

# افزایش فعالیت خود تجدید شون‌دگی سلول‌های بنیادی خون‌ساز بند ناف CD34+ با استفاده از سرکوب بیان ژن گیرنده دو TGF-b

مهدی اله‌بخشیان‌فارسانی<sup>۱</sup>، ناصر امیری‌زاده<sup>۲\*</sup>، مهدی فروزنده<sup>۳</sup>، مسعود سلیمانی<sup>۴</sup>، علی‌اکبر پورفتح‌اله<sup>۵</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- استادیار، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۹/۱۲/۰۹

دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۲۳

## چکیده

**هدف:** امروزه سلول‌های بنیادی خون‌ساز بند ناف به یکی از مهم‌ترین منابع سلول‌های بنیادی خون‌ساز تبدیل شده‌اند، اما متأسفانه تعداد محدود آن‌ها در واحدهای خون بند ناف استفاده از آن‌ها را در موارد پیوند مغز استخوان بزرگسالان محدود نموده است. یکی از روش‌های در نظر گرفته شده برای غلبه بر این مشکل، ازدیاد سلول‌های بنیادی خون‌ساز با استفاده از افزایش فعالیت خود تجدید شون‌دگی آن‌ها در محیط کشت است. چنین به نظر می‌رسد که مسیر TGF-b یکی از عوامل مهم مهار فعالیت خود تجدید شون‌دگی سلول‌های بنیادی خون‌ساز است. در این مطالعه سعی شده است تا با مهار علامت‌دهی مسیر TGF-b میزان تکثیر خود تجدید شون‌دگی سلول‌های بنیادی و در نتیجه ازدیاد آن‌ها را ارتقا یابد.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی خون‌ساز بند ناف CD34<sup>+</sup> با استفاده از ستون‌های MACS از واحدهای خون بند ناف جدا شدند. سلول‌های جداسازی شده به‌وسیله SiRNA بر علیه TGFbR2 ترانسفکت شده و طی کشت میزان سرکوب بیان ژن گیرنده نوع دو TGF-b (TGFbR2) با استفاده از Real-Time PCR کمی بررسی شد و پس از اتمام دوره کشت از نظر نشانگر سطحی CD34 با استفاده از فلوسایتومتری و از نظر عملکردی با استفاده از LT-CIC و آزمون کلونی‌زایی ارزیابی شدند.

**نتایج:** براساس نتایج بررسی حاضر مهار بیان ژن TGFbR2 موجب افزایش جمعیت سلول‌های خون‌ساز CD34<sup>+</sup> می‌شود. از سوی دیگر ارزیابی‌های LT-CIC و آزمون کلونی‌زایی افزایش تعداد سلول‌های بنیادی خون‌ساز اولیه را تأیید می‌نماید.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد به همان اندازه‌ای که حضور عوامل محرک فعالیت خود تجدید شون‌دگی در موفقیت ازدیاد سلول‌های بنیادی خون‌ساز بند ناف اهمیت دارد، مهار عوامل مهارتی هم دارای اهمیت است و مهار علامت‌دهی مسیر TGF-b به‌عنوان یکی از عوامل مهارتی کلیدی می‌تواند به موفقیت ازدیاد سلول‌های بنیادی خون‌ساز بند ناف در محیط آزمایشگاه کمک شایانی نماید.

**کلیدواژگان:** سلول‌های بنیادی خون‌ساز بند ناف، TGFbR2، SiRNA

## ۱- مقدمه

امروزه پیوند مغز استخوان به صورت گسترده‌ای برای درمان شمار زیادی از بیماران در سرتاسر جهان استفاده می‌شود. سلول‌های بنیادی خون‌ساز (Hematopoietic stem cell: HSCs) بند ناف یکی از بهترین منابع HSCs هستند که به دلیل مزایای زیاد از جمله سهولت تهیه و دسترسی، فقدان خطر برای مادران اهداکننده، حساسیت بالا برای القای تحمل، پایین بودن آلو آنتی‌ژن‌ها (Alloantigen) و آنتی‌ژن‌های HLA (Human Leukocyte Antigen) سطحی و در نتیجه عدم نیاز به سازگاری بالایی بین دهنده و گیرنده و ... توجه روز افزونی را به خود جلب نموده‌اند [۱]. اما متأسفانه تعداد محدود سلول‌های بنیادی در نمونه‌های خون بند ناف استفاده از این منبع سلولی ارزشمند را در درمان‌های پیوند مغز استخوان بزرگسالان محدود می‌سازد. یکی از راه‌کارهای غلبه بر این مشکل ازدیاد HSCs بند ناف در محیط آزمایشگاه (Ex vivo Expansion of HSCs) است. برای القای مطلوب فعالیت خود تجدید شونده سلول‌های بنیادی که در نهایت منجر به ازدیاد آن‌ها می‌شود، به شناخت درستی از عوامل کنترل کننده فعالیت خود تکثیری این سلول‌ها نیاز است.

تصمیم سلول برای رفتن به سمت تمایز یا خود تجدید شونده‌گی به مقدار زیادی بستگی به علامت‌هایی دارد که سلول از محیط خارج و یا داخل دریافت می‌دارد. این علامت‌ها گاهی اوقات سلول را وادار به تکثیر و رشد می‌نماید [مانند فاکتورهای رشد از جمله SCF (Stem Cell Factor) یا فاکتورهای رونویسی از جمله HOXB4 (Homeobox B4)] و در پاره‌ای از موارد دیگر نقش‌های مهارتی خواهند داشت [مانند TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) یا TGF-b (Transforming growth factor-b)]. از مهم‌ترین علامت‌های خارجی که فعالیت خود تکثیری سلول‌های بنیادی و تمایز آن‌ها را کنترل می‌نماید، سایتوکین‌هاست که گاهی عامل محرک رشد و گاهی مهار کننده رشد است [۲]. TGF-b1، به‌عنوان یک عامل کلیدی در تعیین نوع رفتار HSCs از جمله این‌که به سمت

