بسم الله
الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان

تکثیر سلولهای بنیادی خونساز خون بند ناف بر روی بسترهای نانوالیاف زیست سازگار بصورت همکشتی با سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

نگارش

مجید مختاری

استاد راهنما

دکتر امیر آتشی

استاد مشاور

دکتر مسعود سلیمانی

شهریور ۱۳۹۲

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از
پایان‌نامه کارشناسی ارشد

آقای مجید مختاری رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان « تکثیر سلولهای بنیادی خونساز خون بند ناف بر روی بسترهای نانوالیاف زیست سازگار به صورت همکشتی با سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان » در تاریخ ۱۳۹۲/۶/۱۳ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر امیر آتشی (استاد راهنما)

دکتر مسعود سلیمانی (استاد مشاور)

دکتر یوسف مرتضوی (استاد ناظر)

دکتر سعید کاویانی جبلی (استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهش‌های علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آن‌ها متعلق به دانشگاه می‌باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می‌باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

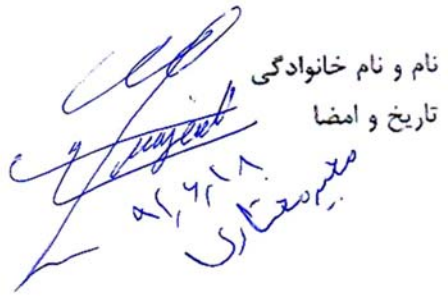
ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ

۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **مجید مختاری** دانشجوی رشته **خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون** ورودی سال تحصیلی **۱۳۹۰** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا



آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون است که در سال ۱۳۹۲ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر امیر آتشی، مشاوره دکتر مسعود سلیمانی از آن دفاع شده است.

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب مجید مختاری دانشجوی رشته خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

۹۶/۱۰/۱۸

تقدیم به:

آنکه خود را نادیده گرفت تا فقط مرا ببیند

"مادرم"

و پدر،خواهر و برادر عزیزم که همواره انگیزه و قوت قلب من در زندگی بوده اند.

و

عزیزانی که خود را قدردان و سپاسگزار ایشان می دانم:

دکترهومن وثوق و تورج روح افزا

تشکر و قدردانی

با تقدیر و تشکر فراوان از اساتید ارجمند که مرا برای همیشه مرهون خود گرداندند:

- جناب آقای دکتر امیر آتشی استاد راهنمای محترم و جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی استاد مشاور محترم که باصداقتی بی شائبه در تمام مراحل به ثمر رساندن این رساله مرا راهنمایی و یاری فرمودند.
- همچنین از اساتید محترم گروه هماتولوژی آقایان دکتر سعید آبرون و دکتر سعید کاویانی کمال تشکر را دارم.
- از عزیزانی که در این امر مهم اینجانب را یاری نموده‌اند، نهایت تقدیر و تشکر را دارم: آقایان محمدرضا مهرابی،مجید مصاحبی، محمد حسین مقدسی، ، مهدی آزاد، ناصر مبرا و خانم‌هافاطمه اسکندری، مائده مشهدی خان،بهناز اسفندیاری وعارفه جعفریان.
- همچنین از دوستانی که در شرکت فن‌آوری بن یاخته همواره به اینجانب لطف داشتند، سپاسگزارم: خانم‌ها میرزایی،پهلوان و دودل.
- از عزیزانی که در بخش بانک خون بند ناف سازمان انتقال خون ایران با بنده همکاری داشتند ، سرکار خانم دکتر مهین نیکوگفتار و خانم الهام مطیع و خانم قاجار سپاسگذارم.
- از همکلاسی‌های عزیزم آقای امیر اله وردی و خانمها محمد علی، عجمی،زمانی،اسماعیلی،محمودی ، پرهیزکار و همچنین کارشناس گروه هماتولوژی، خانم شوکتی و سایر دوستانم در گروه هماتولوژی کمال تشکر را دارم.
- نهایتا از تمامی همکاران عزیزم درآزمایشگاه بیمارستان بوعلی تهران که در طول دوران تحصیلم نهایت همدلی و همکاری را با بنده داشته اند بی نهایت سپاسگذارم.

