فاطمه محمدعلی، دانشجوی دکترای تخصصی هماتولوژی-دانشگاه تربیت مدرس
دکتر سعید آبرون، دانشیار گروه هماتولوژی- دانشگاه تربیت مدرس
دکتر امیر آتشی، استادیار گروه هماتولوژی- دانشگاه تربیت مدرس

روش های تکثیر سلول های بنیادی خون بند ناف در شرایط آزمایشگاهی

Umbilical cord blood is an attractive source of hematopoietic stem and progenitor cells in the treatment of hematologic diseases, especially in allogeneic hematopoietic cell transplantation. However, due to the low abundance of these cells, the therapeutic use of umbilical cord blood has been limited mostly to the pediatric setting. The strategies for adult umbilical cord blood transplantation have been improved, with the recent development of various approaches for expanding stem cells in vitro and enhancing their long-term homing efficiency. In this article, we discuss a number of strategies for stimulating the proliferation of umbilical cord blood hematopoietic stem cells in vitro, including the utility of transcription factors and growth factors (cytokine cocktails), as well as co-culturing with stromal cells. Ultimately, we make the case that improvements in umbilical cord blood stem cell expansion will be critical for enhancing transplantation engraftment efficacy and providing potential cure for hematological diseases.

خون بند ناف منبعی جذاب از سلول های بنیادی و پروژنیتور خون ساز است که در درمان بیماری های خونی، به ویژه در پیوند سلول های خون ساز آلوژنیک. استفاده می شود. با این حال، با توجه به تعداد کم سلول های بنیادی آن، استفاده درمانی از خون بند ناف بیشتر به پیوند کودکان محدود شده است. استراتژی هایی برای افزایش پیوند پذیری خون بند ناف در بزرگسالان وجود دارد که در این مقاله به بحث درباره شماری از استراتژی های مورد استفاده برای تحریک تکثیر سلول های بنیادی خونساز خون بند ناف در شرایط آزمایشگاهی می پردازیم، از جمله استفاده از فاکتورهای رونویسی و عوامل رشد (مخلوط سیتوکاینی) و همچنین کشت همزمان با سلول های استرومایی. سرانجام، بهبود در تکنیک های تکثیر سلول های بنیادی خون بند ناف , در افزایش اثر بخشی پیوند در درمان بالقوه بسیاری از بیماری های خونی موثر است. خون بند ناف (UCB) به عنوان منبعی جذاب از سلول های بنیادی خون ساز، که می تواند جایگزین پیوند مغز استخوان در درمان بیماری های بدخیم و غیر بدخیم خونی باشد شناخته شده است (۱-۷).

در اوایل سال ۱۹۳۹، دانشمندان استفاده از UCB در درمان را پیش بینی کردند. با این حال، پیوند UCB تا سال ۱۹۸۸ موفق نبود (۲). این منبع سلول های بنیادی، که به طور معمول دور ریخته می شود. در سال های واپسین در سراسر جهان در پیوند به ویژه پیوند آلوژنیک، در درمان بیماران به کار می رود. تاکنون بیش از ۲۵،۰۰۰ پیوند خون بند ناف انجام شده است وحدود ۵۰۰،۰۰۰ واحد UCB برای استفاده همگانی اهدا شده است (۵،۸ -۱۰). رویهمرفته، پیوند UCB حداقل دو مزیت نسبت به پیوند مغز استخوان دارد (۵،۸-۱۲). اول این که خطر بسیار پایین تر بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD)، حاد و مزمن که می تواند به مرگ منجر شود با این منبع وجود دارد. دوم،اینکه نیاز کمتری برای تطبیق آنتی ژن های HLA (تنها ۲ درجه از ۶ درجه سازگاری HLA لکوس A یا B) دارد . با این حال، دو چالش عمده در پیوند UCB، به ویژه در بیماران بالغ وجود دارد (۱۲،۱۳). اول اینکه، UCB حاوی تعداد محدودی از سلول های بنیادی است. با توجه به توده بدن یک فرد بالغ، یک واحد تکی از UCB تعداد کافی از سلول های بنیادی برای پیوند در یک فرد بالغ را ندارد. حدود $۲-۳ \times ۱۰^{۸}$ سلول هسته دار کل می تواند از واحد UCB، جدا شود در حالی که تعداد کل توصیه شده از سلول های هسته دار برای پیوند در یک فرد بزرگسال حداقل ۲×۱۰^{۸} / کیلوگرم است. دوم اینکه، UCB پیوند پذیری و بازسازی ایمنی با تاخیری دارد (که با ریکاوری در شمارش نوتروفیل و پلاکت نشان داده می شود) و همچنین ریکاوری پس از پیوند با تاخیر، به دلیل عدم وجود مقادیر کافی از سلول های بنیادی برای درمان است.

