1- مقدمه

امروزه پیوند مغز استخوان به‌صورت گسترده‌اي براي درمان شمار زيادي از بيماران در سرتاسر جهان استفاده مي‌شود. سلول‌هاي بنيادي خون‌ساز (Hematopoietic stem cell: HSCs) بند ناف يكي از بهترين منابع HSCs هستند كه به دليل مزاياي زياد از جمله سهولت تهيه و دسترسي، فقدان خطر براي مادران اهداكننده، حساسيت بالا براي القاي تحمل، پايين بودن آلو آنتي‌ژن‌ها (Alloantigen) و آنتي‌ژن‌هاي HLA (Human Leukocyte Antigen) سطحي و در نتيجه عدم نياز به سازگاري بالايي بين دهنده و گيرنده و ... توجه روز افزوني را به خود جلب نموده‌اند [1]. اما متأسفانه تعداد محدود سلول‌هاي بنيادي در نمونه‌هاي خون بند ناف استفاده از اين منبع سلولي ارزشمند را در درمان‌هاي پيوند مغز استخوان بزرگسالان محدود مي‌سازد. يكي از راه‌كارهاي غلبه بر اين مشكل ازدياد HSCs بند ناف در محيط آزمايشگاه (Ex vivo Expansion of HSCs) است. براي القاي مطلوب فعاليت خود تجديد شوندگي سلول‌هاي بنيادي كه در نهايت منجر به ازدياد آن‌ها مي‌شود، به شناخت درستي از عوامل كنترل كننده فعاليت خود تكثيري اين سلول‌ها نياز است.

تصميم سلول براي رفتن به سمت تمايز يا خود تجديد شوندگي به مقدار زيادي بستگي به علامت‌هايي دارد كه سلول از محيط خارج و يا داخل دريافت مي‌دارد. اين علامت‌ها گاهي اوقات سلول را وادار به تكثير و رشد مي‌نمايد [مانند فاكتورهاي رشد از جمله SCF (Stem Cell Factor) يا فاكتورهاي رونويسي از جمله HOXB4 (Homeobox B4)] و در پاره‌اي از موارد ديگر نقش‌هاي مهاري خواهند داشت [مانند TNFα (Tumor Necrosis Factor-α) يا TGF-b (Transforming growth factor-b)]. از مهم‌ترين علامت‌هاي خارجي كه فعاليت خود تكثيري سلول‌هاي بنيادي و تمايز آن‌ها را كنترل مي‌نمايد، سايتوكين‌هاست كه گاهي عامل محرك رشد و گاهي مهار كننده رشد است [2]. TGF-b1، به‌عنوان يك عامل كليدي در تعيين نوع رفتار HSCs از جمله اين‌كه به سمت تمايز بروند يا فعاليت خود تكثيري انجام دهند، عمل مي‌كند و از طريق گيرنده‌هاي سطح سلولي (Transforming growth factor-b Recepor1) TGFbR1 و TGFbR2 علامت‌دهي مي‌كند [3]. تحقيقات قبلي در محيط‌هاي آزمايشگاهي (In vitro) و درون‌بدني (In vivo) نشانگر نقش مهم اين سايتوكين در تمامي مراحل خون‌سازي بوده است [4]. اين سايتوكين توسط سلول‌هاي خونساز به دو صورت اتوكرين (Autocrine) و پاراكرين (Paracrine) ترشح مي‌شود [5] و علاوه بر آن توسط سلول‌هاي استرومايي نيز ساخته مي‌شود [6-8]. مطالعات انجام شده آثار مهاري مستقيم TGF-b را بر رشد سلول‌هاي منفي از نظر شاخص‌هاي تمايزي با بيان CD34 بالا (رده $CD34_{high}$)، تخليص شده و HSC هاي $CD34^{+}CD38^{-}$ نشان داده‌اند. افزودن TGF-b به محيط كشت HSCs همچنين به مقدار 80 تا 90 درصد تشكيل كلوني‌هاي خون‌ساز را در حضور سايتوكين‌هاي عمل كننده اوليه (Early Acting Cytokines) مانند SCF، Flt-3L (FMS-like tyrosine kinase 3 Ligand) و Tpo (Thrombopoietin) كاهش داده است [9]. از سوي ديگر در يكي از بررسي‌ها، HSC هاي HO/Ro_{low} (Hoechst 33342_{Low} and rhodamine-123_{Low}) كه در ابتدا براي تكثير سلولي تحريك شده و سپس در مجاورت TGF-b قرار گرفتند، به‌طور قابل ملاحظه‌اي كاهش در توانايي پيوند را نشان دادند [10]. اين سايتوكين از طرفي موجب طولاني شدن مرحله G1 چرخه سلولي مي‌شود و از اين طريق احتمالاً سلول‌ها را به سمت تمايز مي‌برد [5، 11-13] و از طرف ديگر از طريق افزايش بيان مهار كننده‌هاي cdk (Cyclin Dependent Kinase)، مانند p15، p27 و p21 موجب مهار چرخه سلولي در مرحله S/G2/M شده و در نهايت مانع از فعاليت خود تكثيري سلول‌هاي بنيادي مي‌شود [6، 12، 14-17]. موضوع ديگر اين‌كه يكي از مكانيسم‌هاي مهار كننده تكثير سلولي اين سايتوكين مربوط به تنظيم منفي است كه از طريق اين سايتوكين روي بيان گيرنده فاكتورهاي رشد اعمال مي‌شود [4] و از اين راه علامت‌دهي برخي از اين سايتوكين‌ها

مانند Tpo [14] و همچنين SCF [18] را كه براي رشد و بقاي HSCs ضروري است را مهار نمـوده و در نتيجـه بقـا و تكثيـر HSCs در محيط كشت را كاهش مي‌دهد. مطالعات ديگـر هـم تأثير منفي اين سايتوكين را بر بقاي HSCs نشان داده‌انـد [19، 20]. بررسي‌هـاي اوليـه روي HSCs موشـي و انـساني نـشان دهنده نقش TGF-b در القاي حالت خفتگي يا HSCs G0 بود [4]. اما مطالعات بيشتر در محيط آزمايشگاه با نـشان دادن ايـن مطلب كه TGF-b موجـب مهـار پيـشرفت سـلولي در مرحلـه G1/S مي‌شود كـه ايـن مهارسـازي را معـادل حالـت خفتگـي سلول‌ها در مرحله G0 ندانستند. در مرحله G0 در سلول سـنتز mRNA يا پروتئين يا وجـود نـدارد يـا خيلـي كـم اسـت؛ در حالي‌كه طي انتقال از مرحله G1 به S در سلول، سـاخته شـدن اين عناصر شروع مي‌شود. براساس نتايج به‌دست آمده با ساخته شدن اين مولكول‌هاي جديد HSCs از حالـت بنيـادي خـارج مي‌شدند [13، 19].

