملاً خالی گردیده و به هر چاهک محیط کشت جدید و محلول MTT اضافه شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط کشت چاهک‌ها تخلیه شده و با حل کردن بلورهای فورمازان در DMSO (دی متیل سولفوکساید)، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با الایزا ریدر قرائت شد(۳۰).

اندازه‌گیری یون مس:

میزان مس سلولی طبق مطالعه‌های گذشته اندازه‌گیری شد. سلول‌ها جمع‌آوری گردیده و با PBS شستشو داده شدند. $۱۰^۶$ سلول در لوله اپندورف متال فری سانتریفیوژ گردید. پلیت سلولی با اسید نیتریک اولترا پیور M (Mallinckrodt Baker B.V ، Deventer ، Netherlands) ۰/۰۳ به غلظت ۱×۱۰^{۱۰} cell/mL رسانده شد. نمونه‌ها سونیکیت شده و سپس با اتمیک ابزربشن کوره(ژاپن، شیمادزو، model ۶۷۰ G) با طول موج ۳۲۴/۷ نانومتر اندازه‌گیری شدند(۲۳).

کشت سلول‌های $CD34^+$ در شرایط مختلف:

سلول‌های $CD34^+$ جدا شده در شرایط کشت مختلفی با غلظت ۱×۱۰^۴ cell/mL به مدت ۱۰ روز کشت داده شدند. این شرایط کشت عبارت بودند از:

۱) شرایط کشت اول که سلول‌های $CD34^+$ جدا شده تنها در حضور سایتوکاین‌های نوترکیب شامل؛ Stem Cell Factor (SCF) ، FLt3-Ligand (FL) و Thrombopoietin (TPO) با غلظت ۱۰۰ ng/mL کشت داده شدند. جهت هر ۴ شرایط کشت از همین سایتوکاین‌ها با مشخصات ذکر شده و محیط کشت فاقد سرم(Stemspan) استفاده شد.

۲) شرایط کشت دوم که سلول‌های $CD34^+$ جدا شده در

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

همکشتی با MSCs به عنوان لایه فیدر و در حضور سایتوکاین‌ها کشت داده شدند. پس از رسیدن MSCs به ۸۰٪ از پوشیدگی سطح، محیط Stemspan حاوی ترکیب سایتوکاینی فوق به همراه 10^4 سلول $CD34^+$ جدا شده، بر روی لایه فیدر سلول‌های مزانشیمی کشت داده شدند.

۳) شرایط کشت سوم که سلول‌های $CD34^+$ جدا شده در حضور سایتوکاین‌ها و TEPA۱۰ µM کشت داده شدند.

۴) کشت سلول‌ها در محیط چهارم که سلول‌های $CD34^+$ جدا شده در همکشتی با MSCs به عنوان لایه فیدر و در حضور سایتوکاین‌ها و TEPA ۱۰µM کشت داده شدند.

تمامی محیط کشت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. تمامی کشت‌ها به صورت سه تایی انجام شده و تعویض محیط در روزهای ۳ ، ۷ و ۱۰ صورت پذیرفت. قبل از آغاز کشت و پس از تکثیر، تعداد کل سلول‌های هسته‌دار شمارش گردیده و سلول‌ها با فلوسایتومتری جهت مارکر CD34 مورد ارزیابی قرار گرفتند.

سنجش کلونی(CFU assay):

$10^3 \times 1$ سلول از سلول‌های $CD34^+$ جدا شده از بند ناف و هم‌چنین سلول‌های پس از تکثیر در شرایط کشت مختلف در روز ۱۰، با محیط methocult H4435(استم سل تکنولوژی) مخلوط شده و درون پلیت‌های $35\ mm^2$ (دانمارک، Nunc) ریخته شدند. این مرحله به صورت دوتایی انجام شد و پلیت‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. پس از این مدت کلونی‌ها به وسیله میکروسکوپ اینورت(ژاپن، نیکون) شمارش و بررسی شدند(۳۲، ۳۱).

آنالیز فلوسایتومتری:

سلول‌ها قبل(روز صفر) و بعد از تکثیر در شرایط کشت مختلف در روز ۱۰ برداشته شده و با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال(کوپنهاگ،داکو، دانمارک) آنتی FITC-CD34 و PE-CD38 رنگ‌آمیزی شدند. از آنتی‌بادی IgG موشی (کوپنهاگ، دانمارک، داکو) به عنوان ایزوتایپ کنترل استفاده شد. در نهایت به وسیله دستگاه فلوسایتومتری(آلمان، پارتک) درصد سلول‌های $CD38^-$ $CD34^+$ ارزیابی شد(۳۳).