توفیق رفیقشان باد

چکیده

پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز یک روش درمانی برای بدخیمی‌های خونی و ناسازگاری‌های مغز استخوان می‌باشد. خون بند ناف به عنوان یک منبع جایگزین برای بدست آوردن سلول‌های بنیادین خون‌ساز در پیوند آلوژنیک مورد استفاده قرار می‌گیرد و اکثر مشکلات ناشی از ناسازگاری HLA و همچنین GVHD را بدلیل کمتر بودن لنفوسیت‌های T برطرف می‌سازد. محدودیت‌های استفاده از خون بندناف، مقدار کم سلول‌های بنیادی پیش‌ساز هماتوپوئتیک به دلیل حجم کم خون بند ناف است. بنابراین سیستم‌های تکثیر سلول‌های بنیادی پیش‌ساز هماتوپوئتیک در شرایط Ex vivo درصدد غلبه بر این مشکل می‌باشند. هدف از این سیستم‌ها تولید کافی سلول‌های بنیادی پیش‌ساز هماتوپوئتیکی است، که توانایی پیوند و خون‌سازی طولانی مدت را داشته باشند. روش متداول تکثیر سلول‌های بنیادی پیش‌ساز هماتوپوئتیک (سلول‌های $CD34^+$) کشت در محیط دو بعدی مایع است و تنها اثر سایتوکاین‌های مختلف را بر روی سلول‌های بنیادی پیش‌ساز هماتوپوئتیک فراهم می‌آورد، در حالیکه فرآیندهای تماس سلول‌های $CD34^+$ با ماتریکس،سلولهای استرومال، مهاجرت، چسبندگی و ویژگی‌های توپوگرافی سه بعدی مغز استخوان و سیگنال‌های اتوکرین و پاراکرین موثر بر سلول‌ها را فراهم نمی‌آورد. با استفاده از مواد زیستی مصنوعی از جمله نانو فیبرهای ساخته شده از پلیمر پلی اتر سولفون در جهت تولید niche های مصنوعی که ویژگی سه بعدی، شیمیایی، مکانیکی این نانو فیبرها موجب فعال شدن سیگنال‌های چسبندگی، تکثیری، تمایزی و مهاجرت سلول‌های $CD34^+$ با بیشترین شباهت به ریزمحیط طبیعی مغز استخوان می‌شود می توان این شرایط را بهبود بخشید. با توجه به نقش مهم سلولهای رده مزانشیمی در سرنوشت سلول بنیادی خونساز در مغز استخوان از طریق تولید فاکتورهای ترشحی مختلف و همچنین ارتباطات سلول-سلول، در این تحقیق از سلولهای بنیادی مزانشیمی متصل به سطح زیرین بسترهای نانوالیاف جهت تامین نقش حمایتی آنها در محیط سه بعدی بر تکثیر سلول بنیادی خونساز استفاده گردید.نتایج این مطالعه امکانپذیر بودن استفاده از این سیستم را جهت تکثیر با حداقل تمایز سلولهای $CD34^+$ اثبات نمود ومطالعات بیشتر به منظور بررسی شاخصه های مورد نیاز در پیوند سلولهای بنیادی و افزایش قابلیتهای کسب شده دراین سیستم را پیشنهاد می نماید.

واژگان کلیدی: خون بند ناف،سلول‌های $CD34^+$،محیط سه‌بعدی،نانوفیبر،پلی‌اترسولفون،سلولهای بنیادی مزانشیمی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲. تاریخچه و اساس پیوند خون بندناف ۳