بعـدها، بررسـي‌هـايي روي مـوش‌هـاي فاقـد TGFbRI (TGFbRI-null mice) انجام شد كه نشان دهنده خون‌سـازي و تمايز طبيعي HSCs در اين موش‌ها بود و بـي‌اهميـت بـودن نقش اين سايتوكين را در ايجـاد حالـت خفتگـي بيـشتر تأييـد مي‌كرد [21، 22] اما با گسترده‌تر شدن مطالعات روي نقش‌هاي اين سايتوكين كه گاهي متضاد همـديگر هـستند، ايـن موضـوع مشخص شده است كه رفتار سلول در داخل و خـارج بـدن در مواجه با اين سايتوكين به‌طور كلي متفاوت است؛ به‌عنوان مثـال در شرايط درون بدني موجب ايجاد حالـت خفتگـي مـي‌شـود [23] در حالي‌كه در محيط كشت سلولي نه تنها موجـب حفـظ سلول‌ها در حالت خفتگي نمي‌شود بلكه باعث القاي تمـايز در HSCs مي‌شود [13، 19]. از آن‌جا كه هـر دو فـرم mRNA و پروتئين TGF-b در كشت‌هاي طولاني مدت سـلول‌هـاي مغـز استخوان يافت شده‌اند [24] و بـا توجـه بـه ايـن موضـوع كـه TGF-b اتوكرين با حداقل دو مكانيسم، 1- مهار چرخه سلولي پيش‌سازهاي خون‌ساز [19] و 2- ايجاد يك حالت عدم پاسـخ نسبت به فاكتورهاي رشد در HSCs، موجب مهار تقـسيم‌هـاي خود تجديد شونده اين سلول‌ها مي‌شود [4] و از سـوي ديگـر؛ در بخش‌هاي قبلي اشاره شد كه با طـولاني شـدن مرحلـه G1 توسط اين سايتوكين موجب تمـايز HSCs مـي‌شـود و هـر دو مورد فوق به شدت بـراي فعاليـت خـود تكثيـري سـلول‌هـاي بنيادي و ازدياد آن‌هـا مـضر و دو عامـل اصـلي عـدم موفقيـت ازدياد HSCs در محيط آزمايشگاه است، در نتيجه ايـن سـؤال مطرح شد كه مهار اين مسير با روش‌هايي كه بتوانـد در سـطح اوليه‌اي (mRNA) اين مسير را مهار كنـد روي ميـزان فعاليـت خود تجديد شوندگي سلول‌هـاي بنيـادي چـه تـأثيري خواهـد داشت و به چه ميزاني مي‌تواند به ممانعت از تمايز HSCs، كـه براي ازدياد آن‌ها مناسب نيـست، كمـك نمايـد. براسـاس نتـايج بررسي حاضر مهار علامت‌دهي از طريق اين مـسير از يـك سـو موجب افزايش سـلول‌هـاي بنيـادي +CD34 در محـيط كـشت مي‌شود و از سوي ديگر در بررسي‌هاي عملكردي اين سـلول‌هـا به‌طور قابل توجهي HSC هاي تيمـار شـده ميـزان كلـوني‌زايـي بيشتري داشتند. در نهايت بررسي سلول‌هاي خـون‌سـاز اوليـه بـا استفاده از آزمون LT-CIC (Long-term Culture Initiating Cell) به‌طور معني‌داري افزايش سلول‌هاي اوليـه را نـسبت بـه كنترل نشان داد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- جمع‌آوري نمونه و جداسازي HSCs

واحدهاي خون بند ناف براساس روش‌هاي مصوب كميتـه اخلاق پزشكي در دانشگاه تربيت مدرس جمع‌آوري شـدند. در حين نمونه‌گيري براساس روش‌هاي مصوب از هر يك از افـراد جامعه نمونه‌گيـري، رضـايت‌نامـه گرفتـه شـد. در مرحلـه اول جداسـازي، خـون بنـد نـاف بـه‌دسـت آمـده در فـالكون‌هـاي 50 ميلي‌ليتري با هيدروكـسي اتيـل اسـتارچ (Hydroxyethyl Starch) مخلوط و به‌مدت 2 ساعت در دماي اتـاق نگهـداري شد كه اين موضـوع بـه سـهولت جداسـازي سـلول‌هـاي تـك هسته‌اي خون بند ناف كمك مي‌نمايد. پس از اتمام مدت زمـان

انکوباسیون دو بخش تشکیل می‌شود؛ در پایین توده نسبتاً متراکم گلبول‌هاي قرمز و در بالا پلاسما همراه با سلول‌هاي تك هسته‌اي خون بند ناف و مقدار کمي گلبول قرمز قرار مي‌گيرند. در اين مرحله براي جداسازي لايه سلول‌هاي تك هسته‌اي از ساير عناصر خون بند ناف، محيط رويي سانتريفوژ شد و رسوب حاصل از آن که حاوي سلول‌هاي تك هسته‌اي همراه با قدري گلبول قرمز از مرحله قبل است به روي فايکول منتقل خواهد شد و دوباره سانتريفوژ مي‌شوند. پس از سانتريفوژ لايه سلول‌هاي تك هسته در قسمت بالايي فايکول قرار مي‌گيرد، اين لايه تك هسته‌اي جدا شده براي جداسازي HSC هاي $CD34^+$ با آنتي‌بادي‌هاي نشان‌دار شده با مغناطيس(Magnet) تهيه شده از شرکت Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Germany) مجاور شدند و سپس با استفاده از ستون‌هاي جداسازي LS (LS Separation Columns) (Miltenyi Biotech) جدا شدند.

سلول‌هاي جدا شده در محيط IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) حاوي 10 درصد FBS (Fetal Bovine Serum) و ترکيب سايتوکيني شامل 100 نانوگرم در هر ميلي‌ليتر SCF، 100 نانوگرم در هر ميلي‌ليتر Flt-3L، 30 نانوگرم در هر ميلي‌ليتر Tpo، 30 نانوگرم در هر ميلي‌ليتر IL-6 و 30 نانوگرم در هر ميلي‌ليتر IL-3 کشت داده شدند.

2-2- ترانسفکشن SiRNA عليه TGFbR2

SiRNA عليه TGFbR2 (Stealth™ Select RNAi) و کنترل منفي ترانسفکشن SiRNA به‌عنوان Stealth™ RNAi Negative Control و همچنين BLOCK-iT™ Alexa Fluor Red به‌عنوان اليگونوکلئوتيد کنترل ميزان مؤثر بودن ترانسفکشن و همچنين معرف ترانسفکشن با نام Lipofectamine™ RNAiMAX از شرکت Invitrogen تهيه شد. به‌طور خلاصه روز قبل ترانسفکشن حدود 50000 تا 70000 سلول در 500 ميکروليتر محيط فاقد آنتي‌بيوتيك و سرم به هر خانه يك پليت 24 خانه‌اي در سه گروه منتقل شدند. در گروه اول Stealth™ RNAi بر عليه TGFbR2 و در گروه دوم Stealth™ RNAi Negative Control به‌عنوان کنترل منفي اضافه شدند و بالاخره در گروه سوم BLOCK-iT™ Alexa Fluor Red به‌عنوان کنترل ميزان ترانسفکشن SiRNA مورد استفاده قرار گرفت. براي ترانسفکشن هر خانه حدود 6 پيکومول از SiRNA دو رشته‌اي (SiRNA Duplex) در 50 ميکروليتر Opti-MEM فاقد آنتي‌بيوتيك و سرم در يك تيوب و حدود 1 ميکروليتر از ليپوفکتامين (Lipofectamine) در 50 ميکروليتر Opti-MEM در تيوب ديگر افزوده شدند. پس از افزودن محتويات دو تيوب به هم و با انکوباسيون آن‌ها به‌مدت 20 دقيقه، کمپلکس‌هاي ليپوفکتامين تشکيل و آماده افزودن به سلول‌ها شدند. سپس کمپلکس‌هاي حاوي SiRNA و ليپوفکتامين به خانه‌هاي مربوط که از قبل تهيه شده بود، اضافه شد. با افزودن اين کمپلکس‌ها حجمي حدود 600 ميکروليتر به‌دست آمد که غلظت نهايي 10 نانومول از SiRNA داشت. بعد از افزودن کمپلکس ليپوفکتامين و SiRNA به آرامي پليت به سمت جلو و عقب تکان داده شد تا به‌خوبي کمپلکس‌ها با محيط کشت مخلوط شوند. سپس پليت‌ها در انکوباتور 37 درجه سانتي‌گراد و CO_2 5 درصد قرار گرفت. مي‌توان بعد از 4 الي 6 ساعت محيط رويي سلول‌ها را با محيط تازه ازدياد HSCs تعويض نمود.

