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 نانو الیاف زیست سازگار

نگارش

فاطمه اسکندری

استاد راهنما

دکتر مسعود سلیمانی

استاد مشاور

دکتر سعید آبرون

تابستان ۱۳۹۱

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

خانم فاطمه اسکندری رشته **خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون** پایان‌نامه **کارشناسی ارشد** خود را با عنوان « **تکثیر سلولهای بنیادی خونساز خون بندناف بر روی بسترهای نانوالیاف زیست سازگار** » در تاریخ **۱۳۹۱/۴/۱۴** 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 مسعود سلیمانی	(استاد راهنما)
دکتر سعید آبرون	(استاد مشاور)
دکترناصر امیری زاده	(استاد ناظر)
دکتر سعید کاویانی	(استاد ناظر ونماینده 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 **فاطمه اسکندری** دانشجوی رشته **خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۸** 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 فاطمه اسکندری

تاریخ و امضا

۱۳۹۱/۴/۱۴

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 **۱۳۹۱** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر مسعود سلیمانی**، مشاوره **دکتر سعید آبرون** 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 **فاطمه اسکندری** 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 فاطمه اسکندری

تاریخ و امضا

۱۳۹۱/۴/۱۴

تقدیم به:

مقدس ترین واژه ی هستی، "خانواده"

به پدر و مادر عزیزم و برادرانم علی و امیر حسین که شوق آموختن و محبت

ورزیدن را به من آموختند.

تشکر و قدردانی

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

- جناب آقای دکتر مسعود سلیمانی استاد راهنمای محترم و جناب آقای دکتر سعید آبرون 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 جناب آقای دکتر سعید کاویانی و دکتر مهرداد نوروزی نیا کمال تشکر را دارم.
- از عزیزانی که در که در این امر مهم اینجانب را یاری نموده‌اند، نهایت تقدیر و تشکر را دارم: آقایان محمد حسین مقدسی، سعید شهرابی، مهدی آزاد، بهمن دلالت، ناصر مبرا، مجید مصاحبی، کامران عطاردی، غلامرضا خمیسی پور، ناصر احمد بیگی، وحید عربگری و خانم‌ها، مهین نیکوگفتار، عارفه جعفریان، زهرا السادات هاشمی، فرزانه محمدیار و نغمه عباسی.
- همچنین از دوستانی که در شرکت فن‌آوری بن یاخته همواره به اینجانب لطف داشتند، سپاسگزارم: آقایان، امیر آتشی، احسان عارفیان، ایمان شعبانی و خانم‌ها، مریم حفیظی، زهرا گوهری و سارا دودل.
- از همکلاسی‌های عزیزم خصوصا خانم نسیم کلانتری و کارشناسان گروه هماتولوژی، خانم شوکتی و رهنمایی و سایر دوستانم در گروه هماتولوژی کمال تشکر را دارم.

توفیق رفیقشان باد

چکیده

پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز یک روش درمانی برای بدخیمی‌های خونی و ناسازگاری‌های مغز استخوان می‌باشد. خون بند ناف یک منبع جایگزین برای بدست آوردن سلول‌های بنیادین خون‌ساز در پیوند آلوژنیک مورد استفاده قرار می‌گیرد و اکثر محدودیت‌های مواجه شده در HLA را بدلیل کمتر بودن لنفوسیت‌های T سازگار 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. تکثیر متداول سلول‌های بنیادی پیش‌ساز هماتوپوئتیک (سلول‌های $CD133^+$) در محیط کشت مایع دو بعدی است و تنها تکثیر اثر سایتوکاین‌های مختلف را بر روی سلول‌های بنیادی پیش‌ساز هماتوپوئتیک فراهم می‌آورد، در حالیکه فرآیندهای تماس سلول‌های $CD133^+$ با ماتریکس، 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 پوشاندن سطح با پروتئین‌های خارج سلولی در جهت تولید nicheهای مصنوعی هستند که ویژگی سه بعدی، شیمیایی، مکانیکی این نانو فیبرها موجب فعال شدن سیگنال‌های چسبندگی، تکثیری، تمایزی و مهاجرت سلول‌های $CD133^+$ با بیشترین شباهت به ماتریکس خارج سلولی طبیعی می‌شود. در این نانو فیبر با استفاده از موادی شبیه پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و یا پروتئین‌های طبیعی از جمله کلاژن، فیبرونکتین و لامینین میزان تکثیر و بیان ژن‌های موثر در روند تکثیر تنظیم می‌شود.در این مطالعه تکثیر سلول‌های $CD133^+$بر روی نانو فیبر پلی اتر سولفون پوشانده شده با فیبرونکتین افزایش یافت و میزان بیان مولکول لانه گزینی CXCR4 جهت پیوند نسبت به محیط دو بعدی افزایش نشان داد.