۱-۳. سلول‌های بنیادی خون‌ساز ۵

۱-۳-۱. مارکر سطحی CD34 ..... ۷

۱-۳-۲. مارکر سطحی CD133 ..... ۸

۱-۴. سلولهای بنیادی مزانشیمی ۹

۱-۴-۱ . نقش سلولهای بنیادی مزانشیمی در خونسازی ۱۰

۱-۵. ماتریکس خارج سلولی ۱۱

۱-۵-۱. پروتئوگلیکان‌ها ۱۱

۱-۵-۲. فیبرونکتین ۱۲

۱-۵-۳. تناسین ۱۳

۱-۵-۴. کلاژن ۱۴

۱-۵-۵. لامینین ۱۴

۱-۶. مهندسی بافت ۱۵

۱-۶-۱. تاریخچه مهندسی بافت ۱۷

۱-۶-۲. نیروی انسانی و تجهیزات مورد نیاز در مهندسی بافت ۱۸

۱-۶-۳. اهمیت استفاده از داربست در مهندسی بافت ۱۸

۱-۶-۴. داربست مناسب برای مهندسی بافت ۱۹

۱-۶-۵. انواع داربست ۲۰

۱-۷. نانو الیاف ۲۱

۱-۷-۱. ویژگی‌های نانوالیاف ۲۲

۱-۸. روش‌های تولید نانو الیاف ۲۳

۱-۸-۱. مزیت الکتروریسی نسبت به سایر روش‌ها ۲۴

۱-۸-۲. اصول فرایند الکتروریسی ۲۴

۱-۸-۳.عوامل موثر بر فرایند الکتروریسی ۲۶

۱-۸-۳-۱. خواص محلول ۲۶

۱-۸-۳-۱-۱. کشش سطحی ۲۶

۱-۸-۳-۱-۲. رسانایی الکتریکی ۲۶

۱-۸-۳-۱-۳. ویسکوزیته‌ی محلول پلیمری ۲۶
۱-۸-۳-۱-۴. غلظت محلول پلیمری ۲۶
۱-۸-۳-۲. عوامل فرایندی ۲۷
۱-۸-۳-۲-۱. شدت جریان ۲۷
۱-۸-۳-۲-۲. فاصله‌ی نازل تا جمع کننده ۲۷
۱-۸-۳-۲-۳. نوع جمع کننده ۲۷
۱-۸-۳-۳. عوامل محیطی ۲۸
۱-۸-۳-۳-۱. رطوبت ۲۸
۱-۸-۳-۳-۲. دما ۲۸
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲۹
۲-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۳۰
۲-۱-۱. وسایل مورد نیاز ۳۰
۲-۱-۲- مواد مصرفی ۳۱
۲-۲. آماده‌سازی مواد و بافرهای مورد نیاز ۳۲
۲-۲-۱. تهیه PBS بدون یون‌های کلسیم و منیزیم ۳۲
۲-۲-۲. آماده‌سازی PBS حاوی EDTA ۳۳
۲-۲-۳. تهیه و آماده‌سازی فاکتورهای رشد ۳۳
۲-۲-۳-۱. تهیه Stock فاکتور رشد SCF ۳۳
۲-۲-۳-۲. تهیه Stock فاکتور رشد TPO ۳۴
۲-۲-۳-۳. تهیه Stock فاکتور رشد FLT3-L ۳۴
۲-۳. مراحل جداسازی سلول‌های $CD34^+$ ۳۴
۲-۳-۱. جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از خون بند ناف ۳۴
۲-۳-۲. جداسازی سلول‌های $CD34^+$ از سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از بند ناف ۳۵
۲-۳-۳. شمارش سلول‌ها ۳۶
۲-۴. تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۳۶
۲-۵. تائید مارکر CD34 سلول‌های جدا شده از خون بندناف ۳۶
۲-۶. کشت سلولهای CD34 در چهار وضعیت مورد مطالعه ۳۷
۲-۶-۱. کاشت سلول بنیادی مزانشیمی بر روی داربست(3D) و کف پلیت(2D) ۳۷
۲-۶-۲.کشت سلولها در محیط دو بعدی ۳۷
۲-۶-۳. کشت سلولها در محیط سه بعدی ۳۷
۲-۶-۴. آماده‌سازی داربست ۳۸
۲-۶-۴-۱. ریسندگی الکتریکی ۳۸