2-3- اندازه‌گيري کمي ميزان سرکوب بيان ژن TGFbR2 با استفاده از Real-Time PCR کمي (Quantitative Real-Time PCR: QRT-PCR)

به فواصل 48 و 72 ساعت پس از ترانسفکشن، از سلول‌هاي ترانسفکت شده با استفاده از محلول RNA x-plus براساس برنامه شرکت سازنده (شرکت سيناژن ايران) RNA سلولي تهيه شد. قبل از تهيه cDNA، DNaseI (Fermentas) به نمونه RNA افزوده شد. سنتز cDNA با استفاده از راندوم

هگزامـــر (Random Hexamer) و آنـــزیم MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus- Reverse Transcriptase) تهیه شده از شرکت Fermentas براساس برنامه ارایه شـده انجـام شد. سپس با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Real-Time PCR مربوط به شرکت Corrbet، نمونه‌ها ارزیابي شـد. بـراي انجـام واکـنش 12/5 میکرولیتـر از مخلـوط اصـلي (Master Mix) شـرکت Roche بـا 1 میکرولیتـر از آغـازگر (Primer) (10 پیکومول) و 1 میکرولیتر از cDNA (حـدود 100 نـانوگرم) بـا هـم مخلـوط شـد و بـا اسـتفاده از آب مقطـر حجـم بـه 25 میکرولیتر رسید. بـراي آغازگرهـاي بـه‌کـار رفتـه پارمترهـاي استفاده شده براي طراحي بهترین آغازگر با اسـتفاده از نـرم‌افـزار Oligo 6 لحاظ شد. توالي آغازگرهاي به‌کار رفته از قرار زیر بود:

(Forward) جلويي TGFbR2:
5´-TTTTCCACCTGTGACAACCA-3´
(Reverse) برگشتي TGFbR2:
5´-GCTGATGCCTGTCACTTGAA-3´

براي انجام واکنش PCR از برنامه زیر استفاده شد:

واسرشـتگي اولیـه (Initial Denaturation) 5 دقیقـه در 95 درجه سانتي‌گراد، واسرشتگي ثانویه 15 ثانیـه در 95 درجـه سـانتي‌گـراد، 15 ثانیـه اتـصال (Annealing) در 56 درجـه سـانتي‌گـراد و 25 ثانیـه بـسط (Extension) در 72 درجـه سانتي‌گراد براي 45 چرخه و در نهایت ذوب (Melting). همه واکنش‌ها به‌صورت دوتایي (Duplicate) انجام شد و میـانگین آن‌ها براي اندازه‌گیري به‌کار رفـت. بـراي انـدازه‌گیـري مقـدار نـسبي (Relative Quantitation) از روش Pfaffl اسـتفاده شد. به‌طور خلاصه مقادیر Ct (Threshold Cycle) مربوط به ژن هدف با ژن کنترل درون‌زاد کـه در اینجـا بتـا- اکتـین بـود، قانونمند شد و با استفاده از فرمول Pfaffl و در مقایـسه بـا ژن دست نخورده، مقادیر کاهش بیان ژن ارزیابي شد.

2-4- فلوسایتومتري

قبـل و بعـد از ازدیـاد، بـا اسـتفاده از فلوسـایتومتري HSCs (PARTEC Germany) از نظـر نـشانگرهاي سـطحي ارزیابي شدند. حدود 6×10^4 از سلول‌هاي کشت داده شـده ابتـدا با محلول PBS حاوي FBS 2 درصد شستشو داده شد و سـپس با استفاده از آنتي‌بادي‌هاي کونژوگه شـده بـا فلـوروکروم FITC (Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- conjugated Antibodies) رنگ‌آمیزي ضد CD34 انجام شد. از آنتي‌بادي FITC-mouse IgG1 به‌عنوان یك ایزوتیپ کنتـرل بـراي تـضمین اختـصاصي بودن واکنش استفاده شد. براي تعیین ناحیه اي که سلول‌هـا در آن تجزیـه تحلیـل مـي شـوند (Gate)، از بخـشي کـه داراي پراکنش نوري پـایین (Low Side Scatter) بـود و HSCs در آن ناحیه قرار مي‌گیرند بهـره‌گیـري شـد. در نهایـت اطلاعـات به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار FloMax بررسي شد.

2-5- آزمون کلوني‌زایي

در این آزمون سلول‌هاي خون‌ساز ازدیاد شده از گروه کنتـرل و گروه آزمون در سه رقت 500، 1000 و 1500 سلول در حدود 100 میکرولیتـر محـیط کـشت بـه 1 میلـي‌لیتـر محـیط (Stemcell Technologies) Methocult™ GF+ H4435 اضافه و در داخـل یـك لولـه فـالکون 15 بـه‌خـوبي ورتکـس (Vortex) شد. سپس اجازه داده شد تا حباب‌هـاي موجـود در محیط کشت برطرف شده و بعد از آن محیط حاوي سلول‌هـاي موجود در هر لوله به‌صورت یکنواخت بـه یکـي از خانـه‌هـاي پلیت 6 خانه‌اي منتقل شد. به‌مدت 2 هفته پلیت‌ها در دماي 37 درجه سانتي‌گراد و فشار 5 درصد CO_2 انکوبـه شـد در پایـان این مدت تعداد کلوني‌هـاي تـشکیل شـده بـه ازاي هـر 1000 سلول شمارش شد.

2-6- آزمون LT-CIC

تعداد سلول‌هاي داراي توانایي ایجاد کلوني پـس از کـشت طـولاني مـدت یـا LT-CIC بـا اسـتفاده از کـشت همزمـان سلول‌هاي خون‌ساز روي فیبروبلاست‌هاي موشي از نـوع M2-10B4 به‌دست آمد. در ابتـدا چنـد روز قبـل از شـروع آزمـون

سلول‌هاي M2-10B4 به تعداد 3×10^4 سلول در هر سانتي‌متر مربع در پليت‌هاي 96 خانه‌اي كه از قبل با ژلاتين پوشانده (Coat) شده بود كشت داده شدند. پس از همپوشاني به‌مدت 3 ساعت با مقدار 20 ميكروگرم در هر ميلي‌ليتر از مايتومايسين C (Mitomycin) مجاور شدند. براي تعيين تعداد سلول‌هاي LT-CIC از شرايط رقت محدود كننده (Limiting Dilution) استفاده شد. بعد از اين‌كه سلول‌هاي خون‌ساز روي سلول‌هاي M2-10B4 غيرفعال شده منتقل شدند، به‌مدت 5 هفته نگهداري شد. در اين مدت از محيط αMEM داراي 10^{-5} هيدروكورتيزون (Hydrocortisone) (Stemcell Technologies) و حدود 20 درصد سرم به‌عنوان محيط LT-CIC استفاده شد. هر هفته نيمي از محيط تعويض شد. به‌منظور جلوگيري از خشك شدن محيط كشت برخي از خانه‌ها با آب مقطر پر شد. پليت‌هاي مربوط به كشت طولاني مدت در انكوباتور 37 درجه سانتي‌گراد با فشار 5 درصد CO_2 نگهداري شد. براي اين آزمون از 3 رقت 1000، 2000 و 3000 عدد سلول كشت داده شده استفاده شد. براي هر رقت حدود 30 بار تكرار در نظر گرفته شد. طي 3 تا 4 هفته همه سلول‌هاي غير اوليه كه از نوع پيش‌سازهاي متعهد و نيمه متعهد بودند از دست رفتند و سلول‌هايي كه بر جا ماندند از نوع سلول‌هاي اوليه بودند كه توانايي بنيادي داشتند. بعد از اتمام مدت زمان 5 هفته ابتدا سلول‌هاي غيرچسبنده برداشت شدند و سپس سلول‌هاي چسبيده به رده سلولي فيبروبلاست‌هاي موشي به همراه خود رده سلولي M2-10B4 برداشت شده و به‌عنوان خروجي اين آزمون با استفاده از آزمون كلوني‌زايي ارزيابي شدند.

