

# دانشور

## پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست و چهارم-شماره ۱۲۷  
اسفند ۱۳۹۵

دریافت: ۵۴/۱۰/۱۹  
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۱۱/۲۴  
پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۰۱

## بررسی اثر عصاره پلاکتی مشتق از خون بندناف بر تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف در آزمایشگاه

نویسندگان: منیره محمد<sup>۱،۲</sup>، مرضیه ابراهیمی<sup>۳</sup>، فاطمه دانشمند<sup>۴</sup>، معصومه نوری<sup>۵</sup>،  
پرديس خسروانی<sup>۶</sup>

۱. دانشجوی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه دانشگاه پیام نور مرکز تفت، دانشگاه جامع  
استان یزد، یزد

۲. کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست پزشکی ترمیمی،  
پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی تهران، تهران

۳. دانشیار پژوهشگاه رویان، PhD ایمنولوژی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های  
بنیادی و زیست پزشکی ترمیمی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد  
دانشگاهی تهران، تهران

۴. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

۵. دکتری ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست پزشکی ترمیمی،  
پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی تهران، تهران

۶. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی تکوین، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی  
و زیست‌شناسی تکوینی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی  
تهران، تهران

E-mail: mebrahimi@royaninstitute.org

\* نویسنده مسئول: مرضیه ابراهیمی

### چکیده

مقدمه و هدف: علی‌رغم نتایج رضایت‌بخش پیوند خون بندناف در درمان بعضی بیماری‌های خونی،  
یکی از چالش‌ها در این زمینه، حل مشکل تعداد کم این سلول‌ها می‌باشد. سال‌های اخیر عصاره پلاکتی  
به‌لحاظ غنی‌بودن از فاکتورهای رشد به‌عنوان مکمل کشت سلول مزانشیم در سلول درمانی معرفی شده است. هدف  
این مطالعه، بررسی اثر عصاره پلاکتی مشتق از خون بندناف بر تکثیر، تمایز و درصد زنده‌مانی  
سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف در شرایط آزمایشگاهی است.

**مواد و روش‌ها:** کنسانتره پلاکتی در غلظت  $2 \times 10^9 \text{ plt/ml}$  از پلاسماي خون بندناف تهیه شد. تعداد ۱۰۶  
سلول تک‌هسته‌ای خون بندناف در حضور سایتوکاین‌های SCF، Flt3L، TPO حاوی غلظت‌های متفاوت  
(۱۰٪-۰) از عصاره پلاکتی مشتق از خون بندناف کشت شدند. درصد زنده‌مانی این سلول‌ها با استفاده  
از رنگ‌آمیزی تریپان بلو، سنجش تمایز سلول‌های تک‌هسته‌ای آزمایش Colony Assay، اندازه‌گیری  
درصد سلول‌های بنیادی خون‌ساز با شاخص سطحی (CD133+ CD34+ CD38-) از طریق  
فلوسایتومتری و بیان کمی ژن CD34 با روش QRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** غلظت ۵٪ عصاره پلاکتی مشتق از خون بندناف همراه با سایتوکاین‌ها سبب تکثیر ۱۲ برابری  
( $P < 0.0001$ ) سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف، ۱/۶ برابر کلونی BFU-E، ۲/۱ CFU-GM، ۱/۷ CFU-  
MIX و ۳/۳ برابر سلول‌های CD133+ CD34+ CD38- می‌شود. ژن CD34 نیز در گروه ۵٪ UCB-LP  
افزایش معنی‌دار نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** عصاره پلاکتی خون بندناف را می‌توان به‌عنوان مکمل در کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون  
بندناف و سلول‌های بنیادی خون‌ساز به‌منظور افزایش تکثیر و حفظ خاصیت بنیادی آن‌ها استفاده کرد.  
واژگان کلیدی: سلول‌های خون بندناف، تکثیر و تمایز، عصاره پلاکتی مشتق از خون بندناف،  
کلونی‌زایی

## مقدمه

مطالعه و بررسی سلول‌های بنیادی خون‌ساز<sup>۱</sup> در خط مقدم تحقیقات سلول‌های بنیادی با کاربردهای پزشکی قرار دارد. امروزه از این سلول‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌های خوش‌خیم و بدخیم سیستم خونی و ایمنی استفاده می‌شود. سه منبع پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز، مغز استخوان، خون محیطی و خون بندناف می‌باشند (۱). خون بندناف در مقایسه با مغز استخوان بالغ، نسبت بیشتری از سلول‌های پیش‌ساز خون‌ساز ابتدایی را دارد. این سلول‌ها پاسخ‌های تکثیری بالاتری در محیط آزمایشگاه و ظرفیت پیوندی بیشتری در بدن نشان می‌دهند (۲). همچنین دسترسی سریع و آسان از طریق بانک‌های متعدد خون بندناف، انطباق بالاتر در سازگاری HLA، شیوع کمتر واکنش شدید پیوند علیه میزبان Graft Versus Host Disease (GVHD)، کاهش خطر انتقال عفونت‌های ویروسی و در نهایت، عدم وجود خطر برای فرد اهداکننده از جمله مزیت‌های دیگر پیوند خون بندناف می‌باشند (۳). با این وجود، تعداد کم سلول‌های خون‌ساز خون بندناف پیوند این سلول‌ها را به کودکان بیمار با وزن پایین محدود می‌کند (۴).

ازدیاد سلول‌های بنیادی خون بندناف می‌تواند بر مشکل تعداد اندک این سلول‌ها در بحث پیوند فائق آید؛ ولی القای تقسیم self-renewal و در مقیاس کافی نیز مهم‌ترین مشکل تکثیر این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. ازدیاد حقیقی HSCs زمانی رخ می‌دهد که هم‌زمان با تحریک تکثیر این سلول‌ها توسط فاکتورهای مختلف رشد خون‌ساز، مسیرهای تمایزی، مرگ و پیری سلول‌های در حال تکثیر، توسط سایر عوامل داخلی یا خارجی سلول مهار شوند (۵). گرچه تاکنون تلاش‌های زیادی برای تکثیر بدون تمایز این سلول‌ها صورت گرفته، تنها تعدادی از آن‌ها موفق و مقرون‌به‌صرفه هستند که رایج‌ترین آن‌ها، کشت در حضور سیتوکین‌های محرک و فاکتورهای رشد خون‌ساز

(۶)، هم‌کشتی با سلول‌های استرومایی (۷) و کشت در بیوراکتور می‌باشد (۸).