واژگان کلیدی: خون بند ناف، سلول‌های $CD133^+$، محیط سه‌بعدی، نانوفیبر، پلی‌اترسولفون

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. ماتریکس خارج سلولی ۹

۱-۴-۱. پروتئوگلیکان‌ها ۱۰

۱-۴-۲. فیبرونکتین ۱۱

۱-۴-۳. تناسین ۱۲

۱-۴-۴. کلاژن ۱۲

۱-۴-۵. لامینین ۱۳

۱-۵. CXCR4 ..... ۱۴

۱-۶. مهندسی بافت ۱۶

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 ۳۳
۲-۳. مراحل جداسازی سلول‌های $CD133^+$ ۳۴
۲-۳-۱. جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از خون بند ناف ۳۴
۲-۳-۲. جداسازی سلول‌های $CD133^+$ از سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از بند ناف ۳۵
۲-۳-۳. شمارش سلول‌های $CD133^+$ ۳۶
۲-۴. تائید مارکر CD133 سلول‌های جدا شده از خون بندناف ۳۶
۲-۵. کشت بر روی محیط کشت سه بعدی ۳۶
۲-۵-۱. آماده‌سازی داربست ۳۶
۲-۵-۱-۱. ریسندگی الکتریکی ۳۶
۲-۵-۱-۲. تنظیمات بهینه‌ی عوامل فرایندی ۳۷
۲-۵-۱-۳. تهیه داربست و آزمون‌های مربوط به آن ۳۸
۲-۵-۱-۴. اصلاح سطحی با پلاسما ۳۸
۲-۵-۱-۵. پوشش با فیبرونکتین ۳۸
۲-۵-۱-۶. بررسی قدرت آب‌دوستی داربست‌ها ۳۸
۲-۵-۱-۷. طیف سنجی فروسرخ ۳۹
۲-۶. سترون کردن داربست‌ها ۳۹
۲-۷. کاشت سلول بر روی داربست ۳۹
۲-۸. آماده‌سازی نمونه جهت بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی ۳۹
۲-۹. تست‌های تاییدی در تایید کلنی‌ها ۴۴
۲-۹-۱. تست سنجش کلنی ۴۴
۲-۱۰. استخراج Total RNA ۴۴
۲-۱۰-۱. فرایند حذف RNase ۴۶
۲-۱۰-۲. ارزیابی RNA استخراج شده ۴۶

۲-۱۰-۲-۱. ارزیابی مقدار RNA ۴۶
۲-۱۱. واکنش پلی مرازسیون معکوس (RT) ۴۶
۲-۱۱-۱. سنتز cDNA با استفاده از کیت Takara ۴۷
۲-۱۱-۱-۱. انواع پرایمر مورد استفاده در سنتز cDNA ۴۷
۲-۱۲. واکنش زنجیرهای پلیمرازی(PCR) ۴۹
۲-۱۲-۱. مواد لازم برای انجام PCR ۴۹
۲-۱۲-۱-۱. پرایمر ۴۹
۲-۱۲-۱-۲. DNA الگو ۵۰
۲-۱۲-۱-۳. DNA پلی مراز (مقاوم به حرارت) ۵۰
۲-۱۲-۱-۴. بافر PCR ۵۰
۲-۱۲-۱-۵. دزوکسی نوکلئوتیدتری فسفات (d NTP) ۵۱
۲-۱۲-۱-۶. منیزیوم (MgCL2) ۵۱
۲-۱۲-۲. مراحل PCR ۵۱
۲-۱۳. انجام Real Time PCR برای بررسی کمی CXCR4 ..... ۵۲

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۵۳
۳-۱. نتایج حاصل از جداسازی سلول‌های $CD133^+$ از خون بند ناف ۵۴
۳-۲. نتایج آزمون‌های خواص فیزیکی داربست‌ها ۵۴
۳-۲-۱. شکل شناسی داربست‌ها ۵۴
۳-۲-۲. طیف سنجی فروسرخ ۵۵
۳-۳. نتایج حاصل از کشت سلول‌های $CD133^+$ در محیط دو بعدی و سه بعدی ۵۷
۳-۳-۱. سلول‌های کشت شده در محیط دو بعدی ۵۷
۳-۳-۲. سلول‌های کشت شده در محیط سه بعدی ۵۷
۳-۳. بررسی میزان بیان CD133 در سلول‌های کشت شده در محیط کشت سه بعدی و دو

