بهینه‌سازی شرایط جداسازی سلول‌های هسته‌دار خون بند ناف جنینی با استفاده از هیدرو کسی اتیل استارچ(HES)

پروانه عباسی[۱]، کریم شمس[۲]*، علی اکبر موثق‌پور[۳]، پروین اکبرزاده لاله[۴]، فاطمه صباغی[۵]، عبدالناصر مقدم[۶]، نیما ده دیلانی[۷]، پریسا لطفی‌نژاد[۸]

تاریخ دریافت 1392/02/28 تاریخ پذیرش 1392/05/05

چکیده

پیش زمینه و هدف: استفاده از سلول‌های خون بند ناف به عنوان یک منبع غنی از سلول‌های بنیادی پنجره جدیدی به روی درمان‌های ترمیمی مبتنی بر سلول گشوده است. روش‌های متنوع زیادی برای جداسازی سلول‌های هسته‌دار خون بند ناف به کار گرفته شده است. هیدروکسی اتیل استارچ یک عامل القا سدیمانتاسیون گلبول‌های قرمز است که گزارش‌های متنوع و گاهاً متضادی درباره غلظت بهینه و توانایی آن در کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون وجود دارد. بنابراین مطالعه حاضر به منظور تعیین شرایط و غلظت نسبی بهینه هیدروکسی اتیل استارچ، نیروی نسبی سانتریفوژ، دما و قطر لوله در راندمان جداسازی سلول‌های هسته‌دار خون بند ناف انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: خون بند ناف از زنان با زایمان طبیعی جمع‌آوری شد. اثربخشی فرایند جداسازی از طریق شمارش سلولی و برآورد زیستایی سلول‌ها پس از هر مرحله جداسازی در غلظت‌های متفاوت هیدروکسی اتیل استارچ، قدرت‌های نسبی سانتریفوژ مختلف و دماهای متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: میانگین کل درصد سلول‌های هسته‌دار جدا شده به ترتیب برای غلظت‌های ۰/۵، ۱/۱، ۱/۸ و ۲/۵ درصد هیدروکسی اتیل استارچ معادل ۶۶/۸، ۷۳/۳، ۷۵/۱، ۷۶/۹ و ۶۹/۹ درصد بود. بیشترین میزان سلول‌های هسته‌دار در نیروی نسبی سانتریفوژ ۵۰g و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد جدا سازی شد. سدیمانتاسیون خون آمیخته با ۲/۵ درصد هیدرکسی اتیل استارچ در زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب منجر به جداسازی ۵۷، ۶۳ و ۶۴ درصد کل سلول‌های هسته‌دار خون بند ناف شد.

بحث و نتیجه گیری: تعداد کل سلول‌های هسته‌دار و گلبول‌های قرمز در موفقیت فرایند پیوند خون بند ناف نقش اساسی را ایفا می‌کند. در این مطالعه بیشترین میزان جداسازی سلول‌های هسته‌دار ۷۶ درصد با کاهش ۹۰ درصدی گلبول‌های قرمز بود که در شرایط سانتریفوژ با نیروی نسبیg ۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه در غلظت ۲/۵ درصد هیدرکسی اتیل استارچ بدست آمد. مطالعات بیشتر به منظور بررسی اثرات سایر عوامل در میزان سدیمانتاسیون گلبول‌های قرمز به منظور جداسازی سلول‌های هسته‌دار لازم است.

واژه‌های کلیدی: خون بند ناف، هیدروکسی اتیل استارچ، سلول‌های تک هسته‌ای

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره هفتم، ص ۴۹۲-۴۸۳، مهر ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: تبریز، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تلفن: ۰۹۱۴۶۴۲۷۶۹۰

Email: k.shams@ibto.ir

[۱] کارشناس ارشد هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون، دانشکده پزشکی تبریز، گروه ایمونولوژی، بخش هماتولوژی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

[۲] استادیار هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات خون و انکولوژی (نویسنده مسئول)

[۳] استادیار هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون ، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات خون و انکولوژی

[۴] دکترای بیوتکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده داروسازی، گروه بیوتکنولوژی داروئی

[۵] مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ، تبریز، ایران

[۶] اداره کل انتقال خون استان آذربایجان شرقی

[۷] مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

[۸] کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

مقدمه

پیوند آلوژنیک سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک مغز استخوان و خون گزینه درمانی مناسبی برای بسیاری از بیماری‌های هماتولوژیک، نقایص ایمنی و اختلالات متابولیسمی مادرزادی هستند(۱،۲). با این وجود به دلیل عدم وجود اهداکننده مناسب و سازگار کاربرد محدودی برای بیماران دارند (۴،۳). از سال ۱۹۹۸ خون بند ناف جنینی (UCB) به عنوان منبع جانشین مغز استخوان، جهت بازسازی سیستم هماتوپوئتیک مورد استفاده قرار گرفت(۵). استفاده از خون بند ناف دارای مزایایی نسبت به مغز استخوان می‌باشد (۶). همچنین به رغم تصور موجود در مورد محتوای سلولی محدود خون بند ناف، فراوانی سلول‌های پروژنیتور موجود در آن بیشتر از مغز استخوان و خون محیطی است (۹-۷). جهت کاربرد خون بند ناف برای پیوند هماتوپوئتیک به $۳/۷ \times ۱۰^{۷}$ سلول هسته‌دار به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نیاز می‌باشد (۱۲،۱۱،۹). یک مانع مهم در استفاده از خون بند ناف خطر واکنش‌های انتقال خون به دلیل ناسازگاری ABO و کاهش درصد سلول‌های هسته‌دار و به دنبال آن سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک در صورت دست‌کاری برای برداشتن این گلبول‌های قرمز می‌باشد (۱۰). همچنین به دلیل هزینه و زحمت زیاد ذخیره موثر سلول‌های بنیادی هماتوپوئتیک بند ناف، باید پلاسما و گلبول‌های قرمز از این سلول‌ها جدا شوند (۳). تخلیه گلبول‌های قرمز از خون بندناف اهدا کننده ریسک آنمی همولیتیک ناشی از ناسازگاری ABO در گیرنده را کاهش می‌دهد.