استفاده پلاکت‌ها برای بیمارانی که کمبود پلاکت دارند یا عملکرد پلاکت‌های آن‌ها دچار مشکل است، از دیرباز مورد توجه بوده است. امروزه علاوه بر پلاکت، از محصولات پلاکتی نیز برای درمان بیماری‌هایی همچون درمان زخم‌های پوستی، جراحی دهان، فک و صورت، ارتوپدی، جراحی ستون فقرات، جراحی سر و گردن، جراحی قلب و رفع چین‌وچروک و همچنین در سلول‌درمانی استفاده می‌شود (۹). مطالعاتی نیز عصاره پلاکتی را به‌عنوان جایگزین سرم گاوی در کشت و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست، اندوتلیال، کراتینوسایت و سلول بنیادی مزانشیمی مطرح می‌کنند (۱۰).

با توجه به اینکه عصاره پلاکتی حاوی همچون فاکتورهای رشدی b-FGF, VEGF, IL-1 $\beta$ , PDGF, TGF $\beta$  می‌باشد (۱۱)، به نظر می‌رسد بتوان آن را در محیط کشت سلول به‌عنوان مکمل کشت برای رسیدن به نتیجه تکثیری مناسب استفاده نمود. هدف این مطالعه بررسی اثر عصاره پلاکتی مشتق از خون بندناف بر تکثیر و تمایز سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف در آزمایشگاه می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

۱. تهیه عصاره پلاکتی مشتق از خون بندناف (UCB-PL)  
خون بندناف از بانک عمومی خون بندناف رویان تهیه گردید. تمام دهندگان خون رضایتنامه مربوطه اهدای خون برای انجام تحقیقات را امضا نموده بودند. تمام واحدهای خونی مورد استفاده فاقد عفونت‌های ویروسی و میکروبی بودند. برای تهیه عصاره پلاکتی، پلاسماهای چهار واحد خون بندناف به داخل کیسه‌های فاقد ماده ضدانعقاد با حجم ۵۰۰ ml منتقل و با دور ۳۰۰×g، به مدت ۲۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع زردرنگ بالایی که پلاسما غنی از پلاکت می‌باشد، با استفاده از

<sup>۱</sup> Hematopoietic Stem Cells: HSCS

شرکت SIGMA تهیه گردید) کشت شدند. گروه‌های مورد بررسی در این مطالعه عبارت از چهار گروه بودند. الف) کنترل منفی: سلول‌ها در حضور محیط کشت پایه بدون سایتوکاین‌ها کشت شد.

ب) کنترل مثبت: سلول‌ها در محیط کشت پایه همراه با سایتوکاین‌های SCF, FLT3L, TPO با غلظت‌های ذکر شده کشت شدند.

ج) گروه تست UCB-PL + Cytokines که با توجه به غلظت‌های مختلف UCB-PL به چهار زیرگروه تقسیم می‌شود: سلول‌ها در محیط کشت پایه همراه با سایتوکاین‌های SCF, FLT3L, TPO و غلظت‌های ۱٪، ۲/۵٪، ۵٪ و ۱۰٪ از UCB-PL کشت شدند.

د) گروه تست UCB-PL که با توجه به غلظت‌های مختلف UCB-PL به چهار زیرگروه تقسیم می‌شود: سلول‌ها در محیط کشت پایه و در حضور غلظت‌های ۱٪، ۲/۵٪، ۵٪ و ۱۰٪ از UCB-PL کشت شدند. (در این گروه هیچ سایتوکاینی به محیط اضافه نشد).

در همه گروه‌ها، سلول‌ها در دمای ۳۷°C، CO<sub>2</sub> ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ انکوبه شدند. هر چهار روز یک بار تعویض محیط کشت سلول‌ها انجام شد. در روزهای ۴، ۸، ۱۵ و ۲۳ بعد از کشت، متغیرهای مورد مطالعه شامل شمارش سلول‌های تک‌هسته‌ای، تعیین درصد زنده‌مانی سلول‌ها، تست سنجش کلونی، بررسی بیان ژن CD34 به روش QRT-PCR و سنجش شاخص‌های سطحی CD133+CD34+CD38- با روش فلوسایتومتری انجام شد.

#### ۴. سنجش کلونی

۱×۱۰<sup>۴</sup> سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف از هر چهار گروه مورد مطالعه در روزهای ۴، ۸، ۱۵ و ۲۳ بعد از کشت برداشته شد و با ۲ میلی‌لیتر محیط متیل سلولز (استم سل تکنولوژی، Methocult™ GF+ H4435) حاوی سایتوکاین‌های CSF10 ng/mL، CSF10 ng/mL، CSF-GM10، EPO 10ng/mL و SCF 3μ/ml، JL3- 10ng/mL در چاهک‌های شش‌خانه‌ای به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و فشار ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه شدند.

plasma extractor به کیسه انتقالی و در دور ۳۰۰×g، دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا رسوب پلاکتی تهیه شود. سوسپانسیون پلاکتی به غلظت ۲×۱۰<sup>۹</sup>plt/ml تهیه شد و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در داخل فریزر ۷۰°C- ذخیره شدند. عصاره سلولی به صورت مکانیکی و از طریق انجماد و ذوب سوسپانسیون پلاکتی تهیه شد. این فرایند منجر به پاره شدن گرانول‌های پلاکتی و آزاد شدن فاکتورهای رشد آن‌ها می‌شود. برای حذف بقایای پلاکت‌ها، محلول حاصل در دور ۳۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ و محلول رویی جمع‌آوری و عصاره پلاکتی (UCB-PL) Umbilical Cord Blood Platelet lysate نامیده شد. عصاره پلاکتی حاصل با فیلتر ۰/۲ فیلتر و در حجم‌های ۱۰ تا ۲۰ میلی‌لیتر تقسیم‌بندی و در فریزر ۲۰°C- تا زمان استفاده ذخیره شد.

#### ۲. جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف

واحدهای خون بندناف اهدایی که به علت تعداد ناکافی سلول‌ها واجد شرایط نگهداری نبودند، از بانک خون عمومی بندناف پژوهشگاه رویان دریافت شدند. همه نمونه‌ها رضایت‌نامه اهدا را داشتند و از نظر آزمایش‌های ویروسی منفی بودند. به منظور رسوب گلبول‌های قرمز، هیدروکسی اتیل استارچ (۱۰٪ Flex) 14FH7320Free به نسبت ۱ به ۵ (V/V) به خون تام اضافه و پس از مخلوط کردن به مدت ۶۰ تا ۴۰ دقیقه بدون حرکت و در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس مایع رویی حاوی سلول‌های سفید به لوله جداگانه‌ای منتقل و سپس تعداد سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش و درصد زنده‌مانی آن‌ها توسط تریپان‌بلو محاسبه گردید.