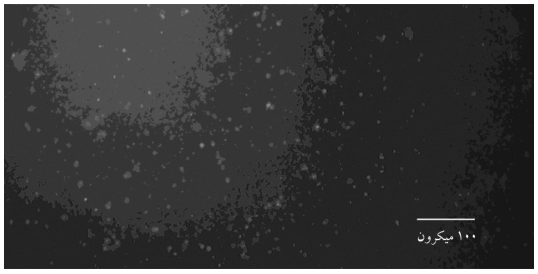
2-7- آزمون كلوني‌زايي و برداشت محصول آزمون LTC-IC و انتقال آن به محيط كلوني‌زايي

بعد از اتمام 5 هفته محتويات هر خانه آزمون قبل در داخل يك لوله آزمايش جمع‌آوري و سپس به پليت‌هاي جداگانه كلوني‌زايي منتقل شدند. سلول‌ها در داخل لوله‌ها سانتريفوژ شده و رسوب كف هر لوله در 100 ميكروليتر از محيط αMEM دوباره به حالت سوسپانسيون در آمد و به هر كدام 1 ميلي‌ليتر محيط Methocult™ GF+ H4435 افزوده شد و به‌خوبي ورتكس شد. سپس به‌مدت زمان كافي ماند تا حباب‌هاي ايجاد شده ناپديد شود. محتويات لوله‌ها به خانه‌هاي جداگانه‌اي از پليت‌هاي 6 خانه اضافه شدند. در يكي از خانه‌ها براي ايجاد رطوبت بيش از 95 درصد آب مقطر ريخته شد. در انكوباتور 37 درجه و 5 درصد CO_2 انكوباسيون به‌مدت 15 تا 18 روز انجام شد. سپس خانه‌ها ارزيابي و خانه‌هاي مثبت به‌عنوان يك امتياز مثبت و خانه‌هاي منفي از نظر حضور كلوني بدون امتياز در نظر گرفته شدند. تعداد LT-CIC در جمعيت بررسي شده با استفاده از روش آماري Maximum Likelihood (Fazekas de St. Groth, 1982) و نرم‌افزار L-Calc™ ارزيابي شد.

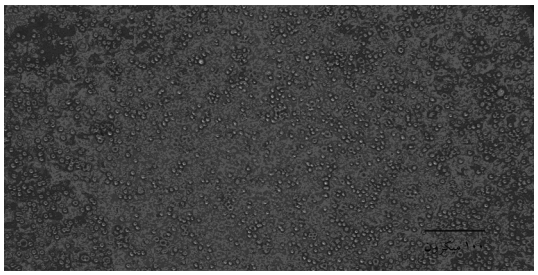
3-نتايج

اين سلول‌ها پس از جداسازي HSCهاي +CD34، در محيط ازديياد HSCs حاوي IMDM، 10 FBS درصد و سايتوكين‌هاي عمل كننده اوليه كه قبلاً به آن‌ها اشاره شده است، قرار داده شد. مدت زمان ازدياد 8 روز بود. براي بررسي اثر مهار سركوب بيان ژن TGFbR2 روي ميزان ازدياد HSCs و LT-CIC و همچنين ارزيابي ميزان ترانسفكشن، HSCs جدا شده به سه گروه تقسيم شد و ترانسفكشن به‌صورت جداگانه روي آن‌ها انجام شد. گروه اول شامل سلول‌هايي بود كه با Stealth™ RNAi عليه TGFbR2 ترانسفكت شدند، گروه دوم گروه كنترل بود كه با Stealth™ RNAi Negative Control مواجه شدند و بالاخره گروه سوم كه با BLOCK-iT™ Alexa Fluor Red مجاور شدند. گروه سوم به‌عنوان كنترل ميزان ترانسفكشن در نظر گرفته شد و پس از 6 تا 8 ساعت از زمان ترانسفكشن، ميزان ترانسفكشن در سلول‌هاي اين گروه با استفاده از ميكروسكوپ فلورسانس بررسي شد. ميزان ترانسفكشن پس از بررسي نتايج در HSC هاي +CD34 به‌طور ميانگين حدود 40 تا 50 درصد تخمين زده شد

(شکل‌هاي 1 و 2). ترانسفکـشن روز سـوم پـس از جداسـازي HSCs انجام شد که علت ايـن موضـوع مقاومـت سـلول‌هـاي خفته در برابر ترانسفکـشن اسـت. بنـابراين بـا القـاي رشـد در HSCs با استفاده از محيط کشت ازديـاد HSCs و در حـضور سايتوکين‌هاي اوليه، سلول‌هاي خون‌سـاز اوليـه بيـشتر مـستعد ترانسفکشن شد. ترانسفکشن براساس برنامه آمده در بخش‌هاي قبلي انجام شد.



شکل 1 مشاهده HSCs ترانسفکت شده بـا BLOCK-iT™ Alexa Fluor Red با استفاده از نور ماوراي بنفش ميکروسکوپ فلورسانس



شکل 2 سلول‌هاي ترانسفکت شده با BLOCK-iT™ Alexa Fluor Red با نـور مربـي ميکروسـکوپ فلورسـانس در همـان زمينـه قبلـي شـکل 1 کـه نشان‌دهنده موفقيت‌آميز بودن ترانسفکشن است.

3-1- کشت فزون‌سازي HSC (Expansion) هاي CD34+

ازديـاد HSCs در دو گـروه کنتـرل (ترانـسفکت شـده بـا Stealth™ RNAi Negative Control) و سلول‌هاي آزمـون (ترانسفکت شده با Stealth™ RNAi عليه TGFbR2) انجام شد که هر کدام از اين گروه‌ها به‌صورت سه‌تايي تکرار شـدند. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، ترانسفکشن روز سوم انجام شد و بعد از 48 و 72 ساعت از زمان ترانسفکشن از نظر ميـزان بيـان نـسخه RNA (Transcript) ژن TGFbR2 بـا اسـتفاده از QRT-PCR ارزيابي شدند و پس از گذشت 8 روز سلول‌هـاي کـشت داده شـده از نظـر ايمونوفنـوتيپي بـا اسـتفاده از فلوسايتومتري و همچنين از نظر عملکردي با استفاده از آزمـون کلوني‌زايي و LT-CIC بررسي شدند.