آنالیز آماری:

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS۱۶ انجام شد. جهت مقایسه گروه‌های مختلف سلولی و آنالیز نتایج از ANOVA استفاده گردید. $p< ۰/۰۵$ به عنوان معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

ایمونوفنوتایپ این سلول‌ها با استفاده از آنالیز فلوسایتومتری ارزیابی شد. بیان CD90 ، CD105 ، CD166 و CD37 به ترتیب ۹۶/۸٪ ، ۹۳٪ ، ۹۸/۸٪ و ۹۴٪ بود، در حالی که بیان CD34 و CD45 به ترتیب ۲/۸٪ و ۳/۸٪ بود. پس از تحریک MSCs با دگزامتازون، گلیسرول فسفات، آسکوربیک اسید و ۱۰٪ FBS ، پتانسیل تمایزی این سلول‌ها به استئوبلاست‌ها ارزیابی شد. MSCs در روز ۱۷ کشت، تمایز استئوژنیک را با افزایش بیان آلکالن فسفاتاز و تشکیل ماتریکس کلسیم خارج سلولی نشان دادند.

سنجش MTT:

این سنجش نشان داد که TEPA ۱۰ µM هیچ گونه اثر مشخصی بر روی تکثیر سلولی و حیات MSCs ندارد(نمودار۱).

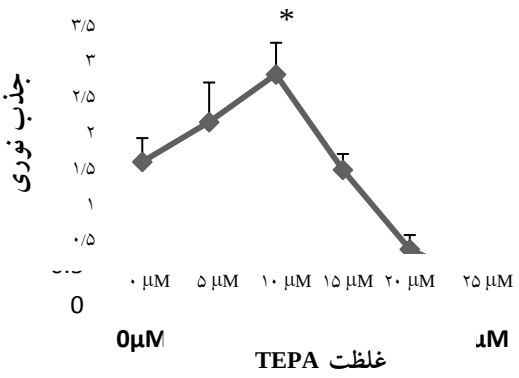
اثر TEPA بر میزان مس:

غلظت مس سلولی پیش از افزودن TEPA در اندازه‌گیری با اتمیک ابزربشن ng ۷ در 10^7 سلول بود. هنگامی که TEPA به محیط کشت اضافه شد، میزان مس سلولی به ۴ نانو گرم در 10^7 سلول کاهش یافت. این نتایج نشان می‌دهند که میزان مس سلولی را می‌توان با افزودن TEPA به محیط کشت کاهش داد.

ارزیابی تکثیر در شرایط کشت مختلف:

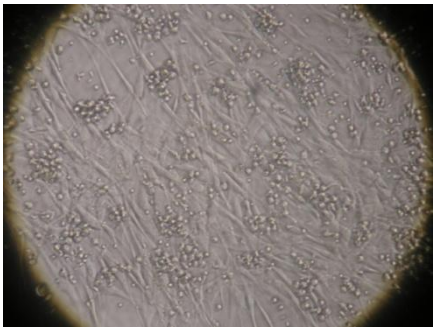
به منظور تعیین اثرات MSCs و کاهش مس جهت حمایت از تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز، چهار وضعیت