#### ۳. کشت سلول

۱×۱۰<sup>۶</sup> از سلول‌های UCB-MNC جدا شده در محیط کشت (SIGMA) Stem Line حاوی اسید آمینه آل‌گلوتامین (۰/۵ میلی‌مولار) به همراه فاکتورهای رشد SCF و (۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر)، FLT3L (۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) و TPO (۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) (کلیه فاکتورهای رشد از

ابتدا سوسپانسیونی از سلول‌ها به تعداد یک میلیون در ۱۰۰ میکرولیتر PBS تهیه شد. آنتی‌بادی‌های فوق هر کدام به غلظت ۱/۱۰۰ استفاده شد. آنتی‌بادی‌های mouse IgG1 به عنوان کنتروله به فلوروکروم‌های PE, FITC, PE-Cy5 به عنوان ایزوتایپ کنترل انتخاب شدند. ۱۰۰۰۰ سلول توسط دستگاه فلوسایتومتری FACSCalibur از شرکت BD با لیزر ۴۸۸ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های رنگ PE روی فیلتر ۵۸۵/۴۲، رنگ سبز روی فیلتر ۵۳۳/۱۵ و رنگ PE-Cy5 روی فیلتر ۶۴۷ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنالیز نمونه‌ها با نرم‌افزار cell Quest انجام شد.

#### ۷. بررسی آماری

بررسی آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶، Excell و تست پارامتریک ANOVA انجام شده است. برای تعیین معنی‌داری بین گروه‌های تیمار شده با عصاره پلاکتی مشتق از خون بندناف و گروه‌های کنترل در سلول‌های تک‌هسته‌ای اختلاف  $P \leq 0.05$ ، به عنوان اختلاف معنی‌دار محاسبه شد. تعداد تکرارها و نمایش به صورت  $Mean \pm SD$  محاسبه شده است.

#### نتایج

میانگین حجم تعداد ۵ نمونه از واحدهای خون بندناف که به‌طور تصادفی انتخاب شده بودند، ۹/۱۴  $\pm 61/76$  میلی‌لیتر و میانگین تعداد سلول تک‌هسته‌ای اولیه در هر میلی‌لیتر خون قبل از جداسازی گلبول قرمز ۱/۱۵  $\pm 5/7 \times 10^6$  با زنده‌مانی  $1 \pm 100\%$  و بعد از جداسازی به ۰/۹۱  $\pm 4/9 \times 10^6$  با زنده‌مانی  $1 \pm 99\%$  بود.

۱. بررسی اثر UCB-PL در تکثیر سلول‌های UCB-MNC  
برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف UCB-PL بر میزان تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف تعداد ۱۰۶ در میلی‌لیتر سلول در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای طبق روش ذکر شده، کشت شد.

همان‌طور که در شکل A-۱ نشان داده شده است، گروه UCB-PL همراه با سایتوکاین‌ها ماکزیمم تکثیر

تعداد کلونی‌های اریتروئیدی (Burst Forming Unit- Erythroid: BFU-E)، گرانولوسیت-ماکروفاژ (Colony-Forming unit Granulocyte-Macrophage: CFU-GM)، گرانولوسیت-اریتروئید-ماکروفاژ- مگاکاریوسیت (Colony Forming Unit - Granulocyte / Erythroid Macrophage / Megakaryocyte: CFU-Mix) پس از ۱۴ روز کشت با میکروسکوپ نوری شمارش گردیدند.

#### ۵. بررسی بیان ژن CD ۳۴+ به روش QRT-PCR

ابتدا RNA ژنومی استخراج و با استفاده از کیت (Japan, Takara)، cDNA ساخته شد. مخلوط واکنش شامل ۳  $\mu\text{L}$  از cDNA ساخته شده، ۲  $\mu\text{L}$  پرایمرهای اختصاصی، ۱۰  $\mu\text{L}$  از SYBR Green PCR Master Mix (USAABI) و ۵  $\mu\text{L}$  ddHO در لوله‌های ویژه تهیه گردید. واکنش تکثیر بر طبق الگوی دمایی خاص، ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱۲ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و ۴۰ مرتبه تکرار مراحل از مرحله ۲ در داخل دستگاه AB Step-one plus اجرا گردید. برای آنالیزها از نرم‌افزار STEP One نسخه شماره ۲ استفاده گردید. پروفایل بیان ژنی به‌طور نسبی و با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه گردید. ژن GAPDH به‌عنوان ژن Housekeeping انتخاب گردید. توالی پرایمرها برای ژن RCD34+،

F: 5'TGGACCGCGCTTTGCT3' و

R: 5'CCCTGGGTAGGTAAGTCTGGG3'

و برای ژن GAPDH،

F: 5'GAAATCCCATCACCATCTTCC3' R:

5'GGCTGTTGTCATACTTCTCAT3' بود

۶. بررسی ایمنوفنوتیپ سلول‌های کشت‌شده توسط فلوسیتومتری

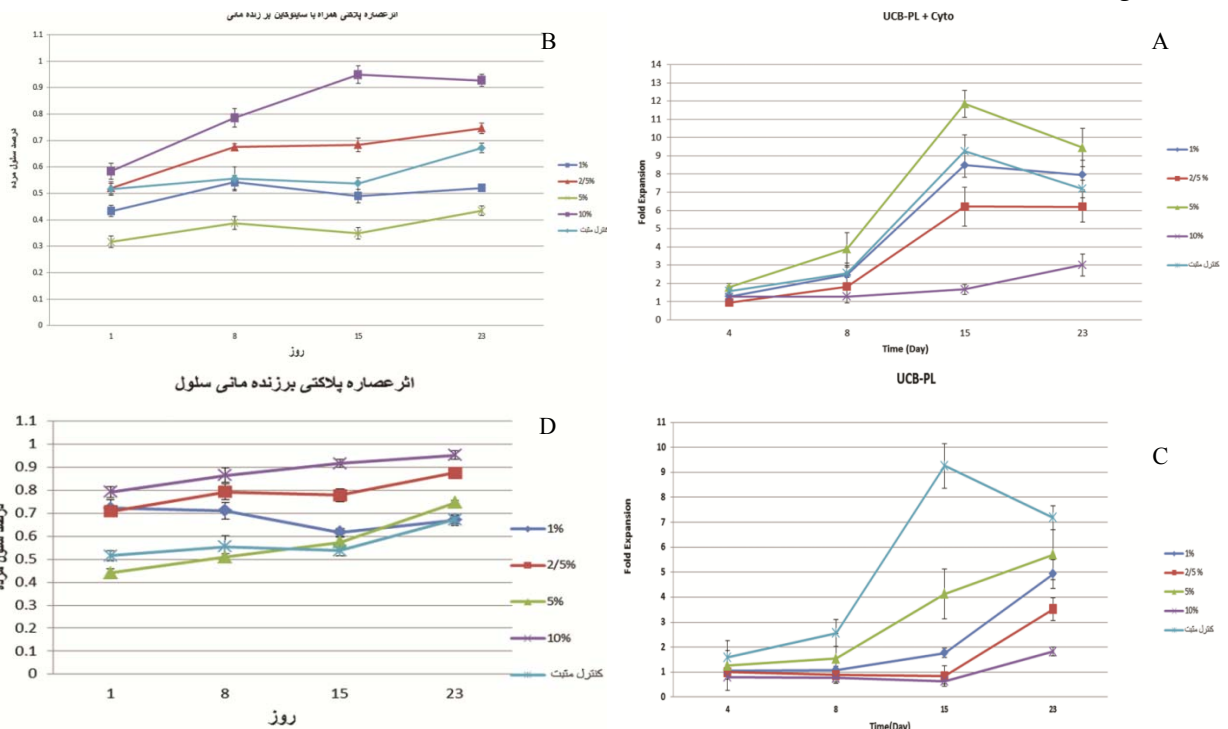
به‌منظور آنالیز شاخص‌های سطحی CD133+CD34+CD38- از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال CD133-PE (miltenybiotec)، CD38-PE-CY5 (Ebioscience) و CD34-FITC (BD) به‌طور همزمان با هم، استفاده شد.

سلول‌ها در همه گروه‌ها به جز گروه ۱۰٪ UCB-PL در روز پانزدهم مشاهده شد و پس از آن تا روز بیست‌وسوم تعداد سلولی کاهش یافت. تعداد سلول‌ها در گروه ۵٪ UCB-PL حاوی سایتوکاین‌ها نسبت به سایر گروه‌ها و حتی نسبت به گروه کنترل مثبت به طور معنی‌داری بیشتر بود ( $P < 0/0001$ ). ولی اختلاف معنی‌داری در تکثیر سلول‌ها، بین غلظت ۱٪ از UCB-PL همراه با سایتوکاین‌ها و گروه کنترل مثبت وجود نداشت ( $P < 0/05$ ). کمترین تعداد سلول در گروه ۱۰٪ UCB-PL مشاهده شد که می‌تواند به دلیل افزایش اثرات سمی این ماده در غلظت‌های بالاتر باشد (شکل B-۱). گروه کنترل منفی حاوی بیشترین درصد از سلول‌های مرده ( $1/49 \pm 62/26$ ) و گروه ۵٪ UCB-PL همراه با سایتوکاین‌ها کمترین درصد از سلول‌های مرده ( $1/15 \pm 21/96$ ) را دارا بودند (شکل B-۱،  $P < 0/0001$ ).

برای پاسخ به این سؤال که آیا UCB-PL به تنهایی کفایت لازم برای تکثیر UCB-MNC را دارد، سایتوکاین‌ها از محیط کشت حذف شدند و کشت

در غلظت‌های متفاوت UCB-PL انجام گرفت. همان‌طور که نتایج در شکل C-1 نشان داده شده است، برخلاف گروه‌های حاوی سایتوکاین که ماکزیمم رشد در روز پانزدهم مشاهده شد، در این گروه ماکزیمم رشد در روز بیست‌وسوم کشت مشاهده شد. همچنین تعداد سلول‌ها در همه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش نشان داد ( $P < 0/0001$ ). به این ترتیب به نظر می‌رسد که UCB-PL به تنهایی قادر به راه‌اندازی تکثیر سلول‌ها نمی‌باشد. از میان گروه‌ها، گروه دریافت‌کننده UCB-PL ۱٪ و ۵٪ از تعداد سلول‌های بیشتری برخوردار بودند ( $P < 0/0001$ ). نتایج بررسی زنده‌مانی سلول‌ها در این گروه نیز حاکی از اثرات سمی UCB-PL در غلظت‌های بالاتر از ۵٪ UCB-PL بود (شکل D-1). با توجه به نتایج فوق گروه ۱٪ و ۵٪ UCB-PL همراه با سایتوکاین‌ها برای ادامه مطالعه انتخاب شدند.

برای پاسخ به این سؤال که آیا UCB-PL به تنهایی کفایت لازم برای تکثیر UCB-MNC را دارد، سایتوکاین‌ها از محیط کشت حذف شدند و کشت



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف UCB-PL در حضور سایتوکاین‌ها، (A) در تکثیر و (B) درصد زنده‌مانی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف.

اثر غلظت‌های مختلف UCB-PL به تنهایی، (C) در تکثیر و (D) درصد زنده‌مانی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بند ناف. نتایج حاصل ۳ تکرار زیستی مختلف و به صورت Mean  $\pm$  SD نشان داده شده است ( $P < 0/0001$ ).