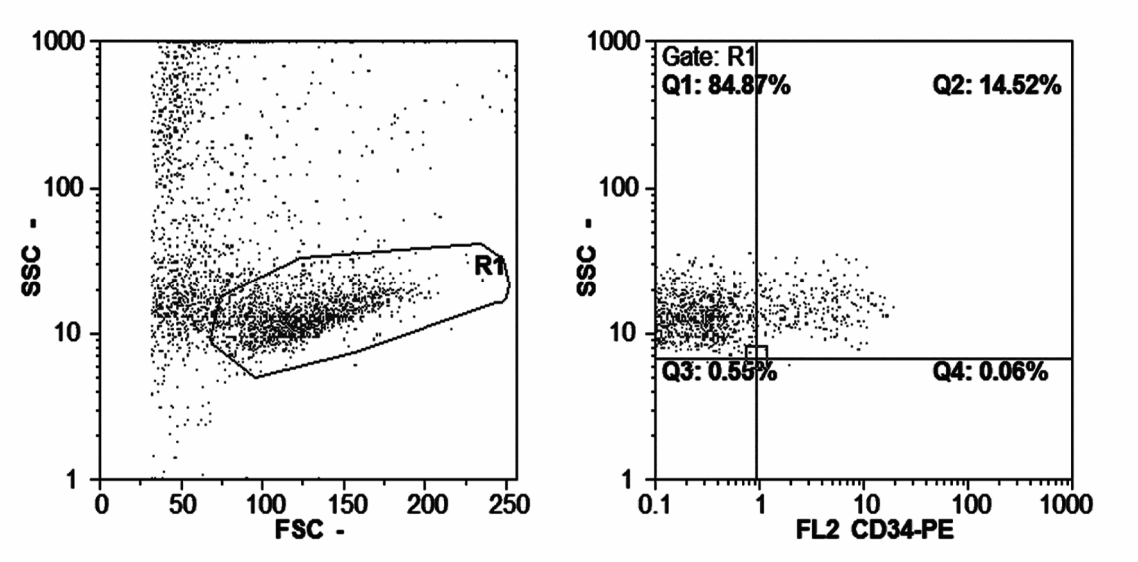
3-2- آزمون QRT-PCR

از اين آزمون براي برآورد تغييـرات ايجـاد شـده در ميـزان بيـان نـسخه RNA ژن مـورد نظـر اسـتفاده شـد. پـس از ترانسفکشن سلول‌هاي خون‌ساز بعد از مدت 48 و 72 سـاعت از نظر ميـزان بيـان ترانـسکريپت ژن TGFbR2 ارزيـابي شـد. ميزان بيان ترانسکريپت مورد نظر در دو گروه متفـاوت نـسبت به سطح ترانسکريپت بتـا- اکتـين قانونمنـد شـد. نتـايج نـشان مي‌دهد که بيشترين مقدار کاهش بيان ژن حدود 72 ساعت پس از ترانسفکشن حاصل مي‌شود. بـه‌عـلاوه در مقايـسه بـا گـروه کنترل، 40 درصد تـا 50 درصـد کـاهش بيـان ژن TGF-bR2 مشاهده شد.

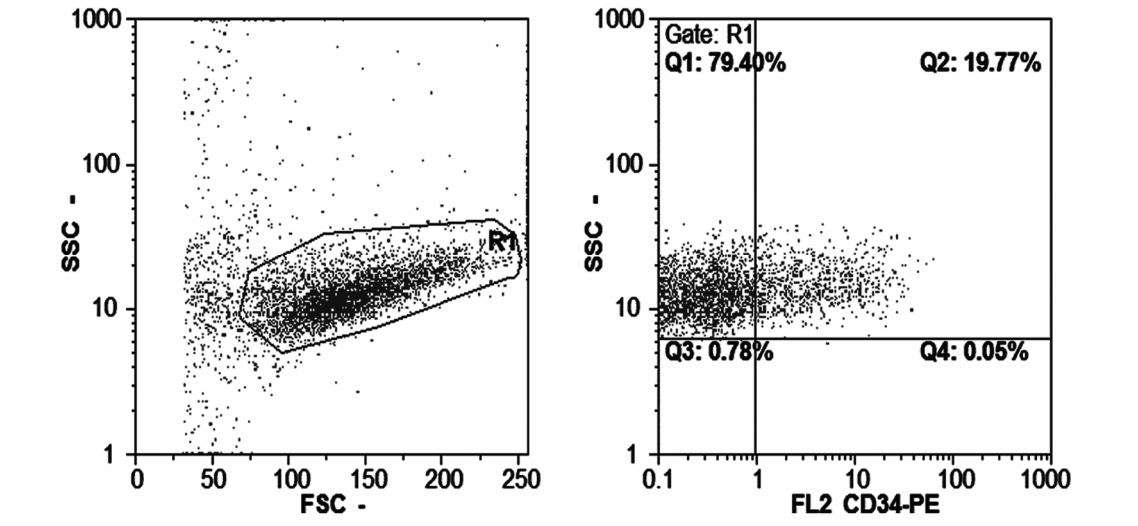
3-3- بررسي فلوسايتومتريك سـلول‌هـاي افـزون شده در محيط آزمايـشگاه (Ex Vivo Expanded) از نظر نشانگرهاي CD34

در بررسي حاضر ميزان نشانگرهاي سـطحي CD34 در دو فاصله زماني روز اول و روز هشتم کشت ارزيابي شـد. در هـر بار بررسي حدود 40000 سلول از محيط کشت برداشت شدند و بعد از پردازش نمونه‌ها با استفاده از آنتي‌بادي‌هـاي بـر عليـه نشانگر CD34 نـشاندار شـده بـا FITC و همچنـين ايزوتيـپ کنترل نتـايج فلوسـايتومتري مطالعـه شـدند. بررسـي نتـايج آن نشانگر اين بود که به‌طور ميـانگين ميـزان بيـان CD34 در روز اول پس از جداسازي حدود 85 درصد بود و در روز هشتم در

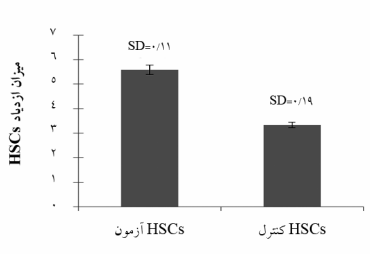
گروه کنترل به‌طور میانگین 14/2 درصد (شکل 3) و در گروه تحت تأثیر قرار گرفته با SiRNA حدود 19/6 درصد (شکل 4) CD34+ HSC وجود داشت. با توجه به تعداد اولیه سلول CD34+ در زمان شروع کشت و تعداد سلول‌هاي CD34+ در روز پایان کشت، در گروه کنترل سلول‌هاي CD34+ پس از اتمام دوره کشت از نظر فنوتیپي 3/8 برابر ازدیاد داشتند و گروه آزمون سلول‌هاي بنيادي CD34+ حدود 5/3 برابر ازدیاد داشتند (نمودار 1).



شکل 3 نمودار فلوسایتومتري HSCs در گروه کنترل از نظر میزان بروز نشانگر CD34 در سطح سلول‌ها



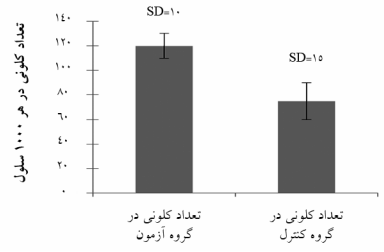
شکل 4 نمودار فلوسایتومتري HSCs در گروه آزمون از نظر میزان بروز نشانگر CD34 در سطح سلول‌ها



نمودار 1 ميزان ازدياد HSCs براساس ارزيابي‌هاي ايمونوفنوتيپي در گروه آزمون و كنترل

3-4- آزمون كلوني‌زايي

در گروه‌هاي آزمون و گروه‌هاي كنترل بلافاصله پس از كشت 8 روزه در محيط متوكالت (Methocult)، بررسي‌هاي كلوني‌زايي انجام شد. به‌مدت 2 هفته زمان داده شد تا كلوني‌ها در اين محيط نيمه جامد تشكيل شود. اين بررسي‌ها نشان داد كه تعداد كلوني‌ها به ازاي هر 1000 سلول در گروه آزمون با تعداد 10±120 كلوني نسبت به گروه كنترل با تعداد 15±70 كلوني افزايش قابل توجهي داشته است (نمودار 2). در مقايسه با گروه كنترل كه حدود 40 درصد كلوني‌ها اندازه بزرگ داشتند، حدود 65 درصد كلوني‌ها در گروه آزمون بزرگ بودند كه نشان دهنده اوليه بودن سلول تشكيل دهنده و بنابراين فراواني نسبي سلول‌هاي اوليه خون‌سازي در گروه آزمون نسبت به كنترل بود.