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

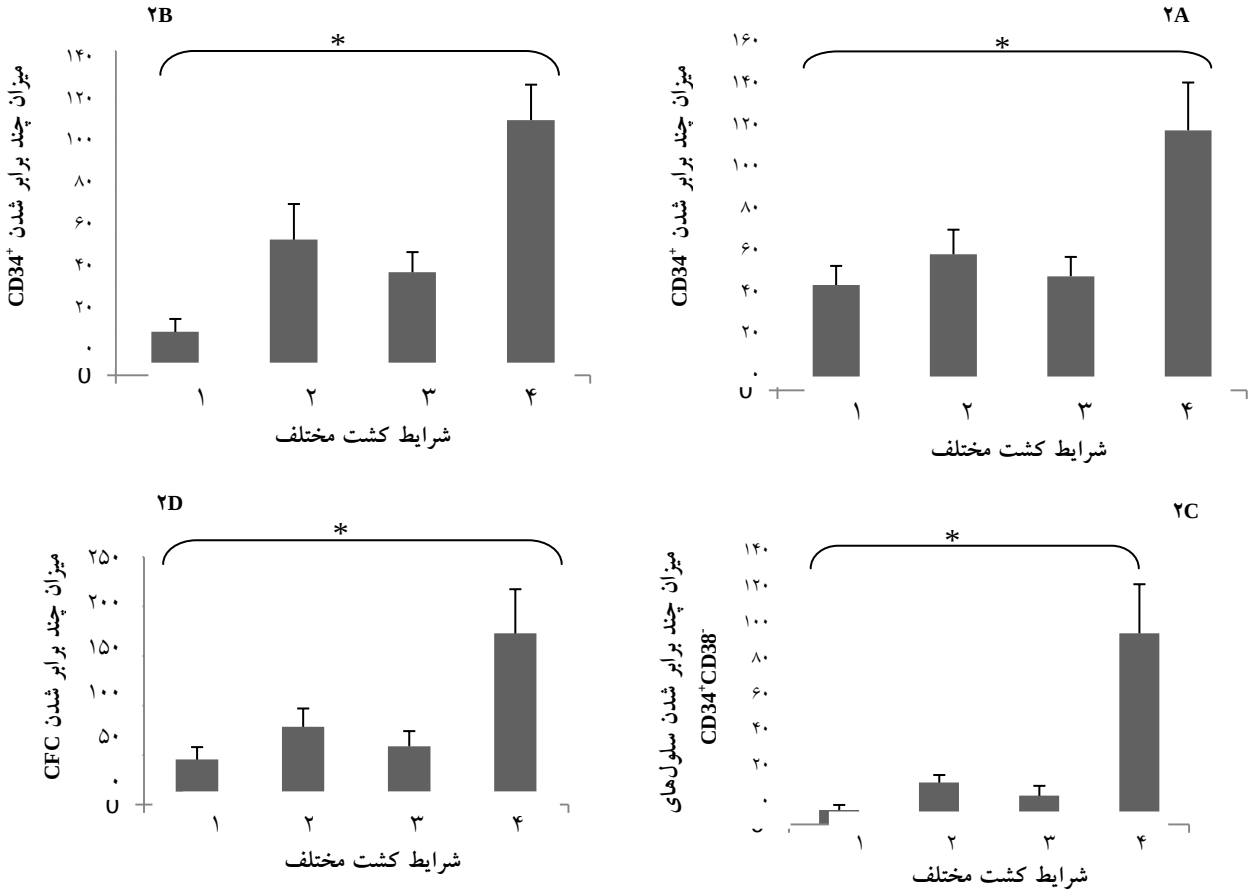


نمودار ۱: اثر غظت‌های مختلف TEPA بر توکسیسیتی و حیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از سنجش MTT ، رشد MSCs در حضور TEPA ۱۰ µM به صورت معناداری بیشتر از سایر غلظت‌ها بود(p< ۰/۰۵ *).

زیر مطرح بود: شرایط کشت اول؛ میانگین میزان چند برابر شدن TNCs، سلول‌های $CD34^+$ و CFU-C در این شرایط به ترتیب ۸/۷ ± ۴۸ ، ۵/۶ ± ۱۸/۷ و ۱۲/۷ ± ۴۵/۵ بود.