به منظور بهبود در نتیجه پیوند UCB در بیماران بزرگسال، یک راه حل تکثیر سلول های بنیادی UCB در شرایط آزمایشگاهی است (۱۴-۱۸). این تکنیک ها نه تنها باعث افزایش تعداد سلول های بنیادی خون بند ناف می شوند بلکه باعث تسهیل لانه گزینی در پیوندهای UCB ناسازگار، با غلبه بر عدم تطابق

HLA می شوند (۱۹). در مطالعات با پیوند یک یا دو واحد UCB، داده های بالینی نشان داده اند که عدم تطابق بالاتر در آنتی ژن های HLA، میزان بالاتری از سلول های هسته دار نیاز دارد. به عنوان مثال، واحد UCB که ۲ از ۶ درجه ناسازگاری HLA دارد دوز سلول های هسته دار کل مورد نیاز برای رسیدن به پیوند پذیری مناسب بیش از $۵/ ۱۰^{۸}$× کیلوگرم است در حالی که در موارد ناسازگاری ۱ از ۶ HLA، $۲/۵×۱۰^{۸}$/کیلوگرم سلول‌های هسته‌دار کل مورد نیاز است(۲۰-۲۲). روش های مختلفی برای رسیدن به تعداد بالاتری از سلول های بنیادی و پروژنیتور خونساز کشف شده است و در مطالعات مختلف بالینی (۲۳-۳۰) بررسی شده است. مک نیس و همکارانش موفق به حفظ قابلیت پیوند پذیری طولانی مدت HSC در کشت و ریکاوری هماتوپوئیتیک با استفاده از انتقال HSC دست ورزی شده در شرایط آزمایشگاهی به مدل جنین گوسفند شدند (۲۹).فون دریگالسکی و همکارانش در مدل موشی پتانسیل پیوند پذیری طولانی مدت سلول های گسترش داده شده در شرایط آزمایشگاهی را نشان دادند (۳۰). دلانی و همکارانش نیز نتایج کارآزمایی های بالینی با سلول های بنیادی خون بند ناف را در پیوند گزارش کردند (۳۱) مطالعات مختلف نشان می دهند که واحدهای HSC تکثیر داده شده در آزمایشگاه باعث تسهیل پیوند واحدهای دستکاری نشده خون بند ناف نیز می شود، اما آنها الزاما منبع ریکاوری هماتوپوئیتیک طولانی مدت نیستند (۲۵,۲۹,۳۲,۳۳). از این رو، اگر چه هدف اصلی از تکثیر UCB افزایش تعداد HSC برای پیوند اولیه است، اما HSC را می توان در درمان حمایتی پس از پیوند اولیه نیز استفاده نمود، در نتیجه باعث کاهش خطر ابتلا به GVHD مرتبط با تزریق سلول های ناسازگار اهدا کننده می شود. علاوه بر این، ترکیبی از واحدهای HSC تکثیر داده شده و دستکاری نشده می تواند منجر به بهبود و افزایش لانه گزینی سلول های بنیادی شود. تعدادی از استراتژی های تکثیر آزمایشگاهی سلول های بنیادی خون بند ناف در زیر آورده شده است که به طور گسترده در آزمایش های بالینی در سراسر جهان مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۳-۲۸).