۲-۶-۴-۲. تنظیمات بهینه‌ی عوامل فرایندی ۳۸
۲-۶-۴-۳. تهیه داربست و آزمون‌های مربوط به آن ۳۹
۲-۶-۴-۴. اصلاح سطحی با پلاسما ۳۹
۲-۶-۴-۵. بررسی قدرت آب‌دوستی داربست‌ها ۴۰
۲-۷. سترون کردن داربست‌ها ۴۰
۲-۸. آماده‌سازی نمونه جهت بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی ۴۰
۲-۹.بررسی بیان مارکر CD34 توسط فلوسایتومتری ۴۵
۲-۱۰. تست‌های تاییدی در تایید کلنی‌ها ۴۵
۲-۱۰-۱. تست سنجش کلنی ۴۵
۲-۱۱. آنالیز آماری نتایج ۴۵
فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۴۶
۳-۱. نتایج حاصل از جداسازی سلول‌های $CD34^{+}$ از خون بند ناف ۴۷
۳-۲ . نتایج آزمون‌های خواص فیزیکی داربست‌ها ۴۸
۳-۲-۱. شکل شناسی داربست‌ها ۴۸
۳-۳. نتایج حاصل از کشت سلول‌های $CD34^{+}$ در چهار وضعیت مورد مطالعه: محیط دو بعدی (2D)، سه بعدی(3D) ،محیط دو بعدی بصورت همکشتی با سلول بنیادی مزانشیمی (2D-Co) و سه بعدی بصورت همکشتی با سلول بنیادی مزانشیمی(3D-Co) ۴۹
۳-۳-۱. سلول‌های کشت شده در محیط دو بعدی (2D) ۴۹
۳-۳-۲. سلول‌های کشت شده در محیط دو بعدی بصورت همکشتی با سلولهای بنیادی مزانشیمی (2D-Co) ۴۹
۳-۳-۳. سلول‌های کشت شده در محیط سه بعدی (3D) ۵۰
۳-۳-۴. سلول‌های کشت شده در محیط سه بعدی بصورت همکشتی با سلولهای بنیادی مزانشیمی (3D-Co) ۵۱
۳-۴. بررسی درصد بیان مارکر CD34 در سلول‌های کشت شده در چهار وضعیت مورد مطالعه به روش فلوسایتومتری ۵۴
۳-۵. نتایج حاصل سنجش کلنی ۵۷
فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۶۱
۴-۱. بحث، نتیجه‌گیری ۶۲
۴-۲. پیشنهادها ۶۹
فهرست منابع و مآخذ ۷۰
چکیده لاتین ۸۳

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱ آماده‌سازی PBS ۳۳
جدول ۳-۱ تعداد سلول‌های شمارش شده در روزهای مختلف ۵۳
جدول۳-۲ درصد بیان مارکر CD34 در روزهای مختلف ۵۴
جدول۳-۳ تعداد کلنی‌های شمارش شده در روزهای مختلف را نشان می‌دهد ۵۹