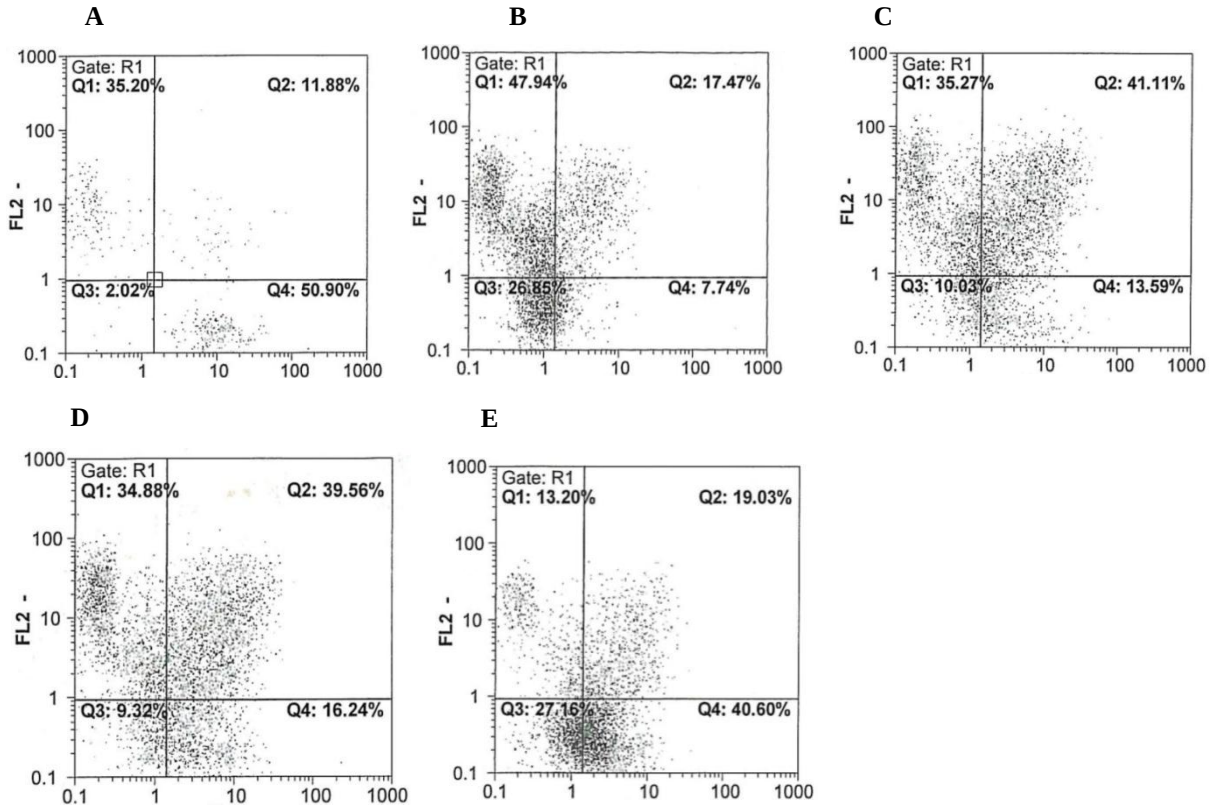


شکل ۱: همکشتی HSCs با MSCs در محیط کشت(x ۴۰)



نمودار ۲: میانگین میزان چند برابر شدن پس از ۱۰ روز تکثیر در شرایط کشت مختلف. A ۲ : میانگین میزان چند برابر شدن TNCs ، B ۲ : میانگین میزان چند برابر شدن سلول‌های $CD34^+$، C ۲ : میانگین میزان چند برابر شدن سلول‌های $CD34^+CD38^-$ D ۲ : میانگین میزان چند برابر شدن CFCs . شرایط کشت اول(۱)، تنها در بردارنده سایتوکاین‌ها بود. شرایط کشت دوم(۲)، در بردارنده MSCs به عنوان لایه فیدر و سایتوکاین‌ها بود. شرایط کشت سوم(۳)، دربردارنده سایتوکاین‌ها و TEPA بود. شرایط کشت چهارم(۴)، در بردارنده MSCs به عنوان لایه فیدر، سایتوکاین‌ها و TEPA بود. تفاوت‌های معناداری بین شرایط کشت مختلف مشاهده گردید(p< ۰/۰۵ *).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]



شکل ۲ : آنالیز بیان CD34 و CD38 در سلول‌های بنیادی خونساز قبل و پس از ۱۰ روز تکثیر در شرایط کشت مختلف. FL1 : بیانگرCD34 ، FL2 : بیانگر CD38 . ۲A : قبل از کشت(زمان صفر) ۲B : شرایط کشت اول. ۲C : شرایط کشت دوم. ۲D : شرایط کشت سوم ۲E: شرایط کشت چهارم.

شرایط کشت دوم؛ در این شرایط اثر MSCs بر روی تکثیر TNCs ، سلول‌های $CD34^+$ و CFU-C در سینرژی با سایتوکاین‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. میانگین میزان چند برابر شدن آن‌ها به ترتیب ۱۵/۲ ± ۶۲ ، ۱۱/۴ ± ۵۸/۵ و ۱۸/۶ ± ۷۸/۶ بود.

شرایط کشت سوم: به منظور ارزیابی اثر کاهش مس بر میزان تکثیر سلولی، سلول‌ها با TEPA تیمار شدند. میانگین میزان چند برابر شدن TNCs ، سلول‌های $CD34^+$ و CFU-C به ترتیب ۸/۸ ± ۵۲ ، ۸/۷ ± ۴۴/۴۵ و ۱۵/۴ ± ۵۸/۹۴ بود.

شرایط کشت چهارم: اثر همکشتی MSCs در سینرژی با سایتوکاین‌ها و TEPA بر روی تکثیر HSCs مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از ۱۰ روز کشت، تعداد TNCs ، سلول‌های $CD34^+$ و CFU-C در این شرایط به طور قابل توجهی افزایش یافت($p< ۰/۰۵$). میانگین میزان چند برابر شدن TNCs، سلول‌های $CD34^+$ و CFU-C به ترتیب ۲۱/۸۷ ± ۱۱۸/۵ ، ۱۵/۳ ± ۱۱۰/۱۱ و ۴۴/۷ ± ۱۷۲/۹ بود.

شرایط کشت مختلف به موازات هم با یکدیگر مقایسه شدند. تعداد $CD34^+$ cells ، TNCs و CFU-C در روز دهم کشت مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت(شکل ۱ و نمودار ۲).

آنالیز فلوسایتومتری پس از تکثیر:

در این مطالعه بیان مارکرهای CD34 و CD38 توسط فلوسایتومتری ارزیابی شد. در شرایط کشت چهارم، سلول‌های بیشتری با فنوتیپ ابتدایی‌تر($p< ۰/۰۵$ ، ۴/۸۶٪ ± ۳۹/۷٪) $CD34^+CD38^-$ در مقایسه با سه شرایط کشت دیگر یافت شد(شکل ۲).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