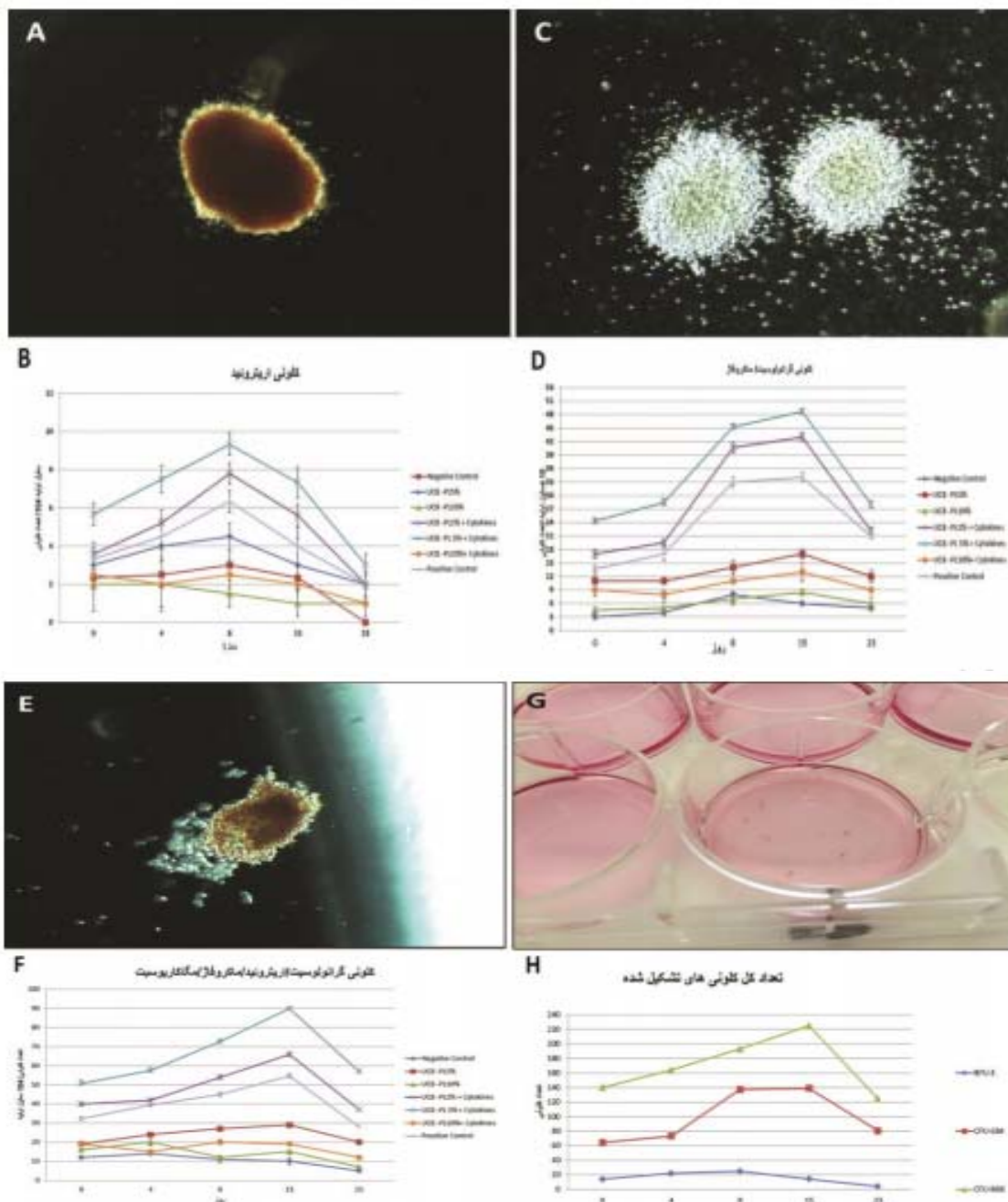
### ۳. بررسی سلول‌های بنیادی خون‌ساز در محیط کشت

#### حاوی UCB-PL

از آنجاکه نتایج آزمایش تکثیر سلولی نشان داد دز ۵٪ و ۱٪ UCB-PL به همراه سایتوکاین‌ها در تکثیر و تمایز UCB-MNC مؤثر است، درصد سلول‌های CD 133+ CD38- CD34+ توسط فلوسایتومتری و بیان ژن CD34 با استفاده از QRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد درصد سلول‌های CD 133+ CD34+ CD38- در روز بیست‌وسوم در گروه کنترل مثبت ۸٪، در گروه ۱٪ UCB-PL حدود ۵٪ و در گروه ۵٪ UCB-PL حدود ۲۵٪ بود (شکل A-3،  $P < 0/0001$ ). همچنین بیان ژن CD34 در گروه ۵٪ UCB-PL در روز پانزدهم نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری داشت؛ به طوری که نسبت به گروه کنترل مثبت ۳ برابر و نسبت به گروه ۱٪ UCB-PL ۲/۳ برابر افزایش بیان را نشان داد (شکل B-3،  $P < 0/05$ ).

### ۲. بررسی تمایز در سلول‌های کشت‌شده با UCB-PL

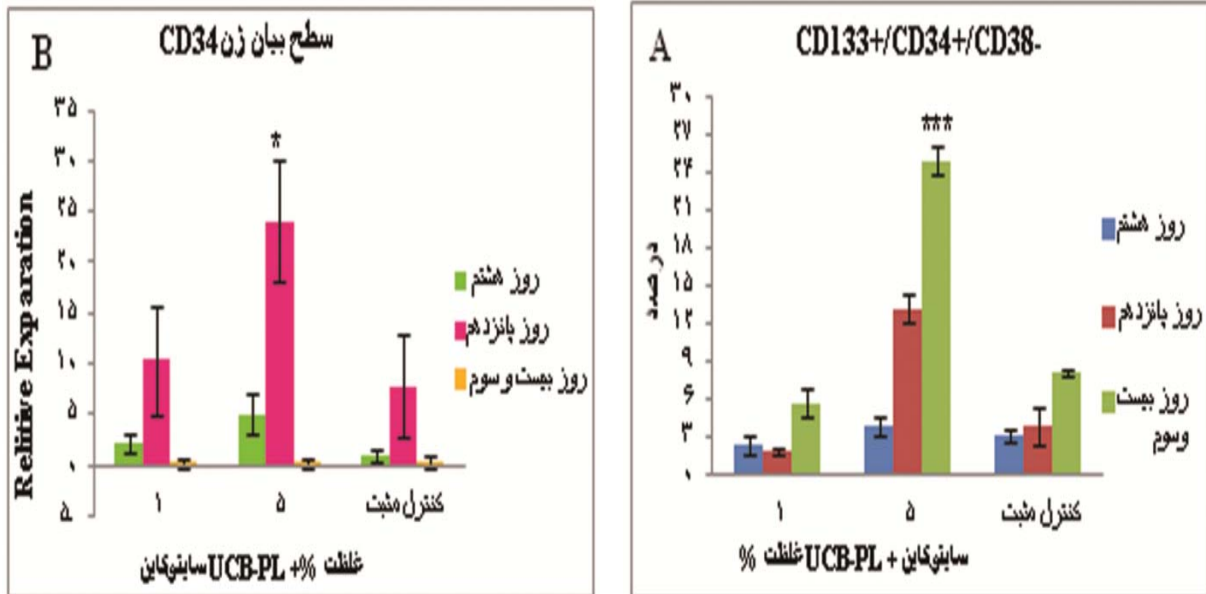
آزمون سنجش کلونی به منظور بررسی پتانسیل تمایزی سلول‌های کشت‌شده با استفاده از محیط کشت MethoCult. به صورت تکرارهای ۳ تایی انجام شد. در شکل A:2- نمای میکروسکوپی کلونی‌های BFU-E، C- کلونی‌های CFU-GM و E- کلونی‌های CFU-Mix نشان داده شده است. پتانسیل تمایز سلول‌های تکهسته‌ای خون بندناف به پیش‌سازهای مختلف خون‌ساز در فواصل زمانی صفر، ۴، ۸، ۱۵ و ۲۳ روز پس از کشت در شکل ۲ نشان می‌دهد که (B) تعداد کلونی BFU-E در گروه ۵٪ UCB-PL به همراه سایتوکاین‌ها افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مثبت و سایر گروه‌ها داشت ( $P < 0/0001$ ). در تمام گروه‌ها ماکزیمم تعداد کلونی BFU-E در روز هشتم مشاهده شد و کاهش تعداد کلونی با افزایش زمان کشت مشاهده گردید و شکل F و D ماکزیمم کلونی‌های CFU-GM، CFU-Mix در روز پانزدهم کشت مشاهده شد در گروه‌های کنترل مثبت، ۱٪ و ۵٪ UCB-PL همراه با سایتوکاین‌ها افزایش معنی‌داری در تعداد کلونی‌های CFU-Mix و CFU-GM نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده شد که از بین آن‌ها گروه ۵٪ UCB-PL به همراه سایتوکاین اثر غالب‌تر بر القای کلونی CFU-GM و CFU-Mix و افزایش معنی‌دار در تعداد این نوع کلونی‌ها نسبت به گروه کنترل مثبت و سایر گروه‌ها نشان داد ( $P < 0/0001$ ).