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ عوامل موثر روی سلول بنیادی خونساز در نیچ مغز استخوان) ۱۰
شکل۱-۲ فرآیند الکتروریسی ۲۵
شکل۲-۱ سامانه‌ی الکتروریسی استفاده شده در این پژوهش ۳۹
شکل۳-۱ نتیجه حاصل از بررسی سلول‌های جدا شده به روش MACS از نظر بیان مارکر CD 34. ۴۷
شکل۳-۲ تصاویر میکروسکوپ الکترونی پویشی داربست‌های نانو فیبری پلی اتر سولفون ۴۸
شکل ۳-۳ سلول‌های $CD34^{+}$ تکثیر یافته در محیط کشت دو بعدی با بزرگنمایی ۱۰۰۰× ۴۹
شکل۳-۴ سلول‌های $CD34^{+}$ تکثیر یافته در محیط کشت دو بعدی بصورت همکشتی با سلولهای بنیادی مزانشیمی با بزرگنمایی ۱۰۰۰× ۵۰
شکل ۳-۵ تصویر سلول‌های موجود در نانوفیبرتوسط میکروسکوپ الکترونی .الف)روز ۵ کشت. ب)روز ۱۰ کشت ۵۱
شکل۳-۶ تصویر سلولهای بنیادی مزانشیمی در سطح زیرین داربست توسط میکروسکوپ الکترونی.. ۵۲
شکل۳- ۷ تصویر سلول‌های موجود در 3D-Co توسط میکروسکوپ الکترونی. الف)روز ۵ کشت. ب)روز ۱۰ کشت ۵۲
شکل ۳-۸ نتایج بررسی میزان بیان CD34 در سلول‌های کشت شده در چهار وضعیت مورد مطالعه به روش فلوسایتومتری روز پنجم ۵۵
شکل ۳-۹ نتایج بررسی میزان بیان CD34 در سلول‌های کشت شده در چهار وضعیت مورد مطالعه به روش فلوسایتومتری روز دهم ۵۶
شکل ۳-۱۰ کلنی اریتروییدی حاصل از کشت سلول CD34 ..... ۵۸
شکل۳-۱۱ کلنی CFU.GEMM حاصل از کشت سلول CD34 ..... ۵۸
شکل ۳-۱۲ کلنیCFU. GMحاصل از کشت سلول CD34 ..... ۵۹

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۳-۱ آنالیز آماری مربوط به شمارش سلولی ۵۳
نمودار۳-۲ آنالیز آماری مربوط به بررسی مارکرCD34 ..... ۵۷
نمودار ۳-۳ نمودار مربوط به آنالیز شمارش کلنی. ۶۰

فصل اول:

مقدمه و مروری بر

مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه

امروزه پیوند مغز استخوان[1] یک روش درمانی مناسب برای بسیاری از بدخیمی‌های خونی و سندرم‌های نارسایی مادرزادی و اکتسابی مغز استخوان به حساب می‌آید. در دهه‌ی ۵۰ تا ۶۰ میلادی پیوند مغز استخوان به صورت تزریق داخل وریدی کل مغز استخوان انجام می‌شد، اما پس از شناسایی سلول‌های بنیادی خون‌ساز در سال ۱۹۹۰ که کسب جایزه‌ی نوبل را برای ای.دونال توماس[2] به همراه داشت، تنها از این سلول‌ها برای انجام پیوند استفاده شد[۱].

این پیوند به دو صورت انجام می‌گیرد:

۱. اتولوگ: در این روش سلول‌های بنیادی خون‌ساز از خود فرد بیمار گرفته می‌شود.

۲. آلوژنیک: در روش آلوژنیک، سلول‌های بنیادی خون‌ساز از فرد سالم اهداکننده دریافت شده و به فرد بیمار پیوند زده می‌شود[۲].

برای انجام پیوند، سلول‌های بنیادی یا پیش‌ساز خونی[3] مورد نیاز است که از نظر مارکرهای سلولی دارای شاخص‌های سطحی CD34،CD113، CD133، CD117، CD40، CD146، CD166 و KDR می‌باشند. این سلول‌ها تمایز نیافته بوده و توانایی خود تکثیری دارند اما با منفی شدن KDR، این توانایی را از دست می‌دهند[۳].

سلول‌های بنیادی خون‌ساز که در پیوند مورد استفاده قرار می‌گیرند، از سه منبع قابل دسترسی هستند:

1- Bone Marrow Transplantation
2- E.Donnall Thomas
3- Haematopoietic Stem / Progenitor Cells

۱. مغز استخوان[1]

۲. خون محیطی[2]

۳. خون بند ناف[3]

از بین این سه منبع، خون بند ناف منبعی سالم و ایمن از سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌تواند باشد.

۱-۲. تاریخچه و اساس پیوند خون بندناف

در سال ۱۹۷۴، ناتزون[4] برای اولین بار خون بند ناف را به عنوان منبع سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک جهت بازسازی عملکرد مغز استخوان در انسان معرفی کرد. یافته‌های او نشان دادند تعداد سلول‌های تشکیل دهنده کلنی در کشت‌های خون بند ناف در مقایسه با خون محیطی افزایش قابل توجه‌ای دارد[۴] .مشاهدات بروکس‌میر[5] و همکارا نش در اوایل دهه ۱۹۸۰ نشان داد که خون بند ناف نوزادان ترم و نارس دارای میزان قابل توجه‌ای سلول‌های پروژنیتور اولیه و متعهد در مقایسه با خون محیطی بالغین است. تعداد CFU-GM و CFU-GEMM و همچنین توانایی تکثیر آن‌ها در خون بند ناف نوزاد ترم نسبت به خون محیطی بالغین افزایش داشت. همچنین تعداد CFU-Meg نیز در مقایسه با خون محیطی بالغین بیشتر بود. آن‌ها مشاهده نمودند که تکثیر ۱۴ روزه سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف که با IL-11 و G-CSF تحریک شدند به میزان قابل توجه‌ای بیشتر از تعداد سلول‌های $CD34^+$ مغز استخوان بود(۸۰ برابر)[۵]. در تحقیقی دیگر نشان داده شد که سلول‌های $CD34^+/CD38^-$ خون بند ناف توانایی تشکیل کلنی بیشتری نسبت به همان فنوتیپ در مغز استخوان بالغین دارد. این سلول‌ها در خون بند ناف نسبت به مغز استخوان در پاسخ به تحریک توسط سایتوکاین‌هایی نظیر IL-3، IL-6 و SCF سریعتر تکثیر شده و ۷ برابر بیشتر سلول تولید می‌کنند[۶]. اولین پیوند خون بند ناف در سال ۱۹۸۸ جهت درمان کودکی که مبتلا به آنمی فانکونی شدید بود انجام شد. خون بند ناف از خواهر کودک مبتلا تهیه شد که از نظر HLA با یکدیگر سازگار بودند[۷]. بعد از آن، بانک‌های خون بند ناف در سرتاسر جهان برای پیوند UCB خویشاوند و

1- Bone Marrow
2- Peripheral Blood
3- Umbilical Cord Blood
4- Knutdzon
5- Broxmeyer

غیرخویشاوند بوجود آمدند. تخمین زده می‌شود که بیش از ۷۰۰۰۰ واحد UCB توسط این بانک‌ها جمع‌آوری، آزمایش و منجمد شده‌اند و تاکنون بیش از ۲۰۰۰ بیمار تحت عمل پیوند UCB قرار گرفته‌اند.خون بند ناف به عنوان منبعی مشروع از سلول‌های بنیادی خون‌ساز جهت پیوند به حساب می‌آید. خون بند ناف برای درمان بیش از ۱۴۰۰۰ بیمار با اختلالات بدخیم و غیر بدخیم مورد استفاده قرار می‌گیرد [۸]. سلول‌های بنیادی خون بند ناف قادر به تولید بافت‌های خون‌ساز، اپی‌تلیال، اندوتلیال و عصبی در شرایط آزمایشگاه و بدن می‌باشد. بنابراین، خون بند ناف، قادر به درمان طیف وسیعی از بیماری‌های قلبی – عروقی، ارتوپدی، عصبی و اندوکرین می‌باشد. نشان داده شده است سلول‌های بنیادی خون‌ساز بازسازی بافت‌های متعددی را هنگامی‌که به انسان و حیوان تزریق می‌گردد، دارا می‌باشند [۹]. با این حال خون بند ناف معایبی در مقایسه با دیگر منابع سلولی دارد، که آن از جمله می‌توان به افزایش خطر عود بیماری به علت کاهش احتمال بیماری پیوند علیه میزبان[1]، احتمال بیشتر انتقال بیماری‌های ژنتیکی به علت نابالغ بودن سلول‌های بنیادی و وجود تعداد ناکافی سلول‌های بنیادی مورد نیاز بیماران بالغ اشاره کرد. اما با توجه به مزایای فراوان خون بند ناف شامل دسترسی سریع و آسان، فقدان خطر برای اهداکننده پیوند، احتمال خطر بسیار کم در مورد انتقال بیماری‌های عفونی از جمله CMV و EBV، نیاز کمتر به سازگاری HLA و کاهش احتمال GVHD حاد [۱۰]. می‌تواند به عنوان جایگزین مناسب سلول‌های بنیادی جهت بازسازی مغز استخوان در بیمارانی که اهداکننده خویشاوند مناسب در اختیار ندارند، مورد استفاده قرار گیرد[۱۱].