تمایز بروند یا فعالیت خود تکثیری انجام دهند، عمل می‌کند و از طریق گیرنده‌های سطح سلولی (Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor 1) و growth factor- $\beta$  Receptor 2 و علامت‌دهی می‌کند [۳]. تحقیقات قبلی در محیط‌های آزمایشگاهی (In vitro) و درون‌بدنی (In vivo) نشانگر نقش مهم این سایتوکین در تمامی مراحل خون‌سازی بوده است [۴]. این سایتوکین توسط سلول‌های خون‌ساز به دو صورت اتوکرین (Autocrine) و پاراکرین (Paracrine) ترشح می‌شود [۵] و علاوه بر آن توسط سلول‌های استرومایی نیز ساخته می‌شود [۶-۸]. مطالعات انجام شده آثار مهارتی مستقیم TGF-b را بر رشد سلول‌های منفی از نظر شاخص‌های تمایزی با بیان CD34 بالا (رده CD34<sup>high</sup>CD38<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> HSC) تخلص شده و HSC های CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> نشان داده‌اند. افزودن TGF-b به محیط کشت HSCs همچنین به مقدار ۸۰ تا ۹۰ درصد تشکیل کلونی‌های خون‌ساز را در حضور سایتوکین‌های عمل کننده اولیه (Early Acting Cytokines) مانند SCF، Flt-3L (FMS-like tyrosine kinase 3 Ligand) و Tpo (Thrombopoietin) کاهش داده است [۹]. از سوی دیگر در یکی از بررسی‌ها، HSC های HO/Ro<sub>low</sub> (Hoechst 33342<sub>Low</sub> and rhodamine-123<sub>Low</sub>) که در ابتدا برای تکثیر سلولی تحریک شده و سپس در مجاورت TGF-b قرار گرفتند، به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش در توانایی پیوند را نشان دادند [۱۰]. این سایتوکین از طرفی موجب طولانی شدن مرحله G1 چرخه سلولی می‌شود و از این طریق احتمالاً سلول‌ها را به سمت تمایز می‌برد [۵، ۱۱-۱۳] و از طرف دیگر از طریق افزایش بیان مهار کننده‌های cdk (Cyclin dependent Kinase)، مانند p15، p27 و p21 موجب مهار چرخه سلولی در مرحله S/G2/M شده و در نهایت مانع از فعالیت خود تکثیری سلول‌های بنیادی می‌شود [۶، ۱۲، ۱۴-۱۷]. موضوع دیگر این‌که یکی از مکانیسم‌های مهار کننده تکثیر سلولی این سایتوکین مربوط به تنظیم منفی است که از طریق این سایتوکین روی بیان گیرنده فاکتورهای رشد اعمال می‌شود [۴] و از این راه علامت‌دهی برخی از این سایتوکین‌ها

خود تجدید شونده این سلول‌ها می‌شود [۴] و از سوی دیگر؛ در بخش‌های قبلی اشاره شد که با طولانی شدن مرحله G1 توسط این سایتوکین موجب تمایز HSCs می‌شود و هر دو مورد فوق به شدت برای فعالیت خود تکثیری سلول‌های بنیادی و ازدیاد آن‌ها مضر و دو عامل اصلی عدم موفقیت ازدیاد HSCs در محیط آزمایشگاه است، در نتیجه این سؤال مطرح شد که مهار این مسیر با روش‌هایی که بتواند در سطح اولیه‌ای (mRNA) این مسیر را مهار کند روی میزان فعالیت خود تجدید شوندگی سلول‌های بنیادی چه تأثیری خواهد داشت و به چه میزانی می‌تواند به ممانعت از تمایز HSCs، که برای ازدیاد آن‌ها مناسب نیست، کمک نماید. براساس نتایج بررسی حاضر مهار علامت‌دهی از طریق این مسیر از یک سو موجب افزایش سلول‌های بنیادی CD34+ در محیط کشت می‌شود و از سوی دیگر در بررسی‌های عملکردی این سلول‌ها به‌طور قابل توجهی HSC های تیمار شده میزان کلونی‌زایی بیشتری داشتند. در نهایت بررسی سلول‌های خون‌ساز اولیه با استفاده از آزمون (Long-term Culture Initiating LT-CIC (Cell به‌طور معنی‌داری افزایش سلول‌های اولیه را نسبت به کنترل نشان داد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- جمع‌آوری نمونه و جداسازی HSCs

واحدهای خون بند ناف براساس روش‌های مصوب کمیته اخلاق پزشکی در دانشگاه تربیت مدرس جمع‌آوری شدند. در حین نمونه‌گیری براساس روش‌های مصوب از هر یک از افراد جامعه نمونه‌گیری، رضایت‌نامه گرفته شد. در مرحله اول جداسازی، خون بند ناف به‌دست آمده در فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری با هیدروکسی اتیل استارچ (Hydroxyethyl Starch) مخلوط و به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد که این موضوع به سهولت جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف کمک می‌نماید. پس از اتمام مدت زمان

مانند Tpo [۱۴] و همچنین SCF [۱۸] را که برای رشد و بقای HSCs ضروری است را مهار نموده و در نتیجه بقا و تکثیر HSCs در محیط کشت را کاهش می‌دهد. مطالعات دیگر هم تأثیر منفی این سایتوکین را بر بقای HSCs نشان داده‌اند [۱۹]، [۲۰]. بررسی‌های اولیه روی HSCs موشی و انسانی نشان دهنده نقش TGF-b در القای حالت خفتگی یا G0 HSCs بود [۴]. اما مطالعات بیشتر در محیط آزمایشگاه با نشان دادن این مطلب که TGF-b موجب مهار پیشرفت سلولی در مرحله G1/S می‌شود که این مهارسازی را معادل حالت خفتگی سلول‌ها در مرحله G0 ندانستند. در مرحله G0 در سلول سنتز mRNA یا پروتئین یا وجود ندارد یا خیلی کم است؛ در حالی که طی انتقال از مرحله G1 به S در سلول، ساخته شدن این عناصر شروع می‌شود. براساس نتایج به‌دست آمده با ساخته شدن این مولکول‌های جدید HSCs از حالت بنیادی خارج می‌شدند [۱۳، ۱۹].

بعدها، بررسی‌هایی روی موش‌های فاقد TGFbRI (TGFbRI-null mice) انجام شد که نشان دهنده خون‌سازی و تمایز طبیعی HSCs در این موش‌ها بود و بی‌اهمیت بودن نقش این سایتوکین را در ایجاد حالت خفتگی بیشتر تأیید می‌کرد [۲۱، ۲۲] اما با گسترده‌تر شدن مطالعات روی نقش‌های این سایتوکین که گاهی متضاد همدیگر هستند، این موضوع مشخص شده است که رفتار سلول در داخل و خارج بدن در مواجهه با این سایتوکین به‌طور کلی متفاوت است؛ به‌عنوان مثال در شرایط درون بدنی موجب ایجاد حالت خفتگی می‌شود [۲۳] در حالی که در محیط کشت سلولی نه تنها موجب حفظ سلول‌ها در حالت خفتگی نمی‌شود بلکه باعث القای تمایز در HSCs می‌شود [۱۳، ۱۹]. از آن‌جا که هر دو فرم mRNA و پروتئین TGF-b در کشت‌های طولانی مدت سلول‌های مغز استخوان یافت شده‌اند [۲۴] و با توجه به این موضوع که TGF-b اتوکین با حداقل دو مکانیسم، ۱- مهار چرخه سلولی پیش‌سازهای خون‌ساز [۱۹] و ۲- ایجاد یک حالت عدم پاسخ نسبت به فاکتورهای رشد در HSCs، موجب مهار تقسیم‌های