نمودار 2 تعداد كلوني‌ها در گروه آزمون در مقايسه با گروه كنترل در آزمون كلوني‌زايي

3-5- آزمون LT-CIC

براي بررسي آثار سركوب بيان ژن TGFbR2 و تأثير آن بر افزايش سلول‌هاي بنيادي اوليه خون‌سازي، از اين آزمون استفاده شد. هدف بررسي اين مطلب بود كه آيا اين افزايش جمعيت سلول‌هاي +CD34 همراه با افزايش تعداد سلول‌هاي بنيادي اوليه خون‌سازي بوده است يا خير؟ پس از ازدياد HSCs در محيط كشت از روز هشتم به بعد به‌صورت رقت محدود كننده سلول‌هاي ازدياد شده به محيط LT-CIC كه قبلاً راجع به آن صحبت شد، منتقل شدند. همان‌طور كه قبلاً بحث شد سلول‌ها در محيط LT-CIC به‌مدت 6 هفته نگهداري شدند. پس از سپري شدن اين مدت با ارزيابي‌هاي صورت گرفته در محيط كلوني‌زايي با استفاده از نرم‌افزار L-Calc™ تعداد سلول‌هاي بنيادي اوليه محاسبه شد. تعداد LT-CIC در اين محيط در سلول‌هاي تحت تأثير قرار گرفته با SiRNA حدود 1 در هر 6024 سلول خون‌ساز با P value=0/05 بود و در گروه كنترل حدود 1 در هر 7344 با P value=0/05 بود كه نشانگر تفاوت قابل توجه بين گروه آزمون و كنترل و نشان دهنده 1/21 برابر افزايش سلول‌هاي اوليه خون‌ساز در گروه تيمار نسبت به گروه كنترل بود.

4- بحث

مجموع مطالعات انجام شده روي TGF-b نشان‌دهنده نقش مهم و هنوز ناشناخته اين سايتوكين در زيست‌شناسي HSCs در داخل بدن است. براي مثال طي بررسي‌هاي انجام شده بيان مشابهي از نسخه TGF-b RNA در HSCs در مغز استخوان و در خون محيطي مشاهده شده است، اين بيان غيرمتغير سايتوكين در شرايط ثابت و بدون وابستگي به محل حضور سلول بنيادي نشان دهنده نقش بسيار مهم اين سايتوكين در كنترل رفتارهاي HSC در داخل بدن است [25]. از سوي ديگر مطالعات جديد بر خلاف گزارش‌هاي قبلي كه نقش اين سايتوكاپين را در ايجاد حالت خفتگي سلولي رد كرده بود [26]، نشان‌دهنده نقش اين سايتوكين در القاي حالت خفتگي در بدن است [23]. همچنين در حالي‌كه اطلاعات به‌دست آمده قبلي بيانگر اين بود كه مهار

علامت‌دهي اين سايتوكين منجـر بـه افـزايش سـرعت پيونـد سلول‌هاي تزريق شده مي‌شود [10]، اطلاعـات جديـد نـشان مي‌دهد كه در سلول‌هاي بنيادي به‌دست آمده از مدل‌هاي فاقد ژن TGF-b اين ژن يك تنظيم كننده كليدي خـون‌سـازي در داخل بدن است و براي لانه‌گزيني اين سلول‌ها بسيار حيـاتي است و فقدان آن سبب كاهش قابل توجه لانه‌گزيني مي‌شـود [27]. اين يافته‌ها نشان دهنده دشواري بسيار زيـاد در تعيـين دقيق نقش اين سايتوكين در كنترل رفتارهاي HSC است. بـا وجود نقش كليدي احتمـالي ايـن سـايتوكين در داخـل بـدن براساس يافته‌هاي اخيـر، نقـش مهـاري TGF-b درون‌زاد در مهار فعاليت خود تجديد شونده و كاهش بقاي اين سلول‌ها و القاي تمايز در محيط كشت ثابت شـده اسـت. بـا توجـه بـه نقش‌هـاي اساسـي ايـن سـايتوكين در عـدم موفقيـت ازديـاد HSCs با توجه به موارد ذكـر شـده در بررسـي حاضـر ايـن پرسش مطرح شد كه آيـا بـه‌كـارگيري SiRNA بـراي مهـار علامت‌دهي TGF-b مـي‌توانـد منجـر بـه افـزايش جمعيـت HSCs اوليه و القاي فعاليت خود تكثيري آن‌ها شود يا خير؟ براي بررسي اين موضـوع در ابتـدا از ارزيـابي‌هـاي فنـوتيپي فلوسايتومتريك براي بررسي اوليه بودن يا نبودن اين سلول‌ها استفاده شد. در گام بعدي با آزمون‌هاي‌هاي كلوني‌زايي قبل و بعد از آزمون LT-CIC، اوليه بودن يا نبـودن HSCs از نظـر عملكردي بررسي شد. در اين مطالعـه از مهـار مـوقتي مـسير علامـت‌دهـي TGF-b اسـتفاده شـد كـه دليـل آن اسـتعداد سلول‌هاي غير پاسخ دهنده به TGF-b براي ترانسفورماسيون (Transformation) بـدخيم از نـوع ميلوئيـد (Myeloid) و لنفوئيد (Lymphoid) بود [28-31].

نتايج به‌دست آمده از بررسـي‌هـاي فلوسـايتومتريك نـشان دهنده افزايش حدود 5 درصدي بروز نشانگر CD34 در سـطح گروه آزمون، كه فعاليت مسير علامـت‌دهـي TGF-b در آن‌هـا مهار شده، نسبت به گروه كنترل بود. از آن‌جايي كه برآوردهاي ايمونوفنوتيپيك بيانگر افزايش HSCs در گـروه آزمـون نـسبت به كنترل بود، محققان حاضر تصميم گرفتند تا سلول‌هاي مـورد آزمايش را از نظر عملكردي نيز ارزيابي نمايند. براي اين امر در گام نخست توانايي كلوني‌زايي سلول‌هاي بنيادي كه به‌مـدت 8 روز در محيط كـشت ازديـاد پيـدا كـرده بودنـد، بررسـي شـد. بررسي‌هاي كلوني‌زايي نشان داد كه در گروه كنترل از هر 1000 سلول حدود 15±70 كلوني تشكيل و در گـروه آزمـون از هـر 1000 سلول 10±120 كلوني تشكيل شـده اسـت. ايـن داده‌هـا نشان مي‌داد كه جمعيت سلولي تيمـار شـده نـسبت بـه كنتـرل توانايي كلوني‌زايي قوي‌تري را داشتند ولي در اين‌جا تفاوت در تعداد كلوني‌ها چشمگيرتر از تفاوت ايمونوفنـوتيپي بـين گـروه كنترل و آزمون بود كه احتمـالاً دلالـت بـر توانـايي عملكـردي بيشتر گروه آزمون نـسبت بـه كنتـرل داشـت. از سـوي ديگـر؛ همان‌طور كه اشاره شد در آزمون كلوني‌زايـي در گـروه آزمـون غلبه با كلوني‌هاي بـزرگ‌تـر بـود و در گـروه كنتـرل غلبـه بـا كلوني‌هاي كوچك‌تر بود (حدود 65 درصد كلوني‌هـا در گـروه آزمون كلوني‌هاي بزرگ بودنـد و در گـروه كنتـرل حـدود 40 درصد كلوني‌ها اندازه بزرگ داشتند)، كـه بـه‌طـور ضـمني هـم تعداد زيادتر سلول‌هاي قادر به تشكيل كلوني را نشان مـي‌داد و هم نشان دهنده اوليه‌تر بودن ايـن سـلول‌هـا بـود. ايـن مطلـب مي‌تواند به‌طور غيرمستقيم غيرمـؤثر بـودن كـشت سـلول‌هـاي بنيادي در شرايط عادي را نشان دهد.