شکل ۲. بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت UCB-PL بر تشکیل کلونی‌های رده‌ی اریتروئیدی، رده‌ی گرانولوسیت-ماکروفاژ، (C,D)

رده‌ی گرانولوسیت-اریتروئید-ماکروفاژ-مگاکاریوسیت، (H) تعداد کل کلونی‌های تشکیل شده روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف در فواصل زمانی ۰، ۴، ۸، ۱۵ و ۲۳ روز پس از کشت، نتایج حاصل ۳ تکرار زیستی مختلف و به صورت Mean ± SD نشان داده شده است ( $P < 0.001$ ).

تصویر میکروسکوپی (A) کلونی رده‌ی اریتروئیدی، (C) کلونی رده‌ی گرانولوسیت-ماکروفاژ، (E) کلونی رده‌ی گرانولوسیت-اریتروئید-ماکروفاژ-مگاکاریوسیت (G) نمای کلی از تشکیل کلونی‌ها در پلیت ۶ خانه.



شکل ۳. بررسی سلول‌های بنیادی خون‌ساز در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱٪ و ۵٪ UCB-PL

(A) درصد سلول‌های CD133+ CD34+ CD38- (\*\*) (P < 0.05) (\*\*\*= P < 0.001) در (B) بیان ژن CD34 (C) بیان ژن CD34

### بحث

پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز از جمله روش‌های درمانی مؤثر برای درمان بدخیمی‌ها و ناهنجاری‌های خونی می‌باشد (۱۳). این سلول‌ها از منابع گوناگون چون مغز استخوان، خون محیطی و خون بندناف قابل استخراج هستند. امکان دسترسی بالا به سلول‌های بنیادی خون‌ساز خون بندناف و همچنین ظرفیت بیولوژی بسیار بالای این سلول‌ها، این سلول‌ها را به اهداف بسیار مهمی برای سلول‌درمانی و پیوند مغز استخوان مبدل می‌کند. اما تعداد کم سلول‌ها در هر واحد خون بندناف، استفاده از آن‌ها را در موارد پیوند مغز استخوان بزرگسالان محدود می‌کند (۱۴). به این ترتیب تکثیر این سلول‌ها و پیش‌سازهای خونی در محیط آزمایشگاهی امری ضروری به نظر می‌رسد.

گرانول‌های پلاکت‌ها حاوی انواع فاکتورهای رشد شامل فاکتور رشد تراریختی TGF- $\beta$ ، فاکتور رشد شبه‌انسولینی IGF، فاکتور رشد اپیدرمی EGF، فاکتور رشد رگ‌زایی VEGF، فاکتور رشد مشتق از پلاکت PDGF، فاکتور رشد فیبروبلاستی FGF، اینترلوکین ۸ (IL-8) اینترلوکین ۱ بتا (IL-1 $\beta$ )، فاکتور محرک کلونی‌زایی گرانولوسیت-ماکروفاژ (CSF-GM) می‌باشد که این فاکتورها مسیرهای سیگنالینگ متنوعی را درون سلول راه‌اندازی می‌کنند که باعث پاسخ‌های متفاوت سلول نظیر تکثیر، مهاجرت، تمایز سلول می‌شوند (۱۲). خون بندناف یکی از منابع با دسترسی آسان برای استخراج پلاکت‌ها می‌باشد.



شامل تعداد کل سلول‌های هسته‌دار و حتی تعداد سلول‌های CD34 فاکتور مهم‌تری محسوب می‌گردد (۱۸).

مطالعه محتویات عصاره پلاکتی مکانیسم اثر این عصاره را بر سلول‌های خون‌ساز روشن می‌سازد. فاکتور رشد فیبروبلاستی bFGF (۲-FGF) موجود در پلاکت‌ها، یکی از عوامل مهم رگ‌زایی است که در تعامل با سایتوکاین‌های خون‌ساز (SCF, IL-3, GM-CSF, IL-6) در تنظیم هماتوپویزیس نقش دارد. همچنین با اثر بر روی سلول‌های استرومال و پیش‌ساز سلول‌های خون‌ساز، اثر تنظیم‌کنندگی مثبتی بر روی خون‌سازی و اثر غیرمستقیم بر روی تکثیر مگاکاریوسیت‌ها دارد. به‌این ترتیب b-FGF نقش مهمی در تمایز سلول‌های اولیه خون‌ساز به صورت فیزیولوژیکی و پاتولوژیک بازی می‌کند (۱۹، ۲۰).