بحث

تکثیر HSCs در *ex vivo* راه‌کار امید بخشی جهت اهداف تحقیقاتی و درمانی می‌باشد(۳۶-۳۴). در مطالعه‌های گذشته تلاش شده است تا تکثیر سلول‌های $CD34^+$ در شرایط کشت، بهینه شود(۳۷، ۱۷). HSCs را می‌توان در محیط‌های کشت همراه با سایتوکاین‌ها تکثیر نمود اما این نوع از تکثیر همراه با تمایز می‌باشد(۱۴). در مطالعه‌های مختلف نشان داده شده است که لایه فیدر استرومال قادر است از طریق ترشح فاکتورهای رشد و cell-to-cell contact ، از تکثیر HSCs حمایت کند (۳۹، ۳۸). از سوی دیگر در برخی مطالعه‌ها نیز نقش TEPA در افزایش تکثیر و کاهش تمایز سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک بند ناف بررسی شده است(۲۵-۲۲). به همین دلیل در این مطالعه بر آن شدیم تا اثرات هم‌زمان MSCs به عنوان لایه فیدر و شلاتور مس جهت کاهش غلظت یون مس را بر میزان تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف بررسی کنیم. به دنبال کشت سلول‌های $CD34^+$ در حضور سایتوکاین‌ها به تنهایی(شرایط کشت اول)، میانگین میزان چند برابر شدن $CD34^+$cells ، TNCs و CFU-C افزایش یافت(به ترتیب درحدود ۴۸، ۱۸/۷ و ۴۵/۵ برابر) اما این افزایش در مقایسه با سایر شرایط کشت قابل توجه نبود. این نتایج با نتایج مطالعه‌های قبلی مطابقت داشت(۴۲-۴۰). به منظور تایید نقش MSCs بر روی تکثیر HSCs خون بند ناف، سلول‌های $CD34^+$ جدا شده، بر روی لایه فیدر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور سایتوکاین‌ها کشت داده شدند(شرایط کشت دوم). میزان تکثیر TNCs,$CD34^+$cells و CFU-C در این شرایط بیشتر از تکثیر در شرایط کشت اول بود. مقایسه نتایج این دو شرایط کشت نشان می‌دهد که در طول کشت، MSCs باعث افزایش تکثیر TNCs و حفظ HSCs در حالت ابتدایی می‌شوند. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که MSCs انواعی از سیگنال‌ها(لیگاندهای چسبندگی، سایتوکاین‌ها و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی)، فاکتورهای رونویسی و مولکول‌های سیگنال‌دهی را جهت تنظیم تکثیر، تمایز و بقای HSCs در بدن و در شرایط آزمایشگاهی فراهم می‌کنند(۴۳). به نظر می‌رسد تماس مستقیم بین HSCs و MSCs ، امری مهم برای حفظ stemness بوده و تاثیری قابل توجه بر روی عملکرد، فنوتیپ، مهاجرت و پروفایل بیان ژنی HSCs در شرایط آزمایشگاهی دارد(۴۶-۴۴، ۱۹).

آلاکل و همکاران نشان دادند که Non adherent HSCs از نظر عملکرد، فنوتیپ و کلونی‌زایی با adherent HSCs متفاوت می‌باشند. آن‌ها نشان دادند که فراکسیون سلولی چسبنده متشکل از سلول‌های ابتدایی‌تر می‌باشد، از این رو MSCs دارای اثرات قابل توجهی بر روی HSCs در سیستم‌های آزمایشگاهی می‌باشند. HSCs ابتدایی‌تر دارای تمایل بیشتری به MSCs می‌باشند(۴۷). در شرایط کشت اول، بسیاری از سلول‌های اولیه تمایز یافته و مارکر سطحی CD34 خود را از دست می‌دهند. از این رو MSCs جهت تکثیر HSCs ضروری می‌باشند.

مس در بسیاری از فرآیندهای سلولی از جمله تنظیم بیان ژن‌ها، عملکرد پروتئین‌ها و تکثیر و تمایز سلولی دخیل می‌باشد. با این حال به دلیل نقش آن در تولید گونه‌های فعال اکسیژن(ROSs) و افزایش مس سلولی، توکسیک می‌باشد(۴۸). در شرایطی که سلول‌های $CD34^+$ در حضور سایتوکاین‌ها و TEPA (شرایط کشت سوم) کشت داده شده بودند افزایش میزان تکثیر TNCs ، $CD34^+$cells و CFU-C مشاهده شد(به ترتیب ۵۲ ، ۴۴/۴۵ و ۵۸/۹۴ برابر). هر چند میزان تکثیر در این شرایط بیشتر از شرایط کشت اول بود اما کمتر از تکثیر در شرایط دوم بود. احتمالاً کاهش تکثیر ناشی از غیاب cell-to-cell contact و سایتوکاین‌های مترشحه از MSCs می‌باشد. مشخص شده است که فرآیندهای تکثیر و تمایز(به صورت متقابل) هر دو تحت تاثیر میزان مس قرار می‌گیرند اما در مقایسه با تکثیر، تمایز در اولویت قرار دارد(۲۳). پلد و همکاران اثرات TEPA ۱۰ µM را بر روی تکثیر سلول‌های $CD34^+$ ، مورد بررسی قرار دادند(۲۵-۲۳). در اولین مطالعه در سال ۲۰۰۱، این گروه اثرات TEPA، مس و سرولوپلاسمین را بر روی میزان مس سلولی و تکثیر سلول‌های $CD34^+$ ارزیابی کردند. در کشت‌هایی که در حضور سایتوکاین‌ها و TEPA انجام شده بودند، تعداد سلول‌های $CD34^+$ ، TNCs و CFU-C بیشتر و میزان مس