بـا وجـود ايـن‌كـه نتـايج آزمـون‌هـاي فلوسـايتومتري و كلوني‌زايي نشان‌دهنـده اثـر بخـشي مهـار علامـت‌دهـي مـسير TGF-b در القاي فعاليت خود تكثيري سلول‌هاي بنيـادي بـود، ولي باز هم نمي‌تواند معيار درستي از تعـداد سـلول‌هـاي اوليـه خون‌سازي كه براي مقاصد پيوند مغز استخوان بيشترين اهميت را دارند، باشد. بنابراين محققان حاضر تصميم گرفتند تا از ميان سلول‌هـاي خـون‌سـاز +CD34 كـه مخلـوطي از سـلول‌هـاي گوناگون از مراحل تمايزي مختلف هـستند و از سـلول بنيـادي خون‌ساز اوليه گرفته تا سلول‌هاي متعهد به يـك رده خـاص را شامل مي‌شوند، تعداد HSCs اوليه را در گـروه‌هـاي آزمـون و كنترل ارزيابي نماينـد. فراوانـي HSCs اوليـه بـا آزمـون رفـت محدود كننده LT-CIC بررسي شد.

نتايج به‌دست آمده از آزمون LT-CIC تفاوت قابل توجهي را بين گروه كنترل و آزمون نشان مي‌داد. ولي چنانچه نتايج آزمون LT-CIC با نتايج آزمون كلوني‌زايي مقايسه شود، مشخص مي‌شود كه گروه تيمار شده با SiRNA مهار كننده مسير TGF-b در آزمون كلوني‌زايي، تعداد بسيار بيشتري كلوني را در مقايسه با گروه كنترل داشتند و چنانچه اين نتايج در برابر نتايج به‌دست آمده از آزمون LT-CIC قرار داده شود مشخص مي‌شود كه در آن‌جا تفاوت بين گروه آزمون و كنترل كمتر است كه به‌نظر مي‌رسد به‌خاطر موقتي بودن اثر تيمار انجام شده بوده است و با توجه به اين‌كه محققان حاضر مي‌دانستند كه بيان TGF-b همچنان در محيط LT-CIC وجود دارد [32]، احتمالاً حضور اين سايتوكين در محيط LT-CIC مي‌تواند دليل تفاوت قابل توجه بين نتايج آزمون كلوني‌زايي و LT-CIC باشد. اما دليل تفاوت معني‌دار بين گروه كنترل و آزمون در آزمون LT-CIC احتمالاً به اين دليل است كه از همان ابتدا در گروه آزمون تعداد بيشتري سلول‌هاي بنيادي اوليه خون‌ساز در مخلوط سلولي كه براي آزمون LT-CIC به‌كار رفت، نسبت به كنترل وجود داشته است.

با وجود گزارش‌هاي مطرح شده توسط باتارد (Batard) و همكارانش مبني بر اين‌كه HSC TGF-b ها را در محيط كشت در حالت اوليه نگه مي‌دارد و موجب افزايش بروز و محافظت نشانگر سطحي CD34 طي كشت HSCs مي‌شود [9]، نتايج بررسي حاضر اين موضوع را تأييد نمي‌نمايد. از يك سو شمارش سلولي در گروه كنترل پس از هشتمين روز در گروه آزمون بالاتر از گروه كنترل بود كه اين موضوع بيانگر برداشته شدن مهار چرخه سلولي از روي سلول‌هاست و از سوي ديگر؛ در بررسي انجام شده توسط محققان حاضر از نظر فنوتيپي بروز آنتي‌ژن CD34 در روز اول به‌طور ميانگين 85 درصد بود كه پس از 8 روز كشت در گروه آزمون كه مسير علامت‌دهي TGF-b در آن‌ها مهار شده بود، به‌طور ميانگين حدود 19/6 درصد و در گروه كنترل به‌طور ميانگين حدود 14/2 درصد مشاهده شد كه نشان‌دهنده تأثير مهار علامت‌دهي TGF-b1 بر ميزان بروز اين نشانگر سطحي بود. مطالعات قبلي باتارد و همكاران نيز نشان دهنده تأثيرحضور اين سايتوكين در نگهداري سلول‌هاي بنيادي در حالت اوليه است ولي براساس نتايج مطالعه حاضر، با مهار اين مسير در گروه آزمون تعداد LT-CIC بيشتري نسبت به گروه كنترل مشاهده مي‌شود. اين افزايش تعداد LT-CIC مي‌تواند به علت افزايش پاسخ‌دهي HSCs به فاكتورهاي رشد خون‌سازي و سايتوكين‌هاي عمل كننده اوليه و همچنين برداشته شدن اثر مهاري از روي چرخه سلولي باشد [23].

در مطالعات قبلي از آنتي‌بادي خنثي كننده TGF-b1 يا TGFbR2 يا از DNA مداخله‌گر براي مهار اثر TGF-b1 درون‌زاد استفاده شد، ولي در هر دوي اين بررسي‌ها فقط به بررسي‌هاي كلوني‌زايي اوليه اكتفا شد. در اين مطالعه تأثير اين مداخله بر سلول‌هاي LT-CIC انجام شد كه اهميت بسيار بيشتري را در نشان دادن موفقيت ازدياد HSCs با اين روش خواهد داشت. همچنين در اين مطالعه از روش جديدتر و كارآمدتر مهار بيان نسخه RNA كه همان SiRNA است استفاده شد. در مطالعات كلوني‌زايي بررسي حاضر در گروه آزمون غلبه با كلوني‌هاي با سايز بزرگ‌تر بود كه با نتايج به‌دست آمده توسط فورتونل (Fortunel) و همكارانش همخواني داشت. در بررسي انجام شده توسط اين گروه‌ها فقط بر مبناي تشكيل كلوني‌هاي بزرگ‌تر از كلوني‌هاي كوچك‌تر اين دو نوع سلول را از هم جدا كردند كه نمي‌تواند معيار درستي براي تفكيك سلول‌هاي اوليه از سلول‌هاي بالغ باشد، در صورتي كه در بررسي حاضر از آزمون LT-CIC براي تفكيك اين دو سلول از هم استفاده شد [33]. در مطالعه حاضر با مهار موقتي علامت‌دهي مسير TGF-b نشان داده شد كه مهار اين مسير مي‌تواند در رسيدن به شرايط مطلوب ازدياد HSCs كمك شاياني نمايد. در مجموع به‌نظر مي‌رسد كه ازدياد HSCs با استفاده از روش‌هايي كه در آن‌ها فقط به عوامل تنظيمي

مثبت توجه مي‌شود، به تنهايي كارآمد نيست و براي رسيدن بـه شرايط بهينه ازدياد HSCs توجه همزمان به عوامل مهار كننـده موجود در محيط كشت سلول‌هاي خون‌سازي از اهميت بـسيار زيادي برخوردار است و مهـار آن‌هـا در كنـار حـضور عوامـل تحريك كننده تكثير خود تجديد شـونده HSCs مـي‌توانـد در رسيدن به شرايط مطلوب ازديـاد HSCs در محـيط آزمايـشگاه داراي اهميت باشد.

5- تشكر و قدرداني

اين تحقيق حاصـل از پايـان‌نامـه دكتـري گـروه همـاتولوژي دانشگاه تربيت مدرس بوده و با حمايت مالي سازمان انتقال خـون ايران و دانشگاه متبوع به انجام رسيده است. نويسندگان از سـركار خانم رعوفي (بيمارستان شريعتي) و جناب آقاي دكتـر عـسگريان (بخش فلوسايتومتري آزمايشگاه نور) كه همكاري صـميمانه‌اي در انجام اين تحقيق داشتند، تشكر و قدرداني مي‌نمايند.

6- منابع

[1] To LB. Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. Blood 1997; 89(7): 2233-58.

[2] Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood 1993; 81(11): 2844-53.