به هر خانه یک پلیت ۲۴ خانه‌ای در سه گروه منتقل شدند. در گروه اول Stealth™ RNAi بر علیه TGFbR2 و در گروه دوم Stealth™ RNAi Negative Control به‌عنوان کنترل منفی اضافه شدند و بالاخره در گروه سوم BLOCK-iT™ Alexa Fluor Red به‌عنوان کنترل میزان ترانسفکشن SiRNA مورد استفاده قرار گرفت. برای ترانسفکشن هر خانه حدود ۶ پیکومول از SiRNA دو رشته‌ای (SiRNA Duplex) در ۵۰ میکرولیتر Opti-MEM فاقد آنتی‌بیوتیک و سرم در یک تیوب و حدود ۱ میکرولیتر از لیپوفکتامین (Lipofectamine) در ۵۰ میکرولیتر Opti-MEM در تیوب دیگر افزوده شدند. پس از افزودن محتویات دو تیوب به هم و با انکوباسیون آن‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه، کمپلکس‌های لیپوفکتامین تشکیل و آماده افزودن به سلول‌ها شدند. سپس کمپلکس‌های حاوی SiRNA و لیپوفکتامین به خانه‌های مربوط که از قبل تهیه شده بود، اضافه شد. با افزودن این کمپلکس‌ها حجمی حدود ۶۰۰ میکرولیتر به‌دست آمد که غلظت نهایی ۱۰ نانومول از SiRNA داشت. بعد از افزودن کمپلکس لیپوفکتامین و SiRNA به آرامی پلیت به سمت جلو و عقب تکان داده شد تا به‌خوبی کمپلکس‌ها با محیط کشت مخلوط شوند. سپس پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> در صد قرار گرفت. می‌توان بعد از ۴ الی ۶ ساعت محیط رویی سلول‌ها را با محیط تازه ازدیاد HSCs تعویض نمود.

### ۲-۳- اندازه‌گیری کمی میزان سرکوب بیان ژن

#### TGFbR2 با استفاده از Real-Time PCR کمی (Quantitative Real-Time PCR: QRT-PCR)

به فواصل ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، از سلول‌های ترانسفکت شده با استفاده از محلول RNA x-plus براساس برنامه شرکت سازنده (شرکت سیناژن ایران) RNA سلولی تهیه شد. قبل از تهیه cDNA، DNaseI (Fermentas) به نمونه RNA افزوده شد. سنتز cDNA با استفاده از راندوم

انکوباسیون دو بخش تشکیل می‌شود؛ در پایین توده نسبتاً متراکم گلبول‌های قرمز و در بالا پلاسما همراه با سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف و مقدار کمی گلبول قرمز قرار می‌گیرند. در این مرحله برای جداسازی لایه سلول‌های تک هسته‌ای از سایر عناصر خون بند ناف، محیط رویی سانتریفوژ شد و رسوب حاصل از آن که حاوی سلول‌های تک هسته‌ای همراه با قدری گلبول قرمز از مرحله قبل است به روی فایکول منتقل خواهد شد و دوباره سانتریفوژ می‌شوند. پس از سانتریفوژ لایه سلول‌های تک هسته در قسمت بالایی فایکول قرار می‌گیرد، این لایه تک هسته‌ای جدا شده برای جداسازی HSC های CD34<sup>+</sup> با آنتی‌بادی‌های نشان‌دار شده با مغناطیس (Magnet) تهیه شده از شرکت Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Germany) مجاور شدند و سپس با استفاده از ستون‌های جداسازی LS (LS Separation Columns) (Miltenyi Biotech) جدا شدند.

سلول‌های جدا شده در محیط IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) و ترکیب سایتوکینی شامل ۱۰۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر SCF، ۱۰۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر Flt-3L، ۳۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر Tpo، ۳۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر IL-6 و ۳۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر IL-3 کشت داده شدند.

### ۲-۲- ترانسفکشن SiRNA علیه TGFbR2

SiRNA علیه TGFbR2 (Stealth™ Select RNAi) و کنترل منفی ترانسفکشن SiRNA به‌عنوان Stealth™ RNAi Negative Control و همچنین BLOCK-iT™ Alexa Fluor Red به‌عنوان الیگونوکلوئید کنترل میزان مؤثر بودن ترانسفکشن و همچنین معرف ترانسفکشن با نام Invitrogen Lipofectamine™ RNAiMAX از شرکت تهیه شد. به‌طور خلاصه روز قبل ترانسفکشن حدود ۵۰۰۰۰ تا ۷۰۰۰۰ سلول در ۵۰۰ میکرولیتر محیط فاقد آنتی‌بیوتیک و سرم

(PARTEC Germany) HSCs از نظر نشانگرهای سطحی ارزیابی شدند. حدود  $10^4 \times 6$  از سلول‌های کشت داده شده ابتدا با محلول PBS حاوی FBS ۲ درصد شستشو داده شد و سپس با استفاده از آنتی‌بادی‌های کوئزوگه شده با فلوروکروم FITC (Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- conjugated Antibodies) رنگ‌آمیزی ضد CD34 انجام شد. از آنتی‌بادی FITC-mouse IgG1 به‌عنوان یک ایزوتیپ کنترل برای تضمین اختصاصی بودن واکنش استفاده شد. برای تعیین ناحیه ای که سلول‌ها در آن تجزیه تحلیل می‌شوند (Gate)، از بخشی که دارای پراکنش نوری پایین (Low Side Scatter) بود و HSCs در آن ناحیه قرار می‌گیرند بهره‌گیری شد. در نهایت اطلاعات به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار FloMax بررسی شد.

## ۲-۵- آزمون کلونی‌زایی

در این آزمون سلول‌های خون‌ساز ازدیاد شده از گروه کنترل و گروه آزمون در سه رقت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ سلول در حدود ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به ۱ میلی‌لیتر محیط (Stemcell Technologies) Methocult™ GF+ H4435 اضافه و در داخل یک لوله فالكون ۱۵ به‌خوبی ورتکس (Vortex) شد. سپس اجازه داده شد تا حباب‌های موجود در محیط کشت برطرف شده و بعد از آن محیط حاوی سلول‌های موجود در هر لوله به‌صورت یکنواخت به یکی از خانه‌های پلیت ۶ خانه‌ای منتقل شد. به‌مدت ۲ هفته پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد  $CO_2$  انکوبه شد در پایان این مدت تعداد کلونی‌های تشکیل شده به ازای هر ۱۰۰۰ سلول شمارش شد.