فاکتور رشد شبه‌انسولینی (IGF-1) موجود در پلاکت‌ها، باعث بهبود سرعت تکثیر پلاکت، گلبول قرمز و سلول بنیادی می‌شود. همچنین از آپوپتوز و مرگ سلولی، سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های پیش‌ساز جلوگیری می‌کند (۲۱). در حال حاضر، در سطح بسیاری از بافت‌ها گیرنده فاکتور رشد شبه‌انسولینی وجود دارد. این گیرنده از نوع تیروزین‌کینازی می‌باشد و اتصال IGF-1 به گیرنده باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ AKT می‌شود. IGF-1 یکی از قوی‌ترین فعال‌کننده‌های این مسیر به‌شمار می‌آید (۲۲، ۲۳). فاکتور رشد پلاکتی VEGF به‌همراه bFGF بر روی سلول‌های همانژیوبلاست از طریق گیرنده تیروزین‌کیناز FLK-1 اثر گذاشته و موجب تکثیر سلول‌های همانژیوبلاست و خون‌سازی از طریق افزایش عملکرد سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌شود (۲۴). PDGF نیز از جمله فاکتورهای مهم پلاکتی است که در حضور سایتوکاین‌های مختلف از جمله ترمبوپوئیتین (TPO)، SCF و Flt3L، کارآمدترین فاکتورها در تکثیر سلول‌های CD34 و کلونی‌های گرانولوسیت-اریتروئید-مارکروفاژ-مگاکاریوسیت‌ها (CFU-GEMM) می‌باشد. علاوه بر این،

در این مطالعه کارایی سیستم کشت، تکثیر، افزایش زنده‌مانی و تمایز سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف با استفاده از UCB-PL مورد بررسی قرار گرفت و از UCB-PL در حضور یا فقدان سایتوکاین‌های مؤثر (Flt3L، SCF، TPO) در تکثیر سلول‌های بنیادی خون‌ساز استفاده شد. نتایج نشان داد که UCB-PL به‌تنهایی برای شروع تکثیر مؤثر نیست. اما در ترکیب سایتوکاین‌های Flt3L، SCF، TPO سبب پیش برد تکثیر سلول‌ها در محیط کشت می‌شود. همچنین دُز مؤثر UCB-PL بر تکثیر UCB-MNC در حضور سایتوکاین‌های ذکر شده، ۵٪ بود که سبب افزایش معنی‌داری در تکثیر سلولی حتی در مقایسه با کنترل مثبت گردید. گرچه مطالعه‌ای مبنی بر اثر UCB-PL در تکثیر UCB-MNC تاکنون گزارش نشده است؛ اما گزارشاتی مبنی بر بررسی اثر عصاره پلاکتی و دُز بهینه آن بر روی تکثیر سایر سلول‌ها وجود دارد. همچنین در مطالعات متعدد، دُز مؤثر عصاره پلاکتی مشتق از خون محیطی بر روی تکثیر سلول‌های کراتینوسایت ۲۸٪ (۱۲) بر روی سلول‌های فیبروبلاست ۱۹٪ (۱۵) بر روی سلول‌های اندوتلیال ۲۰٪ (۱۶، ۱۵) و بر روی سلول‌های بنیادی بافت چربی و فیبروبلاست انسانی ۵٪ گزارش شده است (۱۷).

در این مطالعه، با توجه به درصد افزایش سلول CD38+ CD34+ CD133، بیان ژن CD34 و افزایش کلونی‌های رده BFU-E، CFU-GM و CFU-GEMM مشخص گردیده است که دُزهای بالاتر از ۵٪ UCB-PL برای سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف کشنده می‌باشد و در غلظت ۵٪ UCB-PL این حدس را قوت می‌بخشد که عصاره پلاکتی بندناف در حفظ بنیادینگی سلول‌های خون‌ساز مؤثر است. در سایر مطالعات نشان داده شده یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی که رابطه‌ای خطی بین آن و درصد موفقیت پیوند وجود دارد، تعداد CFU-GM می‌باشد که می‌توان از آن به‌عنوان یک عامل قابل‌اعتماد برای پیش‌بینی نتیجه پیوند استفاده کرد. این آزمایشات اعلام کرده‌اند مقدار CFU-GM در مقایسه با سایر فاکتورها

بندناف از مهم‌ترین و کلیدی‌ترین عملکردهای فرایند پیوند می‌باشد، می‌توان این فرآورده را به‌عنوان محرکی برای تسریع تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای در محیط کشت استفاده کرد.

UCB-PL در حضور سایتوکاین‌های خون‌ساز Flt3L، SCF و TPO به تقویت تکثیر سلول‌های UCB-MNC کمک می‌کند و باعث حفظ بنیادینگی در این سلول‌ها می‌شود. همچنین القاکننده قدرت تمایز UCB-MNC به سمت رده‌های متفاوت خون‌ساز می‌شود. به نظر می‌رسد می‌توان UCB-PL در حضور سایتوکاین‌های خون‌ساز Flt3L، SCF و TPO را به‌عنوان محرک برای تسریع تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای در محیط کشت پیشنهاد داد.

#### تشکر و قدردانی

این مطالعه از پایان‌نامه ارشد گروه سلول‌های خون‌ساز و سرطان پژوهشگاه رویان استخراج شده است که با حمایت مالی پژوهشگاه رویان و ستاد توسعه علوم و فناوری سلولی‌های بنیادی و با تأیید کمیته اخلاق پزشکی به شماره IR.ACECR.ROYAN.REC.1394.33 به تاریخ ۱۳۹۴/۰۵/۰۷ به‌انجام رسیده است.

#### منابع

1. Haspel RL, Miller KB. Hematopoietic stem cells: source matters. *Current Stem Cell Research & Therapy* 2008;3:229-36
2. Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: Current Practice and Future Innovations. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2003;48:35-43
3. Nishino T, Osawa M, Iwama A. New approaches to expand hematopoietic stem and progenitor cells. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2012;12:743-56
4. Stanevsky A, Shimoni A, Yerushalmi R, Nagler A. Cord blood stem cells for hematopoietic transplantation. *Stem Cell Reviews* 2011;7:425-33

PDGF سایتوکاین مؤثر بر روی تکثیر و عملکرد سلول‌های بنیادی و اجداد اولیه آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی است و باعث افزایش قابل‌ملاحظه این سلول‌ها در محیط کشت آزمایشگاهی می‌شود (۲۵). همچنین این فاکتور رشد پلاکتی در شرایط آزمایشگاهی باعث تحریک سلول اریتروئیدی شده و در حضور سایتوکاین‌هایی چون اریتروپوئین (EPO) و فاکتور شبه‌انسولینی - (IGF-1) سبب افزایش رشد سلول اریتروئیدی می‌شود (۲۶).