[3] Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell 2003; 113(6): 685-700.

[4] Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. Blood 2000; 96(6): 2022-36.

[5] Ohishi K, Katayama N, Itoh R, Mahmud N, Miwa H, Kita K, Minami N, Shirakawa S, Lyman SD, Shiku H. Accelerated cell-cycling of hematopoietic progenitors by the flt3 ligand that is modulated by transforming growth factor-beta. Blood 1996; 87(5): 1718-27.

[6] Cashman JD, Eaves CJ, Sarris AH, Eaves AC. MCP-1, not MIP-1alpha, is the endogenous chemokine that cooperates with TGF-beta to inhibit the cycling of primitive normal but not leukemic (CML) progenitors in long-term human marrow cultures. Blood 1998; 92(7): 2338-44.

[7] Atkins GJ, Haynes DR, Geary SM, Loric M, Crotti TN, Findlay DM. Coordinated cytokine expression by stromal and hematopoietic cells during human osteoclast formation. Bone 2000; 26(6): 653-61.

[8] Liesveld JL, Harbol AW, Belanger T, Rosell KE, Abboud CN. MIP-1alpha and TGF-beta production in CD34+ progenitor-stromal cell coculture systems: effects of progenitor isolation method and cell-cell contact. Blood Cells Mol Dis 2000; 26(4): 261-75.

[9] Batard P, Monier MN, Fortunel N, Ducos K, Sansilvestri-Morel P, Phan T, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. TGF-(beta) 1 maintains hemato-poietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. J Cell Sci 2000; 113(Pt 3): 383-90.

[10] Wiesmann A, Kim M, Georgelas A, Searles AE, Cooper DD, Green WF, Spangrude GJ. Modulation of hematopoietic stem/progenitor cell engraftment by transforming growth factor beta. Exp Hematol 2000; 28(2): 128-39.

[11] Tanaka R, Katayama N, Ohishi K, Mahmud N,

Itoh R, Tanaka Y, Komada Y, Minami N, Sakurai M, Shirakawa S, et al. Accelerated cell-cycling of hematopoietic progenitor cells by growth factors. Blood 1995; 86(1): 73-9.

[12] Sitnicka E, Ruscetti FW, Priestley GV, Wolf NS, Bartelmez SH. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. Blood 1996; 88(1): 82-8.

[13] Ruscetti FW, Bartelmez SH. Transforming growth factor beta, pleiotropic regulator of hematopoietic stem cells: potential physiological and clinical relevance. Int J Hematol 2001; 74(1): 18-25.

[14] Ramsfjell V, Borge OJ, Cui L, Jacobsen SE. Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34+ CD38-) human bone marrow progenitor cells: distinct and key interactions with the ligands for c-kit and flt3, and inhibitory effects of TGF-beta and TNF-alpha. J Immunol 1997; 158(11): 5169-77.

[15] Fortunel N, Batard P, Hatzfeld A, Monier MN, Panterne B, Lebkowski J, Hatzfeld J. High proliferative potential-quiescent cells: a working model to study primitive quiescent hematopoietic cells. J Cell Sci 1998; 111(Pt 13): 1867-75.

[16] Pierelli L, Marone M, Bonanno G, Mozzetti S, Rutella S, Morosetti R, Rumi C, Mancuso S, Leone G, Scambia G. Modulation of bcl-2 and p27 in human primitive proliferating hematopoietic progenitors by autocrine TGF-beta1 is a cell cycle-independent effect and influences their hematopoietic potential. Blood 2000; 95(10): 3001-9.

[17] Keller JR, Mcniece IK, Sill KT, Ellingsworth LR, Quesenberry PJ, Sing GK, Ruscetti FW. Transforming growth factor beta directly regulates primitive murine hematopoietic cell proliferation. Blood 1990; 75(3): 596-602.

[18] Heinrich MC, Dooley DC, Keeble WW. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of the gene products for steel factor and its receptor (c-kit). Blood 1995; 85(7): 1769-80.

[19] Sitnicka E, Ruscetti FW, Priestley GV, Wolf NS, Bartelmez SH. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. Blood 1996; 88(1): 82-8.

[20] Fan X, Valdimarsdottir G, Larsson J, Brun A, Magnusson M, Jacobsen SE, ten Dijke P, Karlsson S. Transient disruption of autocrine TGF-beta signaling leads to enhanced survival and proliferation potential in single primitive human hemopoietic progenitor cells. J Immunol 2002; 168(2): 755-62.

[21] Larsson J, Blank U, Helgadottir H, Björnsson JM, Ehinger M, Goumans MJ, Fan X, Levéen P, Karlsson S. TGF-beta signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and regenerative ability in vivo despite increased proliferative capacity in vitro. Blood 2003; 102(9): 3129-35.

[22] Larsson J, Goumans MJ, Sjöstrand LJ, van Rooijen MA, Ward D, Levéen P, Xu X, ten Dijke P, Mummery CL, Karlsson S. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice.

EMBO J 2001; 20(7): 1663-73.

[23] Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Eto K, Ema H, Nakauchi H. TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. Blood 2009; 113(6): 1250-6.

[24] Eaves CJ, Cashman JD, Kay RJ, Dougherty GJ, Otsuka T, Gaboury LA, Hogge DE, Lansdorp PM, Eaves AC, Humphries RK. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. Blood 1991; 78(1): 110-7.

[25] Smiler DG, Soltan M, Soltan C, Matthews C. Growth factors and gene expression of stem cells: bone marrow compared with peripheral blood. Implant Dent 2010; 19(3): 229-40.

[26] Larsson J, Blank U, Klintman J, Magnusson M, Karlsson S. Quiescence of hematopoietic stem cells and maintenance of the stem cell pool is not dependent on TGF-beta signaling in vivo. Exp Hematol 2005; 33(5): 592-6.

[27] Capron C, Lacout C, Lécluse Y, Jalbert V, Chagraoui H, Charrier S, Galy A, Bennaceur-Griscelli A, Cramer-Bordé E, Vainchenker W. A major role of TGF-beta1 in the homing capacities of murine hematopoietic stem cell/progenitors. Blood 2010; 116(8): 1244-53.

[28] Le Bousse-Kerdilès MC, Chevillard S, Charpentier A, Romquin N, Clay D, Smadja-Joffe F, Praloran V, Dupriez B, Demory JL, Jasmin C, Martyré MC. Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. Blood 1996; 88(12): 4534-46.

[29] Rooke HM, Vitas MR, Crosier PS, Crosier KE. The TGF-beta type II receptor in chronic myeloid leukemia: analysis of microsatellite regions and gene expression. Leukemia 1999; 13(4): 535-41.

[30] DeCoteau JF, Knaus PI, Yankelev H, Reis MD, Lowsky R, Lodish HF, Kadin ME. Loss of functional cell surface transforming growth factor beta (TGF-beta) type 1 receptor correlates with insensitivity to TGF-beta in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94(11): 5877-81.

[31] Lagneaux L, Delforge A, Bron D, Massy M, Bernier M, Stryckmans P. Heterogenous response of B lymphocytes to transforming growth factor-beta in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: correlation with the expression of TGF-beta receptors. Br J Haematol 1997; 97(3): 612-20.

[32] Eaves CJ, Cashman JD, Kay RJ, Dougherty GJ, Otsuka T, Gaboury LA, Hogge DE, Lansdorp PM, Eaves AC, Humphries RK. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. Blood 1991; 78(1): 110-7.

[33] Fortunel N, Hatzfeld J, Kisselev S, Monier MN, Ducos K, Cardoso A, Batard P, Hatzfeld A. Release from quiescence of primitive

receptor in a short-term in vitro assay. Stem Cells 2000; 18(2): 102-11.

human hematopoietic stem/progenitor cells by blocking their cell-surface TGF-beta type II