## ۲-۶- آزمون LT-CIC

تعداد سلول‌های دارای توانایی ایجاد کلونی پس از کشت طولانی مدت یا LT-CIC با استفاده از کشت همزمان سلول‌های خون‌ساز روی فیبروبلاست‌های موشی از نوع M2-10B4 به‌دست آمد. در ابتدا چند روز قبل از شروع آزمون

هگزامر (Random Hexamer) و آنزیم MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus- Reverse Transcriptase) تهیه شده از شرکت Fermentas براساس برنامه ارایه شده انجام شد. سپس با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Real-Time PCR مربوط به شرکت Corbet، نمونه‌ها ارزیابی شد. برای انجام واکنش ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط اصلی (Master Mix) شرکت Roche با ۱ میکرولیتر از آغازگر (Primer) (۱۰ پیکومول) و ۱ میکرولیتر از cDNA (حدود ۱۰۰ نانوگرم) با هم مخلوط شد و با استفاده از آب مقطر حجم به ۲۵ میکرولیتر رسید. برای آغازگرهای به‌کار رفته پارمترهای استفاده شده برای طراحی بهترین آغازگر با استفاده از نرم‌افزار Oligo 6 لحاظ شد. توالی آغازگرهای به‌کار رفته از قرار زیر بود:

TGFbR2: جلویی (Forward)

5'-TTTCCACCTGTGACAACCA-3'

TGFbR2: برگشتی (Reverse)

5'-GCTGATGCCTGTCACTTGAA-3'

برای انجام واکنش PCR از برنامه زیر استفاده شد:

واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واسرشتگی ثانویه ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه اتصال (Annealing) در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و ۲۵ ثانیه بسط (Extension) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ چرخه و در نهایت ذوب (Melting). همه واکنش‌ها به‌صورت دوتایی (Duplicate) انجام شد و میانگین آن‌ها برای اندازه‌گیری به‌کار رفت. برای اندازه‌گیری مقدار نسبی (Relative Quantitation) از روش Pfaffl استفاده شد. به‌طور خلاصه مقادیر Ct (Threshold Cycle) مربوط به ژن هدف با ژن کنترل درون‌زاد که در اینجا بتا-اکتین بود، قانونمند شد و با استفاده از فرمول Pfaffl و در مقایسه با ژن دست‌نخورده، مقادیر کاهش بیان ژن ارزیابی شد.

## ۲-۴- فلوسایتومتري

قبل و بعد از ازدیاد، با استفاده از فلوسایتومتري

$\alpha$ MEM دوباره به حالت سوسپانسیون در آمد و به هر کدام ۱ میلی‌لیتر محیط Methocult™ GF+ H4435 افزوده شد و به‌خوبی ورتکس شد. سپس به‌مدت زمان کافی ماند تا حباب‌های ایجاد شده ناپدید شود. محتویات لوله‌ها به خانه‌های جداگانه‌ای از پلیت‌های ۶ خانه اضافه شدند. در یکی از خانه‌ها برای ایجاد رطوبت بیش از ۹۵ درصد آب مقطر ریخته شد. در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد  $CO_2$  انکوباسیون به‌مدت ۱۵ تا ۱۸ روز انجام شد. سپس خانه‌ها ارزیابی و خانه‌های مثبت به‌عنوان یک امتیاز مثبت و خانه‌های منفی از نظر حضور کلونی بدون امتیاز در نظر گرفته شدند. تعداد LT-CIC در جمعیت بررسی شده با استفاده از روش آماری Maximum Likelihood (Fazekas de St. Groth, 1982) و نرم‌افزار L-Calce™ ارزیابی شد.

### ۳- نتایج

این سلول‌ها پس از جداسازی HSCهای  $CD34+$ ، در محیط ازدیاد HSCs حاوی JMDM، FBS ۱۰ درصد و سایتوکین‌های عمل‌کننده اولیه که قبلاً به آن‌ها اشاره شده است، قرار داده شد. مدت زمان ازدیاد ۸ روز بود. برای بررسی اثر مهار سرکوب بیان ژن TGFbR2 روی میزان ازدیاد HSCs و LT-CIC و همچنین ارزیابی میزان ترانسفکشن، HSCs جدا شده به سه گروه تقسیم شد و ترانسفکشن به‌صورت جداگانه روی آن‌ها انجام شد. گروه اول شامل سلول‌هایی بود که با Stealth™ RNAi علیه TGFbR2 ترانسفکت شدند، گروه دوم گروه کنترل بود که با Stealth™ RNAi Negative Control مواجه شدند و بالاخره گروه سوم که با BLOCK-i™ Alexa Fluor Red مجاور شدند. گروه سوم به‌عنوان کنترل میزان ترانسفکشن در نظر گرفته شد و پس از ۶ تا ۸ ساعت از زمان ترانسفکشن، میزان ترانسفکشن در سلول‌های این گروه با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد. میزان ترانسفکشن پس از بررسی نتایج در HSCهای  $CD34+$  به‌طور میانگین حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد تخمین زده شد

سلول‌های M2-10B4 به تعداد  $3 \times 10^4$  سلول در هر سانتی‌متر مربع در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای که از قبل با ژلاتین پوشانده شده بود کشت داده شدند. پس از همپوشانی به‌مدت ۳ ساعت با مقدار ۲۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از مایتومایسین C (Mitomycin) مجاور شدند. برای تعیین تعداد سلول‌های LT-CIC از شرایط رقت محدود کننده (Limiting Dilution) استفاده شد. بعد از این‌که سلول‌های خون‌ساز روی سلول‌های M2-10B4 غیرفعال شده منتقل شدند، به‌مدت ۵ هفته نگهداری شد. در این مدت از محیط  $\alpha$ MEM دارای  $10^{-5}$  هیدروکورتیزون (Hydrocortisone) (Stemcell Technologies) و حدود ۲۰ درصد سرم به‌عنوان محیط LT-CIC استفاده شد. هر هفته نیمی از محیط تعویض شد. به‌منظور جلوگیری از خشک شدن محیط کشت برخی از خانه‌ها با آب مقطر پر شد. پلیت‌های مربوط به کشت طولانی مدت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با فشار ۵ درصد  $CO_2$  نگهداری شد. برای این آزمون از ۳ رقت ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ عدد سلول کشت داده شده استفاده شد. برای هر رقت حدود ۳۰ بار تکرار در نظر گرفته شد. طی ۳ تا ۴ هفته همه سلول‌های غیر اولیه که از نوع پیش‌سازهای متعهد و نیمه متعهد بودند از دست رفتند و سلول‌هایی که بر جا ماندند از نوع سلول‌های اولیه بودند که توانایی بنیادی داشتند. بعد از اتمام مدت زمان ۵ هفته ابتدا سلول‌های غیرچسبنده برداشت شدند و سپس سلول‌های چسبیده به رده سلولی فیبروبلاست‌های موشی به همراه خود رده سلولی M2-10B4 برداشت شده و به‌عنوان خروجی این آزمون با استفاده از آزمون کلونی‌زایی ارزیابی شدند.