بعدی به کمک فلوسایتومتری ۵۸
۳-۵. نتایج حاصل سنجش کلنی ۶۱
۳-۶. نتایج حاصل از بررسی بیان CXCR4 به کمک روش RT-PCR ۶۳
۳-۷. نتایج حاصل از بررسی کمی میزان بیان CXCR4 ..... ۶۴

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۶۵
۴-۱. بحث، نتیجه‌گیری ۶۶
۴-۲. پیشنهادها ۷۳

فهرست منابع و مآخذ ۷۴
چکیده انگلیسی ۸۴

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول (۲-۱) آماده‌سازی PBS ۳۳

جدول (۲-۲) حجم بافر RLT Plus برای لیز سلول‌ها ۴۵

جدول (۲-۳) مقادیر مورد استفاده جهت انجام سنتز ۴۸

جدول (۲-۴) چرخه دمایی سنتز cDNA ۴۹

جدول (۲-۵) مراحل مربوط به RT-PCR ۵۲

جدول (۲-۶) توالی پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR ۵۲

جدول (۲-۷) مقادیر مورد استفاده جهت انجام CXCR4 Real time PCR ۵۲

جدول (۲-۸) چرخه دمایی Real Time PCR بیان CXCR4 ..... ۵۲

جدول (۳-۱) تعداد سلول‌های شمارش شده در روزهای مختلف ۵۷

جدول (۳-۲) تعداد کلنی‌های شمارش شده در روزهای مختلف را نشان می‌دهد ۶۲

جدول (۳-۳) میزان CT مربوط به HPRT و CXCR4 ..... ۶۴

جدول (۳-۴) میزان تغییرات در روزهای مختلف در مقایسه با یکدیگر ۶۴

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱) فرآیند الکتروریسی ۲۵

شکل (۲-۱) سامانه‌ی الکتروریسی استفاده شده در این پژوهش ۳۷

شکل (۳-۱) نتیجه حاصل از بررسی سلول های جدا شده به روش MACS از نظر بیان مارکر CD133 ۵۴

شکل (۳-۲) تصاویر میکروسکوپ الکترونی پویشی داربست‌های نانو فیبری پلی اتر سولفون با مقیاس الف-۱۰ و ب- ۱۰۰ میکرومتر ۵۵

شکل (۳-۳) منحنی طیف سنجی فروسرخ داربست های پلاسما شده پیش (الف)و پس از پوشش با فیبرونکتین(ب) ۵۶

شکل (۳-۴) سلول‌های $CD133^{+}$ تکثیر یافته در محیط کشت دو بعدی با بزرگنمایی ۱۰۰۰× ۵۷

شکل (۳-۵) الف- سلول‌های موجود در نانوفیبر در روز ۷ کشت؛ ب- سلول‌های موجود در نانوفیبر در روز ۱۴ کشت ۵۸

شکل (۳-۶) الف) نتایج مربوط به بیان CD133 در روز ۷ در محیط سه بعدی؛ ب) نتایج مربوط به بیان CD133 در روز ۷ در محیط دو بعدی؛ ج) نتایج مربوط به بیان CD133 در روز ۱۴ در محیط سه بعدی؛ د) نتایج مربوط به بیان CD133 در روز ۱۴ در محیط دو بعدی ۶۰

شکل (۳-۷) کلنی اریتروییدی حاصل از کشت سلول CD133 ۶۱

شکل (۳-۸) کلنی CFU.GEMM حاصل از کشت سلول CD133 ۶۲

شکل (۳-۹) کلنیCFU. GMحاصل از کشت سلول CD133 ۶۲

شکل (۳-۱۰) نتایج مربوط به بیان CXCR4 در محیط 3D و 2D ۶۳

شکل (۳-۱۱) Melting Curve و Amplication Plot مربوط به HPRT ۶۴

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار (۳-۱) آنالیز آماری مربوط به شمارش سلولی ۵۸
نمودار (۳-۲) آنالیز آماری مربوط به شمارش سلولی ۶۱
نمودار (۳-۳) نمودار مربوط به آنالیز شمارش کلنی ۶۳

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 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 غیرخویشاوند بوجود آمدند. تخمین زده می‌شود که

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

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 ۱۰۷ ۳/۷ 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 راه ارایه گردیده است:

1- Graft Versus Host Disease(GVHD)