همانطور که گفته شد، تعداد کل سلول‌هایی که از خون بند ناف به دست می‌آید در مقایسه با مغز استخوان و خون محیطی، در سطح کمتری بوده و چون دوز ایده‌آل برای سلول‌های هسته دار جهت تزریق به فرد گیرنده ۳.۷×۱۰^{۷} به ازای هر کیلوگرم وزن فرد گیرنده است. لذا اغلب بیماران پیوند شده با سلول‌های حاصل از خون بند ناف را کودکان تشکیل می‌دهند و در استفاده از این منبع برای بالغین با محدودیت مواجه هستیم [۱۲]. پیوند آلوژنیک با خون بند ناف در بالغین عمدتا به علت دوز پایین سلول‌های CD34 یا CD133 دارای محدودیت‌هایی است، به طوری که تعداد اندک سلول‌های بنیادی در این نمونه‌ها به صورت مانعی مهم می‌باشد [۱۳].برای غلبه بر این مشکل چندین

1- Graft Versus Host Disease(GVHD)

راه ارایه گردیده است:

۱. پیوند همزمان چندین واحد خون بند ناف

۲. تزریق همزمان سلول‌های CD34 خون بند ناف با دوز کم همراه با سلول‌های استرومال مغز استخوان خود بیمار یا فرد اهدا کننده[۱۴].

۳. تکثیر برون تنی سلول‌های CD34 خون بند ناف و سپس تزریق سلول‌های تکثیر شده [۱۵].در این زمینه کارهای زیادی ارایه شده که عبارتند از:

۳-۱. روش‌های کشت معمولی دو بعدی، با یا بدون سایتوکاین اگزوژن.

۳-۲. روش‌های کشت به صورت هم کشتی با سلول‌های استرومال، با یا بدون سایتوکاین اگزوژن که این روش، خود شامل چهار سیستم می‌باشد[۱۶]:

۳-۲-۱. سیستم کشت دکستر در فلاسک‌های کشت دو بعدی و بر روی سلول‌های استرومال مغز استخوان، در حضور هیدروکورتیزون و سرم اسبی.

۳-۲-۲. سیستم کشت با افزودن ترکیب سیتوکاین‌ها به محیط حاوی سلول‌های استرومال.

۳-۲-۳. سیتم کشت جدا شده با غشای نیمه تراوا.

۳-۲-۴. کشت سه بعدی سلول‌های بنیادی خون‌ساز.

۴. دستکاری ژنتیکی سلول‌های بنیادی جهت افزایش توانایی خود تجدید شوندگی و تزاید این سلول‌ها[۱۳، ۱۴].

۱-۳. سلول‌های بنیادی خون‌ساز

سلول‌های بالغ خون دوره زندگی محدودی دارند و مدام توسط تکثیر و تمایز جمعیت خیلی کوچکی از سلول‌های بنیادی پرظرفیتی خون‌ساز جایگزین می‌شود .این سلول‌ها در درجه اول در مغز استخوان بالغین سالم یافت می‌شوند. سلول‌های بنیادی خون‌ساز، پروژنیتورهای نادری هستند. اکثر این سلول‌ها در حالت خاموش به سر می‌برند و فقط تعداد کمی از آن‌ها وارد سیکل سلولی شده و تکثیر و تمایز می‌یابند. اگر چه در موارد استر س‌های هماتوپوئتیک نظیر عفونت، خونریزی حاد و یا شیمی درمانی تکثیر این سلول‌ها افزایش می‌یابد. از خصوصیات مهم این سلول‌ها، توانایی خودنوسازی آنهاست به