### ۲-۷- آزمون کلونی‌زایی و برداشت محصول

#### آزمون LTC-IC و انتقال آن به محیط کلونی‌زایی

بعد از اتمام ۵ هفته محتویات هر خانه آزمون قبل در داخل یک لوله آزمایش جمع‌آوری و سپس به پلیت‌های جداگانه کلونی‌زایی منتقل شدند. سلول‌ها در داخل لوله‌ها سانتریفیوژ شده و رسوب کف هر لوله در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، ترانسفکشن روز سوم انجام شد و بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت از زمان ترانسفکشن از نظر میزان بیان نسخه RNA (Transcript) RNA *TGFbR2* با استفاده از QRT-PCR ارزیابی شدند و پس از گذشت ۸ روز سلول‌های کشت داده شده از نظر ایمونوفلورسنت با استفاده از فلوسایتمتری و همچنین از نظر عملکردی با استفاده از آزمون کلونی‌زایی و LT-CIC بررسی شدند.

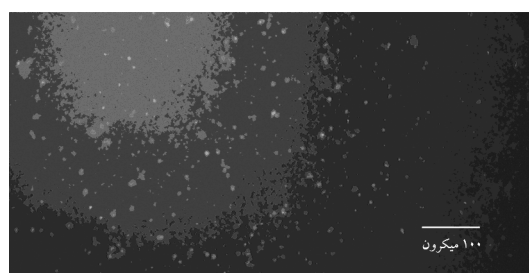
### ۲-۳- آزمون QRT-PCR

از این آزمون برای برآورد تغییرات ایجاد شده در میزان بیان نسخه RNA ژن مورد نظر استفاده شد. پس از ترانسفکشن سلول‌های خون‌ساز بعد از مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت از نظر میزان بیان ترانسکرپت ژن *TGFbR2* ارزیابی شد. میزان بیان ترانسکرپت مورد نظر در دو گروه متفاوت نسبت به سطح ترانسکرپت بتا-اکتین قانونمند شد. نتایج نشان می‌دهد که بیشترین مقدار کاهش بیان ژن حدود ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن حاصل می‌شود. به‌علاوه در مقایسه با گروه کنترل، ۴۰ درصد تا ۵۰ درصد کاهش بیان ژن *TGF-bR2* مشاهده شد.

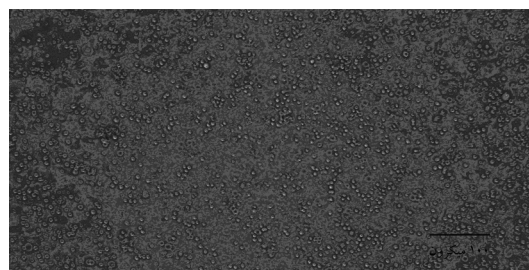
### ۳-۳- بررسی فلوسایتمتری سلول‌های افزون شده در محیط آزمایشگاه (Ex Vivo Expanded) از نظر نشانگرهای CD34

در بررسی حاضر میزان نشانگرهای سطحی CD34 در دو فاصله زمانی روز اول و روز هشتم کشت ارزیابی شد. در هر بار بررسی حدود ۴۰۰۰۰ سلول از محیط کشت برداشت شدند و بعد از پردازش نمونه‌ها با استفاده از آنتی‌بادی‌های بر علیه نشانگر CD34 نشاندار شده با FITC و همچنین ایزوتیپ کنترل نتایج فلوسایتمتری مطالعه شدند. بررسی نتایج آن نشانگر این بود که به‌طور میانگین میزان بیان CD34 در روز اول پس از جداسازی حدود ۸۵ درصد بود و در روز هشتم در

(شکل‌های ۱ و ۲). ترانسفکشن روز سوم پس از جداسازی HSCs انجام شد که علت این موضوع مقاومت سلول‌های خفته در برابر ترانسفکشن است. بنابراین با القای رشد در HSCs با استفاده از محیط کشت ازدیاد HSCs و در حضور سایتوکین‌های اولیه، سلول‌های خون‌ساز اولیه بیشتر مستعد ترانسفکشن شد. ترانسفکشن براساس برنامه آمده در بخش‌های قبلی انجام شد.



شکل ۱ مشاهده HSCs ترانسفکت شده با BLOCK-iT™ Alexa Fluor Red با استفاده از نور ماورای بنفش میکروسکوپ فلورسانس



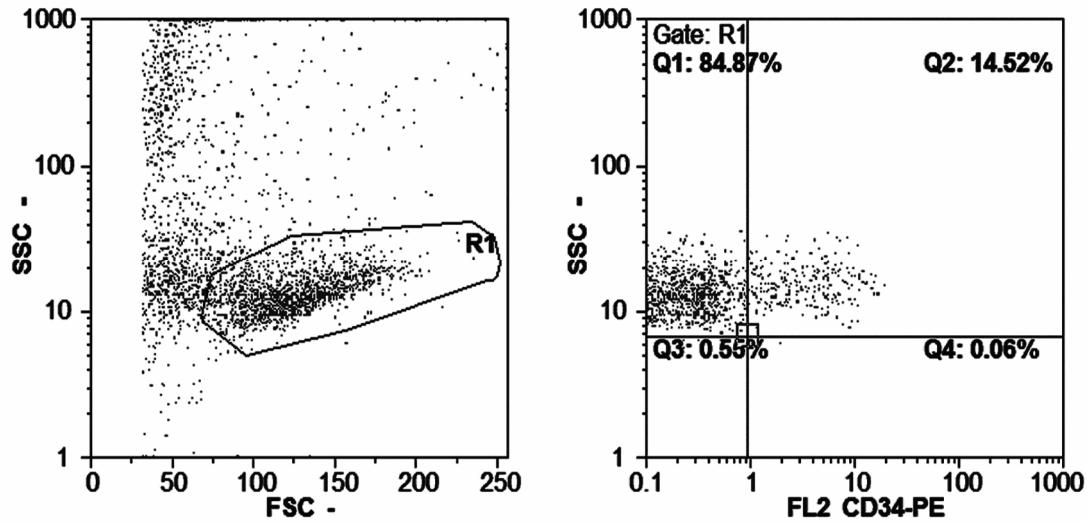
شکل ۲ سلول‌های ترانسفکت شده با BLOCK-iT™ Alexa Fluor Red با نور مرئی میکروسکوپ فلورسانس در همان زمینه قبلی شکل ۱ که نشان‌دهنده موفقیت آمیز بودن ترانسفکشن است.