تکنیک های تکثیر سلول های بنیادی خون بند ناف

همان طور که گفته شد یکی از محدودیت های استفاده از خون بند ناف کم بودن سلول های بنیادی موجود در یک واحد خون بند ناف است. پیوند پذیری با تاخیر و نقص در پیوند پذیری خون بند ناف عمدتا به علت مقدار سلول کم در هر واحد خون بند ناف است. یکی از راه های غلبه بر این محدودیت, استفاده از ۲ واحد خون بند ناف به جای یک واحد(که تحت عنوان پیوند دو واحد شناخته می شود) است که شانس بیمار دریافت کننده پیوند خون بند ناف را افزایش می دهد (۳۴). راه دیگر پیوند همزمان یک واحد خون بند ناف به همراه سلولهای بنیادی خون محیطی انتخاب شده از نظر CD34 یا CD34 همراه با CD133 از گروه سوم اهداکنندگان است (۳۵).در مطالعه ماگرو و همکارانش سلولهای بنیادی خونساز خون محیطی با G-CSF موبیلیزه شده و از نظر سلول های T تخلیه شد و به همراه یک واحد خون بند ناف سازگار از نظر HLA تزریق شد. میانگین زمان پیوند پذیری نوتروفیلی و پلاکتی به ترتیب در ۱۰ و ۳۳ روز اتفاق افتاد که این روش تسریع پیوند پذیری با حداقل عوارض را امکان پذیر می سازد. ازآنجا که در بسیاری ازموارد واحدهای خون بند ناف با تعداد سلول کم و تفاوت ۰-۳ ناسازگاری گاهی تنها گزینه انتخابی بیماران بزرگسال است در این مواقع استفاده از سلول های بنیادی خونساز جدا شده از اهداکننده سوم امکان استفاده از واحدهای خون بند ناف با تعداد سلول های تک هسته ای کمتر از حد آستانه برای پیوند را مقدور می سازد (۳۶).

روش دیگر برای غلبه بر این محدودیت ها، تکنیک های تکثیر آزمایشگاهی سلول های بنیادی خونساز آلوژنیک یا اتولوگ قبل از تزریق به گیرنده است. بر این اساس اگر تعداد سلول های بنیادی خونساز جمع آوری شده در خون بند ناف کمتر از حد مورد نیاز باشد می توان سلول های بنیادی خونساز را تکثیر وگسترش داد.

به طور کلی روش های تکثیر آزمایشگاهی خون بند ناف به دو دسته: کشت در سوسپانسیون مایع و هم کشتی با سلول های استرومال تقسیم می شوند. در کشت های مایع، سلول های بنیادی خون بند ناف جدا شده در معرض ترکیبی از سایتوکاین ها، فاکتورهای رشد و فاکتورهای رونویسی در مدت زمان مشخص قرار می گیرند. قبل از کشت، پروژنیتورهای خونساز از واحدهای خون بند ناف جدامی شوند. سایتوکاین های SCF,GM-CSF,G-CSF, IL1,IL3,IL6,IL11, ترومبوپوئتین و اریتروپوئتین در درجات مختلف بیشترین سایتوکاین هایی هستند که از نظر اثرات تکثیری و تمایزی شان بر سلول های خونساز اولیه و تکثیر آنها استفاده شده اند (۳۷-۴۵). در مطالعه ای (۴۶) که به منظور ارزیابی محیط های مختلف برای دست یابی به بهترین شرایط کشت برای تکثیر سلول های خونساز خون بند ناف، انجام شد نتایج مقایسه بین محیط کشتRPMI 1640 همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) و یا ۱۰درصد پلاسمای خون بند ناف

(CBP) و همچنین محیط فاقد سرم در حضور ۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر از ترکیب سایتوکاینی IL-6، IL-3، TPO، SCF و SF)) Flt3-L به مدت دو هفته نشان دادند که محیط SF تاثیر بیشتری بر تکثیرسلول های خون ساز مورد استفاده در پیوند (تا بیش از ۵ برابر) نسبت به دو محیط های حاوی FCS و CBP دارد. مطالعات مختلف نیز نشان دادند که اضافه کردن MIP1- α به ترکیب سایتوکاینی فوق باعث افزایش تعداد سلول های بنیادی خونساز می شود (۴۷).

به دلیل محدودیت های استفاده از محیط های کشت حاوی سرم حیوانی در پیوندهای انسانی, مطالعات مختلفی به مقایسه محیط های فاقد سرم با محیط های کشت حاوی FCS یا پلاسمای خون بند ناف اتولوگ پرداخته اند و تاثیر بیشتر محیط های فاقد سرم را بر گسترش سلول های بنیادی خونساز خون بند ناف نشان داده اند. (۴۸-۵۱)