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

سلولی کمتر بود و در مقایسه با کشت‌هایی که تنها در حضور همان سایتوکاین‌ها انجام شده بودند با تاخیر در تمایز همراه بودند، در حالی که کشت‌های تیمار شده با مس نتایج بالعکسی را نشان دادند(۲۳). نتایج ما با این نتایج نیز مطابقت داشت. پلد و همکاران در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۴ اثر TEPA بر تکثیر سلول‌های $CD34^+$ و هم‌چنین پتانسیل پیوند آن‌ها به موش‌های SCID را بررسی نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که TEPA موجب افزایش تکثیر سلول‌ها گردیده و از این رو توانایی پیوند را تقویت می‌کند(۲۴). هر چند مکانیسم عملکرد TEPA نامشخص است اما نشان داده شده است که TEPA میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن(ROS) و فعالیت سیتوکروم C اکسیداز(CCO) که برای حفظ HSCs در مغز استخوان ضروری هستند، را کاهش می‌دهد(۵۰، ۴۹). به علاوه در این مطالعه برای اولین بار سلول‌های $CD34^+$ در همکشتی با BM-MSCs به عنوان لایه فیدر و در حضور سایتوکاین‌ها و TEPA (شرایط کشت چهارم) کشت داده شدند. میانگین میزان چند برابر شدن $TNCs,CD34^+cells$ و CFU-C در این شرایط به ترتیب ۱۱۸/۵، ۱۱۰/۱۱ و ۱۷۲/۹ بود.

آنالیز ایمونوفنوتیپی HSCs در شرایط کشت مختلف نشان داد که در شرایط کشت چهارم، سلول‌های $CD34^+CD38^-$ تکثیر بهتر و تمایز کمتری را نسبت به سایر شرایط کشت دارا می‌باشند. در واقع این مطالعه نشان داد که کاهش میزان مس درون سلولی با استفاده از TEPA در همکشتی قادر است سلول‌های $CD34^+$ را با کارایی بهتری در مقایسه با سایر شرایط تکثیر نماید. کاربرد ترکیبی MSCs و TEPA می‌تواند راه‌کار جدیدی جهت افزایش تکثیر HSCs باشد. امید به این که با تحقیقات بیشتر، این استراتژی برای تکثیر HSCs و پیوند بهتر مفید واقع شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، اثر هم زمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان لایه فیدر و کاهش یون مس جهت افزایش تعداد سلول‌های بنیادی خونساز و حفظ پتانسیل کلونی‌زایی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی مؤثر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد هماتولوژی است و در مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تهران و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تهران به انجام رسیده است.

References:

1- Conrad PD, Emerson SG. *Ex vivo* expansion of hematopoietic cells from umbilical cord blood for clinical transplantation. J Leukoc Biol 1998; 64(2): 147-55.
2- Lim M, Ye H, Panoskaltsis N, Drakakis EM, Yue X, Cass AE, Intelligent bioprocessing for haemotopoietic cell cultures using monitoring and design of experiments. Biotechnol Adv 2007; 25(4): 353-68.
3- Gordon MY. Stem cells for regenerative medicine--biological attributes and clinical application. Exp Hematol 2008; 36(6): 726-32.
4- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001; 414(6859): 105-11.
5- Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, *et al*. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. Annu Rev Immunol 2003; 21: 759-806.
6- Lane TA. Umbilical cord blood grafts for hematopoietic transplantation in adults: a cup half empty or half full? Transfusion 2005; 45(6): 1027-34.
7- Gluckman E, Rocha V, Chevret S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. Rev Clin Exp Hematol 2001; 5(2): 87-99.
8- Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. Blood 2000; 96(8): 2717-22.
9- Gilmore GL, DePasquale DK, Lister J, Shadduck RK. *Ex vivo* expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34(+) hematopoietic stem cells. Exp Hematol 2000; 28(11): 1297-305.
10- Kelly SS, Sola CB, de Lima M, Shpall E. *Ex vivo* expansion of cord blood. Bone Marrow Transplant 2009; 44(10): 673-81.
11- Yao CL, Chu IM, Hsieh TB, Hwang SM. A systematic