### ۳-۱- کشت فزون‌سازی HSC (Expansion) های CD34+

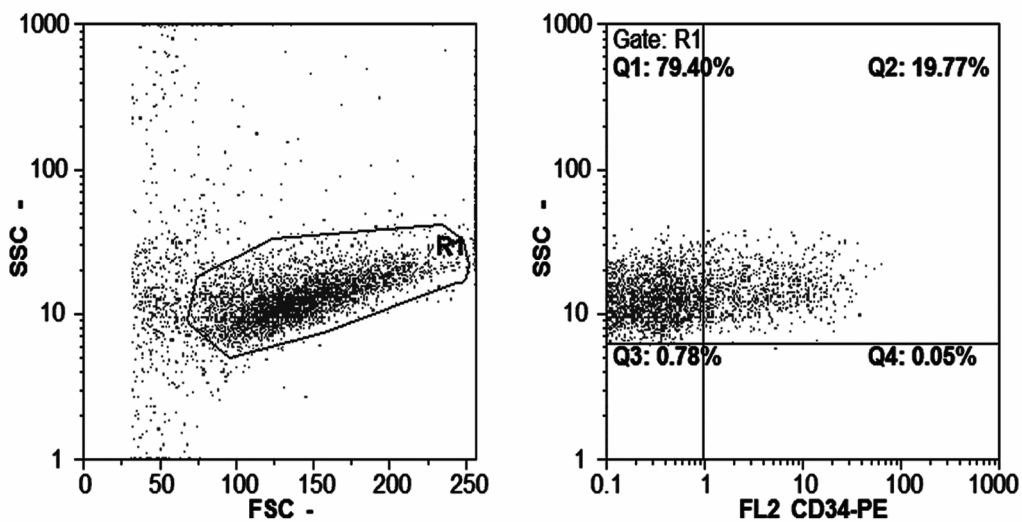
ازدیاد HSCs در دو گروه کنترل (ترانسفکت شده با Stealth™ RNAi Negative Control) و سلول‌های آزمون (ترانسفکت شده با Stealth™ RNAi علیه *TGFbR2*) انجام شد که هر کدام از این گروه‌ها به‌صورت سه‌تایی تکرار شدند.

روز پایان کشت، در گروه کنترل سلول‌های CD34+ پس از اتمام دوره کشت از نظر فنوتیپی ۳/۸ برابر ازدیاد داشتند و گروه آزمون سلول‌های بنیادی CD34+ حدود ۵/۳ برابر ازدیاد داشتند (نمودار ۱).

گروه کنترل به‌طور میانگین ۱۴/۲ درصد (شکل ۳) و در گروه تحت تأثیر قرار گرفته با SiRNA حدود ۱۹/۶ درصد (شکل ۴) CD34+ HSC وجود داشت. با توجه به تعداد اولیه سلول CD34+ در زمان شروع کشت و تعداد سلول‌های CD34+



شکل ۳ نمودار فلوسایتومتری HSCs در گروه کنترل از نظر میزان بروز نشانگر CD34 در سطح سلول‌ها



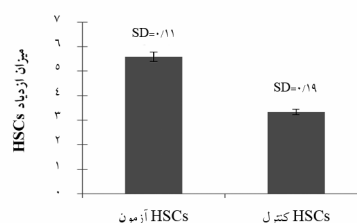
شکل ۴ نمودار فلوسایتومتری HSCs در گروه آزمون از نظر میزان بروز نشانگر CD34 در سطح سلول‌ها



بر افزایش سلول‌های بنیادی اولیه خون‌سازی، از این آزمون استفاده شد. هدف بررسی این مطلب بود که آیا این افزایش جمعیت سلول‌های CD34+ همراه با افزایش تعداد سلول‌های بنیادی اولیه خون‌سازی بوده است یا خیر؟ پس از ازدیاد HSCs در محیط کشت از روز هشتم به بعد به صورت رقت محدود کننده سلول‌های ازدیاد شده به محیط LT-CIC که قبلاً راجع به آن صحبت شد، منتقل شدند. همان‌طور که قبلاً بحث شد سلول‌ها در محیط LT-CIC به مدت ۶ هفته نگهداری شدند. پس از سپری شدن این مدت با ارزیابی‌های صورت گرفته در محیط کلونی‌زایی با استفاده از نرم‌افزار L-Calc™ تعداد سلول‌های بنیادی اولیه محاسبه شد. تعداد LT-CIC در این محیط در سلول‌های تحت تأثیر قرار گرفته با SiRNA حدود ۱ در هر ۶۰۲۴ سلول خون‌ساز با  $P \text{ value} = 0/05$  بود و در گروه کنترل حدود ۱ در هر ۷۳۴۴ با  $P \text{ value} = 0/05$  بود که نشانگر تفاوت قابل توجه بین گروه آزمون و کنترل و نشان دهنده ۱/۲۱ برابر افزایش سلول‌های اولیه خون‌ساز در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل بود.

#### ۴- بحث

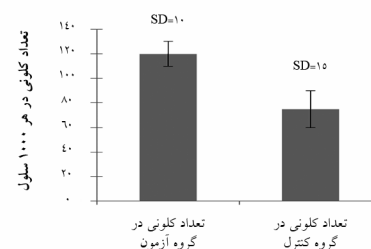
مجموع مطالعات انجام شده روی TGF-b نشان‌دهنده نقش مهم و هنوز ناشناخته این سایتوکین در زیست‌شناسی HSCs در داخل بدن است. برای مثال طی بررسی‌های انجام شده بیان مشابهی از نسخه TGF-b RNA در HSCs در مغز استخوان و در خون محیطی مشاهده شده است، این بیان غیرمتغیر سایتوکین در شرایط ثابت و بدون وابستگی به محل حضور سلول بنیادی نشان دهنده نقش بسیار مهم این سایتوکین در کنترل رفتارهای HSC در داخل بدن است [۲۵]. از سوی دیگر مطالعات جدید بر خلاف گزارش‌های قبلی که نقش این سایتوکاین را در ایجاد حالت خفتگی سلولی رد کرده بود [۲۶]، نشان‌دهنده نقش این سایتوکین در القای حالت خفتگی در بدن است [۲۳]. همچنین در حالی که اطلاعات به دست آمده قبلی بیانگر این بود که مهار