#### نتیجه‌گیری

عصاره پلاکتی مشتق از خون بندناف می‌تواند نقشی در فرایند تکثیر، تمایز و درصد زنده‌مانی سلول‌های تک‌هسته‌ای داشته باشد. با توجه به نتایج مطالعات پیشین که بیشترین بررسی، مربوط به تأثیر عصاره پلاکتی بر روی سلول‌های مزانشیم و سلول‌های هماتوپوئیک جداشده از خون بندناف بوده است و گزارشی مبنی بر سلول‌های تک‌هسته‌ای تیمار شده با عصاره پلاکتی مشتق از خون بندناف دیده نشده و همچنین با توجه به اینکه افزایش تکثیر و درصد بقای سلول‌های تک‌هسته‌ای

8. Jaroscak J, Goltry K, Smith A, Waters-Pick B, Martin PL, Driscoll TA, et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase I trial using the AastromReplicell System. *Blood* 2003;101: 5061-7
9. Rick G, Smith BS, C.C.P, Craig J, Glassmann C.C.P, and Mark S. Campbell, B.A , C.C.P. Platelet-rich Plasma: Properties and Clinical Applications. *The Journal of Lancaster General Hospital* 2007; 2
10. Jonsdottir-Buch SM, Lieder R, Sigurjonsson OE. Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PIOS One* 2013;8:e68984
11. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews* 1999;79 :1283-316
12. Bolta PR, MaZ. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatoven APA* 2007;16:10
13. Kita K, Lee JO, Finnerty CC, Herndon DN. Cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells: current challenges in engraftment, infection, and ex vivo expansion. *Stem Cells International* 2011;2011:276193
14. Cutler C, Ballen KK. Improving outcomes in umbilical cord blood transplantation: state of the art. *Blood Reviews* 2012;26 :241-6
15. Ranzato E, Patrone M, Mazzucco L, Burlando B. Platelet lysate stimulates wound repair of HaCaT keratinocytes. *The British Journal of Dermatology* 2008;159:537-45
16. Ranzato E, Mazzucco L, Patrone M, Burlando B. Platelet lysate promotes in vitro wound scratch closure of human dermal fibroblasts: different roles of cell calcium, P38, ERK and PI3K/AKT. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009;13:2030-8
17. Ranzato E, Boccafoschi F, Mazzucco L, Patrone M, Burlando B. Role of ERK1/2 in platelet lysate-driven endothelial cell repair. *Journal of Cellular Biochemistry* 2010;110: 783-93
18. Wu JY, Liao C, Chen JS, Xu ZP, Li Y, Sun X, et al. [Analysis of post-thaw infused cell dose for predicting engraftment after unrelated cord blood transplantation]. *Journal of Experimental Hematology / Chinese Association of Pathophysiology* 2011;19:754-8
19. Kawai-Kowase K, Sato H, Oyama Y, Kanai H, Sato M, Doi H, et al. Basic fibroblast growth factor antagonizes transforming growth factor-beta1-induced smooth muscle gene expression through extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004;24 :1384-90
20. Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging* 2011;3:920-33
21. Zhou D, Deoliveira D, Kang Y, Choi SS, Li Z, Chao NJ, et al. Insulin-like growth factor 1 mitigates hematopoietic toxicity after lethal total body irradiation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2013;85:1141-8
22. Sattler FR. Growth hormone in the aging male. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013;27:541-55
23. Barzilai N, Bartke A. Biological approaches to mechanistically understand the healthy life span extension achieved by calorie restriction and modulation of hormones. *The journals of gerontology Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 2009;64:187-91
24. Faloon P, Arentson E, Kazarov A, Deng CX, Porcher C, Orkin S, et al. Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development* 2000;127:1931-41
25. Su RJ, Zhang XB, Li K, Yang M, Li CK, Fok TF, et al. Platelet-derived growth factor promotes ex vivo expansion of CD34+ cells from human cord blood and enhances long-term culture-initiating cells, non-obese diabetic/severe combined immunodeficient repopulating cells and formation of adherent cells. *British Journal of Haematology* 2002;117:735-46

26. Drygalski A, Xu G, Constantinescu D, Kashiwakura I, Farley T, Dobrila L, et al. The frequency and proliferative potential of megakaryocytic colony-forming cells (Meg-CFC) in cord blood, cytokine-mobilized peripheral blood and bone marrow, and their

correlation with total CFC numbers: implications for the quantitation of Meg-CFC to predict platelet engraftment following cord blood transplantation. Bone Marrow Transplantation 2000;25 :1029-34

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research  
Journal of Shahed  
University  
24th Year, No.127  
February- March 2017*

Received: 08/01/2017

Last revised: 12/02/2017

Accepted: 19/02/2017

## Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells by umbilical cord blood platelet lysate

Monireh Mohammad<sup>1,2</sup>, Marzieh Ebrahimi<sup>3\*</sup>, Fatemeh Daneshman<sup>4</sup>, Masoume Nouri<sup>2</sup>, Pardis Khosravani<sup>3</sup>

1. Payame Noor University, Yazd, Iran.
2. Department of Regenerative Biomedicine, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
3. Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
4. Payame Noor University, Tehran, Iran.

\* Corresponding author e-mail: mebrahimi@royaninstitute.org

### Abstract

**Background and Objective:** In spite of promising results in treatment of blood diseases by umbilical cord blood cell transplantation, low number of derived stem cells has been a matter of concern. Since platelets extracts has been introduced as a potent mesenchymal stem cell culture supplement, the purpose of current study was to investigate the probable effects of umbilical cord blood platelet lysate (UCB-PL) in proliferation, survival and differentiation of cord blood mononuclear cells.

**Materials and Methods:** The umbilical cord blood platelet lysate (UCB-PL) was added to cord blood mononuclear cells culture ( $1 \times 10^6$  /mL) in presence of FLT3L, TPO and SCF. The effective dose of UCB-PL, cell viability and differentiation of mononuclear cells were determined by trypan blue staining and colony assay method, respectively. The number of mononuclear cells was measured by flowcytometric analysis of CD133+ CD34+CD38- cells. Quantitative expression of CD 34 was performed by QRT-PCR method.

**Results:** Combination of 5% of UCB-PL with mentioned cytokines yielded a 12-fold cell proliferation in comparison with control group. A higher concentration of UCB-PL showed cytotoxic effects. CD 34 also increased significantly in group of 5% UCB-PL treated cells. In this particular group, a significant increase of colony forming units granulocytes-erythroid-macrophages-megakaryocyte (CFU-GMMM) and granulocyte-macrophage (CFU-GM) were detected.

**Conclusion:** Our results indicate that 5% UCB -PL can be used as a supplement in MNC cultured cells and in cord blood hematopoietic stem cells for cell therapy purposes.

**Key words:** Proliferation and differentiation, Platelet extracts derived from umbilical cord blood, Colony assay