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

strategy to optimize *ex vivo* expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. Exp Hematol 2004; 32(8): 720-7.
12- Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, *et al*. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. N Engl J Med 2000; 342(25): 1846-54.
13- Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, *et al*. Transplantation of *ex vivo* expanded cord blood. Biol Blood Marrow Transplant 2002; 8(7): 368-76.
14- Sorrentino BP. Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells. Nat Rev Immunol 2004; 4(11): 878-88.
15- Martinez-Agosto JA, Mikkola HK, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. Genes Dev 2007; 21(23): 3044-60.
16- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, *et al*. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature 2003; 425(6960): 841-6.
17- Robinson S, Niu T, de Lima M, Ng J, Yang H, McMannis J, *et al*. *Ex vivo* expansion of umbilical cord blood. Cytotherapy 2005; 7(3): 243-50.
18- Gottschling S, Saffrich R, Seckinger A, Krause U, Horsch K, Miesala K, *et al*. Human mesenchymal stromal cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a beta1-integrin-dependent mechanism. Stem Cells 2007; 25(3): 798-806.
19- Jing D, Fonseca AV, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, *et al*. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells--modeling the niche compartments in vitro. Haematologica 2010; 95(4): 542-50.
20- Breems DA, Blokland EA, Siebel KE, Mayen AE, Engels LJ, Ploemacher RE. Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during *ex vivo* expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells. Blood 1998; 91(1): 111-7.
21- Blank U, Karlsson G, Karlsson S. Signaling pathways governing stem-cell fate. Blood 2008; 111(2): 492-503.
22- Huang X, Pierce LJ, Cobine PA, Winge DR, Spangrude GJ. Copper modulates the differentiation of mouse hematopoietic progenitor cells in culture. Cell Transplant 2009; 18(8): 887-97.
23- Peled T, Landau E, Prus E, Treves AJ, Nagler A, Fibach E. Cellular copper content modulates differentiation and self-renewal in cultures of cord blood-derived CD34+ cells. Br J Haematol 2002; 116(3): 655-61.
24- Peled T, Landau E, Mandel J, Glukhman E, Goudsmid NR, Nagler A, *et al*. Linear polyamine copper chelator tetraethylenepentamine augments long-term *ex vivo* expansion of cord blood-derived CD34+ cells and increases their engraftment potential in NOD/SCID mice. Exp Hematol 2004; 32(6): 547-55.
25- Peled T, Glukhman E, Hasson N, Adi S, Assor H, Yudin D, *et al*. Chelatable cellular copper modulates differentiation and self-renewal of cord blood-derived hematopoietic progenitor cells. Exp Hematol 2005; 33(10): 1092-100.
26- Percival SS, Layden-Patrice M. HL-60 cells can be made copper deficient by incubating with tetraethylenepentamine. J Nutr 1992; 122(12): 2424-9.
27- Bae B, Percival SS. Copper uptake and intracellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 Cells. Journal of Nutritional Biochemistry 1994; 5(9): 457-61.
28- Yang Sh, Cai H, Jin H, Fan J, Tan WS. Hematopoietic Reconstitution of CD34+ Cells Derived from Short-term Cultured Cord Blood Mononuclear Cells. Biotechnology and Bioprocess Engineering 2009; 14(4): 429-35.
29- Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, *et al*. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. Stem Cells 2004; 22(3): 377-84.
30- Raval BP, Suthar MP, Patel RK. In-vitro cytotoxicity screening of symplocos racemosa plant extract by MTT assay. International Journal of Pharmaceutical Research. 2009; 1(1): 31-5.
31- Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis JD, Karandish S, *et al*. Superior *ex vivo* cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Bone Marrow Transplant 2006; 37(4): 359-66.
32- Almeida-Porada G, Brown RL, MacKintosh FR, Zanjani ED. Evaluation of serum-free culture conditions able to support the *ex vivo* expansion and engraftment of human hematopoietic stem cells in the human-to-sheep xenograft model. J Hematother Stem Cell Res 2000; 9(5): 683-93.
33- Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KH, Sung KW, *et al*. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for *ex vivo* expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. Ann Hematol 2006; 85(4): 212-25.
34- Bachier CR, Gokmen E, Teale J, Lanzkron S, Childs C, Franklin W, *et al*. Ex-vivo expansion of bone marrow progenitor cells for hematopoietic reconstitution following high-dose chemotherapy for breast cancer. Exp Hematol 1999; 27(4): 615-23.
35- Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. Science 2000; 287(5457): 1442-6.
36- Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, *et al*. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86(10): 3828-32.
37- da Silva CL, Gonçalves R, Crapnell KB, Cabral JM, Zanjani ED, Almeida-Porada G. A human stromal-based serum-free culture system supports the *ex vivo* expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. Exp Hematol 2005; 33(7): 828-35.
38- Köhler T, Plettig R, Wetzstein W, Schaffer B, Ordemann R, Nagels HO, *et al*. Defining optimum conditions for the *ex vivo* expansion of human umbilical cord blood cells. Influences of progenitor