نمودار ۱ میزان ازدیاد HSCs براساس ارزیابی‌های ایمونوفنوتیپی در گروه آزمون و کنترل

#### ۳-۴- آزمون کلونی‌زایی

در گروه‌های آزمون و گروه‌های کنترل بلافاصله پس از کشت ۸ روزه در محیط متوکالت (Methocult)، بررسی‌های کلونی‌زایی انجام شد. به مدت ۲ هفته زمان داده شد تا کلونی‌ها در این محیط نیمه جامد تشکیل شود. این بررسی‌ها نشان داد که تعداد کلونی‌ها به ازای هر ۱۰۰۰ سلول در گروه آزمون با تعداد  $120 \pm 10$  کلونی نسبت به گروه کنترل با تعداد  $70 \pm 15$  کلونی افزایش قابل توجهی داشته است (نمودار ۲). در مقایسه با گروه کنترل که حدود ۴۰ درصد کلونی‌ها اندازه بزرگ داشتند، حدود ۶۵ درصد کلونی‌ها در گروه آزمون بزرگ بودند که نشان دهنده اولیه بودن سلول تشکیل دهنده و بنابراین فراوانی نسبی سلول‌های اولیه خون‌سازی در گروه آزمون نسبت به کنترل بود.



نمودار ۲ تعداد کلونی‌ها در گروه آزمون در مقایسه با گروه کنترل در آزمون کلونی‌زایی

#### ۳-۵- آزمون LT-CIC

برای بررسی آثار سرکوب بیان ژن TGFbR2 و تأثیر آن

آزمایش را از نظر عملکردی نیز ارزیابی نمایند. برای این امر در گام نخست توانایی کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی که به مدت ۸ روز در محیط کشت ازدیاد پیدا کرده بودند، بررسی شد. بررسی‌های کلونی‌زایی نشان داد که در گروه کنترل از هر ۱۰۰۰ سلول حدود  $70 \pm 15$  کلونی تشکیل و در گروه آزمون از هر ۱۰۰۰ سلول  $120 \pm 10$  کلونی تشکیل شده است. این داده‌ها نشان می‌داد که جمعیت سلولی تیمار شده نسبت به کنترل توانایی کلونی‌زایی قوی‌تری را داشتند ولی در این‌جا تفاوت در تعداد کلونی‌ها چشمگیرتر از تفاوت ایمونوفنوتیپی بین گروه کنترل و آزمون بود که احتمالاً دلالت بر توانایی عملکردی بیشتر گروه آزمون نسبت به کنترل داشت. از سوی دیگر؛ همان‌طور که اشاره شد در آزمون کلونی‌زایی در گروه آزمون غلبه با کلونی‌های بزرگ‌تر بود و در گروه کنترل غلبه با کلونی‌های کوچک‌تر بود (حدود ۶۵ درصد کلونی‌ها در گروه آزمون کلونی‌های بزرگ بودند و در گروه کنترل حدود ۴۰ درصد کلونی‌ها اندازه بزرگ داشتند)، که به‌طور ضمنی هم تعداد زیاده‌تر سلول‌های قادر به تشکیل کلونی را نشان می‌داد و هم نشان دهنده اولیه‌تر بودن این سلول‌ها بود. این مطلب می‌تواند به‌طور غیرمستقیم غیرمؤثر بودن کشت سلول‌های بنیادی در شرایط عادی را نشان دهد.

با وجود این‌که نتایج آزمون‌های فلوسایتومتری و کلونی‌زایی نشان‌دهنده اثر بخشی مهار علامت‌دهی مسیر TGF-b در القای فعالیت خود تکثیری سلول‌های بنیادی بود، ولی باز هم نمی‌تواند معیار درستی از تعداد سلول‌های اولیه خون‌سازی که برای مقاصد پیوند مغز استخوان بیشترین اهمیت را دارند، باشد. بنابراین محققان حاضر تصمیم گرفتند تا از میان سلول‌های خون‌ساز CD34+ که مخلوطی از سلول‌های گوناگون از مراحل تمایزی مختلف هستند و از سلول بنیادی خون‌ساز اولیه گرفته تا سلول‌های متعهد به یک رده خاص را شامل می‌شوند، تعداد HSCs اولیه را در گروه‌های آزمون و کنترل ارزیابی نمایند. فراوانی HSCs اولیه با آزمون رقت محدود کننده LT-CIC بررسی شد.

علامت‌دهی این سایتوکین منجر به افزایش سرعت پیوند سلول‌های تزریق شده می‌شود [۱۰]، اطلاعات جدید نشان می‌دهد که در سلول‌های بنیادی به‌دست آمده از مدل‌های فاقد ژن TGF-b این ژن یک تنظیم‌کننده کلیدی خون‌سازی در داخل بدن است و برای لانه‌گزینی این سلول‌ها بسیار حیاتی است و فقدان آن سبب کاهش قابل توجه لانه‌گزینی می‌شود [۲۷]. این یافته‌ها نشان دهنده دشواری بسیار زیاد در تعیین دقیق نقش این سایتوکین در کنترل رفتارهای HSC است. با وجود نقش کلیدی احتمالی این سایتوکین در داخل بدن براساس یافته‌های اخیر، نقش مهاری TGF-b درون‌زاد در مهار فعالیت خود تجدید شونده و کاهش بقای این سلول‌ها و القای تمایز در محیط کشت ثابت شده است. با توجه به نقش‌های اساسی این سایتوکین در عدم موفقیت ازدیاد HSCs با توجه به موارد ذکر شده در بررسی حاضر این پرسش مطرح شد که آیا به‌کارگیری SiRNA برای مهار علامت‌دهی TGF-b می‌تواند منجر به افزایش جمعیت HSCs اولیه و القای فعالیت خود تکثیری آن‌ها شود یا خیر؟ برای بررسی این موضوع در ابتدا از ارزیابی‌های فنوتیپی فلوسایتومتری برای بررسی اولیه بودن یا نبودن این سلول‌ها استفاده شد. در گام بعدی با آزمون‌های کلونی‌زایی قبل و بعد از آزمون LT-CIC، اولیه بودن یا نبودن HSCs از نظر عملکردی بررسی شد. در این مطالعه از مهار موقتی مسیر علامت‌دهی TGF-b استفاده شد که دلیل آن استعداد سلول‌های غیر پاسخ دهنده به TGF-b برای ترانسفورماسیون (Transformation) بدخیم از نوع میلوئید (Myeloid) و لنفوئید (Lymphoid) بود [۲۸-۳۱].

نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های فلوسایتومتری نشان دهنده افزایش حدود ۵ درصدی بروز نشانگر CD34 در سطح گروه آزمون، که فعالیت مسیر علامت‌دهی TGF-b در آن‌ها مهار شده، نسبت به گروه کنترل بود. از آنجایی که برآوردهای ایمونوفنوتیپیک بیانگر افزایش HSCs در گروه آزمون نسبت به کنترل بود، محققان حاضر تصمیم گرفتند تا سلول‌های مورد

مشاهده شد که نشان‌دهنده تأثیر مهار علامت‌دهی TGF-b1 بر میزان بروز این نشانگر سطحی بود. مطالعات قبلی باتارد و همکاران نیز نشان دهنده تأثیر حضور این سایتوکین در نگهداری سلول‌های بنیادی در حالت اولیه است ولی براساس نتایج مطالعه حاضر، با مهار این مسیر در گروه آزمون تعداد LT-CIC بیشتری نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود. این افزایش تعداد LT-CIC می‌تواند به علت افزایش پاسخ‌دهی HSCs به فاکتورهای رشد خون‌سازی و سایتوکین‌های عمل‌کننده اولیه و همچنین برداشته شدن اثر مهار از روی چرخه سلولی باشد [۲۳].

در مطالعات قبلی از آنتی‌بادی خنثی‌کننده TGF-b1 یا TGFb2 یا از DNA مداخله‌گر برای مهار اثر TGF-b1 درون‌زاد استفاده شد، ولی در هر دوی این بررسی‌ها فقط به بررسی‌های کلونی‌زایی اولیه اکتفا شد. در این مطالعه تأثیر این مداخله بر سلول‌های LT-CIC انجام شد که اهمیت بسیار بیشتری را در نشان دادن موفقیت ازدیاد HSCs با این روش خواهد داشت. همچنین در این مطالعه از روش جدیدتر و کارآمدتر مهار بیان نسخه RNA که همان SiRNA است استفاده شد. در مطالعات کلونی‌زایی بررسی حاضر در گروه آزمون غلبه با کلونی‌های با سایز بزرگ‌تر بود که با نتایج به‌دست آمده توسط فورتونل (Fortunel) و همکارانش همخوانی داشت. در بررسی انجام شده توسط این گروه‌ها فقط بر مبنای تشکیل کلونی‌های بزرگ‌تر از کلونی‌های کوچک‌تر این دو نوع سلول را از هم جدا کردند که نمی‌تواند معیار درستی برای تفکیک سلول‌های اولیه از سلول‌های بالغ باشد، در صورتی که در بررسی حاضر از آزمون LT-CIC برای تفکیک این دو سلول از هم استفاده شد [۳۳]. در مطالعه حاضر با مهار موقتی علامت‌دهی مسیر TGF-b نشان داده شد که مهار این مسیر می‌تواند در رسیدن به شرایط مطلوب ازدیاد HSCs کمک شایانی نماید. در مجموع به نظر می‌رسد که ازدیاد HSCs با استفاده از روش‌هایی که در آن‌ها فقط به عوامل تنظیمی

نتایج به‌دست آمده از آزمون LT-CIC تفاوت قابل توجهی را بین گروه کنترل و آزمون نشان می‌داد. ولی چنانچه نتایج آزمون LT-CIC با نتایج آزمون کلونی‌زایی مقایسه شود، مشخص می‌شود که گروه تیمار شده با SiRNA مهارکننده مسیر TGF-b در آزمون کلونی‌زایی، تعداد بسیار بیشتری کلونی را در مقایسه با گروه کنترل داشتند و چنانچه این یافته‌ها در برابر نتایج به‌دست آمده از آزمون LT-CIC قرار داده شود مشخص می‌شود که در آن‌جا تفاوت بین گروه آزمون و کنترل کمتر است که به نظر می‌رسد به‌خاطر موقتی بودن اثر تیمار انجام شده بوده است و با توجه به این‌که محققان حاضر می‌دانستند که بیان TGF-b همچنان در محیط LT-CIC وجود دارد [۳۲]، احتمالاً حضور این سایتوکین در محیط LT-CIC می‌تواند دلیل تفاوت قابل توجه بین نتایج آزمون کلونی‌زایی و LT-CIC باشد. اما دلیل تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل و آزمون در آزمون LT-CIC احتمالاً به این دلیل است که از همان ابتدا در گروه آزمون تعداد بیشتری سلول‌های بنیادی اولیه خون‌ساز در مخلوط سلولی که برای آزمون LT-CIC به‌کار رفت، نسبت به کنترل وجود داشته است.

با وجود گزارش‌های مطرح شده توسط باتارد (Batard) و همکارانش مبنی بر این‌که HSC TGF-b ها را در محیط کشت در حالت اولیه نگه می‌دارد و موجب افزایش بروز و محافظت نشانگر سطحی CD34 طی کشت HSCs می‌شود [۹]، نتایج بررسی حاضر این موضوع را تأیید نمی‌نماید. از یک سو شمارش سلولی در گروه کنترل پس از هشتمین روز در گروه آزمون بالاتر از گروه کنترل بود که این موضوع بیانگر برداشته شدن مهار چرخه سلولی از روی سلول‌هاست و از سوی دیگر؛ در بررسی انجام شده توسط محققان حاضر از نظر فنوتیپی بروز آنتی‌ژن CD34 در روز اول به‌طور میانگین ۸۵ درصد بود که پس از ۸ روز کشت در گروه آزمون که مسیر علامت‌دهی TGF-b در آن‌ها مهار شده بود، به‌طور میانگین حدود ۱۹/۶ درصد و در گروه کنترل به‌طور میانگین حدود ۱۴/۲ درصد

## ۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل از پایان‌نامه دکتری گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس بوده و با حمایت مالی سازمان انتقال خون ایران و دانشگاه متبوع به انجام رسیده است. نویسندگان از سرکار خانم رعوفی (بیمارستان شریعتی) و جناب آقای دکتر عسگریان (بخش فلوسایتومتری آزمایشگاه نور) که همکاری صمیمانه‌ای در انجام این تحقیق داشتند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

مثبت توجه می‌شود، به تنهایی کارآمد نیست و برای رسیدن به شرایط بهینه ازدیاد HSCs توجه همزمان به عوامل مهار کننده موجود در محیط کشت سلول‌های خون‌سازی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است و مهار آن‌ها در کنار حضور عوامل تحریک کننده تکثیر خود تجدید شونده HSCs می‌تواند در رسیدن به شرایط مطلوب ازدیاد HSCs در محیط آزمایشگاه دارای اهمیت باشد.

## ۶- 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 hematopoietic 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-Joffé 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

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

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