در هم کشتی استرومال، سلول های خون بند ناف با استفاده از سلول های استرومایی به عنوان سلول های حمایت کننده تکثیر داده می شوند. علاوه بر تماس مستقیم سلول های بنیادی خونساز با سلول های استرمایی, سلول های استرومال، تعدادی از سیتوکین ها و مولکول های چسبندگی شناخته شده را در سطوح بالا ترشح می کنند، از جمله استئوپونتین، آنژیوپوئیتین، ترومبوپیتین، IL-۶ و SCF، GM-CSF, G-CSF, SDF 1, Jagged 1 که می تواند به تکثیر و تمایز HSC کمک کند. (۵۲-۵۸) دکستر و همکارانش نشان دادند که سیستم هم کشتی با سلول های استرومایی قادر به حفظ خودنوسازی سلول های بنیادی خونساز می شود (۵۹) محققان نشان دادند که تخلیه مغز استخوان از این سلولهای استرومایی به طور قابل توجهی باعث کاهش تعداد HSC و کاهش لانه گزینی HSC در مغز استخوان موش تا ۹۰٪ می شود (۶۰)

در این زمینه ژانگ و همکارانش (۶۱) نشان دادند که سلول های استئوبلاستی دوکی شکل N - کادهرین مثبت و (SNO) -CD45از طریق تماس فیزیکی مسئول حفظ طولانی مدت سلولهای بنیادی خونساز میشوند . هم کشتی HSC های خون بند ناف با سلول های بنیادی مزانشیمی موشی همراه با سایتوکاین های SCF،TPOو FLT3/FLK2در محیط کشت فاقد سرم. باعث تکثیر ۱۰ تا ۲۰ برابری سلول های بنیادی خونساز در طی یک یا دو هفته شد (۶۲و۶۳).همچنین در مطالعه ای دیگر سلول های بنیادی خونساز کشت داده شده بر بستر سلول های بنیادی مزانشیمی به عنوان لایه فیدر منجر به تکثیر بالاتر و سرعت آپوپتوز کمتر آن می شود (۶۴).

نتیجه گیری

خون بند ناف منبعی فراوان و در دسترس از سلول های بنیادی با عدم بلوغ ایمونولوژیکی و پلاستیسیتی بالاست که آن را نسبت به سایر منابع سلول های بنیادی ارجح ساخته است و یکی از بهترین منابع سلول های بنیادی در زمینه تحقیقات و کاربردهای بالینی است. اما مشکل عمده در استفاده از خون بند ناف کم بودن سلولهای بنیادی خونساز موجود در نمونه خون بند ناف است که تا کنون مطالعات متعددی به بررسی تکنیک های مختلفی همچون تزریق همزمان دو واحد خون بند ناف و راهبردهای تکثیر سلولی برای افزایش تعداد این سلول ها پرداخته اند. به نظر می رسد که ترکیبی از واحدهای تکثیر داده شده در شرایط آزمایشگاهی (به منظور بازیابی هماتوپوئز اولیه) همراه با واحد دستکاری نشده (به منظور هماتوپوئز طولانی مدت) می تواند راهبرد مناسبی در افزایش پیوند پذیری موثر خون بند ناف باشد.

منابع:

1. Hough R, Rocha V (2010) Transplant outcomes in acute leukemia. II. Semin Hematol 47: 51-58.
2. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, et al. (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 321: 1174-1178.
3. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E (1995) Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. Lancet 346: 214-219.
4. Locatelli F, Rocha V, Reed W, Bernaudin F, Ertem M, et al. (2003) Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. Blood 101: 2137-2143.
5. Liu Y, Hangoc G, Campbell TB, Goodman M, Tao W, et al. (2008) Identification of parameters required for efficient lentiviral vector transduction and engraftment of human cord blood CD34(+) NOD/SCID-repopulating cells. Exp Hematol 36: 947-956.
6. MacMillan ML, Walters MC, Gluckman E (2010) Transplant outcomes in bone marrow failure syndromes and hemoglobinopathies. Semin Hematol 47: 37-45.
7. Kurtzberg J, Prasad VK, Carter SL, Wagner JE, Baxter-Lowe LA, et al. (2008) Results of the Cord Blood Transplantation Study (COBLT): clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. Blood 112: 4318-4327.
8. Rocha V, Broxmeyer HE (2010) New approaches for improving engraftment after cord blood transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 16: S126-132.
9. Rocha V, Gluckman E; Eurocord-Netcord registry and European Blood and Marrow Transplant group (2009) Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantationrelated factors. Br J Haematol 147: 262-274.