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

enrichment, interference with feeder layers, early-acting cytokines and agitation of culture vessels. Stem Cells 1999; 17(1): 19-24.
39- Ye ZQ, Burkholder JK, Qiu P, Schultz JC, Shahidi NT, Yang NS. Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(25): 12140-4.
40- Xie CG, Wang JF, Xiang Y, Jia BB, Qiu LY, Wang LJ, *et al*. Marrow mesenchymal stem cells transduced with TPO/FL genes as support for *ex vivo* expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. Cell Mol Life Sci 2005; 62(21): 2495-507.
41- Xie CG, Wang JF, Xiang Y, Qiu LY, Jia BB, Wang LJ, *et al*. Cocultivation of umbilical cord blood CD34+ cells with retro-transduced hMSCs leads to effective amplification of long-term culture-initiating cells. World J Gastroenterol 2006; 12(3): 393-402.
42- Kögler G, Callejas J, Sorg RV, Fischer J, Migliaccio AR, Wernet P. The effect of different thawing methods, growth factor combinations and media on the *ex vivo* expansion of umbilical cord blood primitive and committed progenitors. Bone Marrow Transplant 1998; 21(3): 233-41.
43- Verfaillie CM. Hematopoietic stem cells for transplantation. Nat Immunol 2002; 3(4): 314-7.
44- Alakel N, Jing D, Muller K, Bornhauser M, Ehninger G, Ordemann R. Direct contact with mesenchymal stromal cells affects migratory behavior and gene expression profile of CD133+ hematopoietic stem cells during *ex vivo* expansion. Exp Hematol 2009; 37(4): 504-13.
45- Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nat Rev Immunol 2006; 6(2): 93-106.
46- Gottschling S, Saffrich R, Seckinger A, Krause U, Horsch K, Miesala K, *et al*. Human mesenchymal stromal cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a beta1-integrin-dependent mechanism. Stem Cells 2007; 25(3): 798-806.
47- Wagner W, Wein F, Roderburg C, Saffrich R, Faber A, Krause U, *et al*. Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction. Exp Hematol 2007; 35(2): 314-25.
48- Leary SC, Winge DR. The Janus face of copper: its expanding roles in biology and the pathophysiology of disease. Meeting on Copper and Related Metals in Biology. EMBO Rep 2007; 8(3): 224-7.
49- Chen CT, Shih YR, Kuo TK, Lee OK, Wei YH. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Stem Cells 2008; 26(4): 960-8.
50- Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, *et al*. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature 2004; 431(7011): 997-1002.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2014; 10(4): 353-363

Original Article

Evaluation of Umbilical Cord Blood CD34$^+$ Hematopoietic Stem Cell Expansion in Co-culture with BM Mesenchymal Stem Cells in Presence of TEPA

Amirizadeh N.[1], Zaker F.[2], Nasiri N.[3]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2]School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Hematopoietic stem cells (HSCs) have become a standard protocol for the treatment of many hematologic malignancies and non-malignant disorders. Umbilical cord blood, as a source of HSCs, has many advantages compared to other sources. One major drawback in using this source in transplantation is the low HSC dose available. *Ex vivo* expansion of HSCs is a solution to overcome this limitation. In this study, we used TEPA, as a Cu chelator, and human bone marrow MSCs to investigate the expansion rate of UCB-HSCs.

Materials and Methods

CB-HSCs were isolated using miniMACS magnetic separation system. We cultured the enriched CD34$^+$ cells in various conditions. Culture condition A, supplemented only with recombinant cytokines; culture condition B, supplemented with BM-MSCs as a cell feeder layer and recombinant cytokines; culture condition C, supplemented with recombinant cytokines and TEPA; culture condition D, supplemented with recombinant cytokines, BM-MSCs as a cell feeder layer and TEPA. In order to evaluate the HSC expansion, we performed cell count, the analysis of CD34$^+$ expression by flow cytometery, and CFU assay on day 10 after culture.

Results

The most fold increase rate in CD34$^+$ cell, TNCs and CFU-C was observed in the culture condition D (110.11 ± 15.3, 118.5 ± 21 and 172.9 ± 44.7, respectively) compared to other conditions.

Conclusions

The results showed that co-culture of HSCs with BM-MSCs in the presence of copper chelating agent (TEPA) could dramatically increase the expansion rate of UCB-HSCs. Therefore, this strategy could be useful for HSC expansion.

Key words: Hematopoietic Stem Cells, Mesenchymal Stromal Cells, TEPA

Received: 23 Jan 2012
Accepted:10 Apr 2013

Correspondence: Nasiri N., MSc of Hematology. School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences.
P.O.Box: 14155-6183, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88622576; Fax: (+9821) 88622576
E-mail: *nahid.nasiri64@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-10]