روش‌های گوناگونی جهت جداسازی سلول‌های هسته‌دار و خروج گلبول‌های قرمز وجود دارد که شامل استفاده از جدا کننده‌های اتوماتیک و نیمه اتوماتیک (۱۴)، استفاده از عوامل رسوب دهنده (هیدروکسی اتیل استارچ(HES)، ژلاتین و...) (۱۵،۱۶)، سانتریفوژ ساده دستی یا نسبتاً اتوماتیک (۱۷) و جداسازی بر اساس گرادیانت دانسیته(فایکول و پروسل) می‌باشد (۳, ۱۸-۱۹).

به دلیل وجود تعداد زیاد سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی هسته‌دار و نیز پلاکت‌ها که تأثیر منفی بر جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای در بند ناف دارند و در جداسازی با فایکول الزاماً رسوب نکرده و در لایه اینترفاز باقی می‌مانند، فرآیند جداسازی سلول‌ها از خون بند ناف با جداسازی سلول‌ها از مغز استخوان و خون محیطی متفاوت بوده و نیاز به یک روش جمع‌آوری بهینه در مراکز بانک خون بند ناف احساس می‌شود. با وجود فن‌های مختلف مورد استفاده در مراکز جمع‌آوری خون بند ناف، یکی از روش‌های شایع در این مراکز در سراسر دنیا برای استفاده از HES برای تقلیل تعداد گلبول‌های قرمز می‌باشد (۱۲،۲۰). Rubinstein و همکارانش برای اولین بار در سال ۱۹۹۵، HES را برای جداسازی گلبول‌های قرمز معرفی کردند (۱۶). HES باعث افزایش سرعت سدیمانتاسیون گلبول‌های قرمز توسط القا تشکیل رولکس می‌شود (۲۱). با این حال استفاده از HES طبق پروتکل‌های توصیه شده مختلف، نتایج متفاوت و گاهاً متضادی را در پی دارد و نیاز به مطالعه‌ای دقیق، جهت تعیین رابطه زمان، نیروی سانتریفوژ، دما، قطر لوله و غلظتHES، برای بهینه‌سازی شرایط جداسازی ضروری به نظر می‌رسد. لذا در این مطالعه سعی شد برای افزایش محصول سلول‌های هسته‌دار و کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، تأثیر فاکتورهای مختلف که در مطالعات دیگر به صورت مجزا بررسی شده‌اند همزمان بررسی شود و نیز فاکتورهایی که تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته‌اند همچون دما و قطر لوله آزمایش نیز مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین فاکتورهای مختلف زمان‌های انکوباسیون مختلف، غلظت‌های مختلفHES، دماهای گوناگون و مقادیر مختلف نیروی نسبی سانتریفوژ (RCF) متفاوت آزمایش و نتایج باهم مقایسه شد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری خون بند ناف: مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود . در این مطالعه ابتدا فرم رضایت نامه توسط مادران با زایمان طبیعی و نرمال تکمیل شد. پس از تولد نوزاد و حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از آن اقدام به جمع‌آوری پنج نمونه خون بندناف شد(۴). ورید ناف کلامپ شده با محلول آنتی سپسیس (ابتدا اتانول۷۰درصد و سپس سواب بتادین) ضدعفونی و سپس با نیدل اقدام به جمع‌آوری حدود ۳۰-۴۰ میلی لیتر خون درون لوله‌های حاوی ضد انعقادNa_3-EDTA شد. خون بند ناف تا قبل از جداسازی در دمایC^{o} ۶-۴ ذخیره شد (زمان نگهداری ۳-۱۲ ساعت) (۱۲). شمارش گلبول‌های قرمز و سلول‌های هسته‌دار قبل و بعد از هر مرحله از فرآیند جدا سازی انداز گیری و تست زیست‌پذیری نیز در هر مرحله انجام شد.

جداسازی با HES: خون بند ناف با مقادیر مختلف HES (وزن مولکولی ۱۳۰۰۰۰، W/V ۶درصد در NACL ۰/۹درصد، Fresenius Kabi، Germany)، مخلوط و میزان جداسازی گلبول‌های قرمز و سفید در زمان‌های مختلف ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰و ۱۸۰ دقیقه در شرایط سدیمانتاسیون طبیعی و نیز در نیروی نسبی سانتریفوژ (RCF) ۵۰g، ۱۰۰gو ۲۰۰g، در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه و همین‌طور در دماهای $۴^{o}C$، $۱۰^{o}C$و $۲۲^{o}C$ بررسی شد. HES با وزن مولکولی ۱۳۰ تا ۲۰۰ هزار دالتون وجود دارد این در حالی ست که HES قابل تزریق که بیشترین کاربرد را برای مصارف درمانی دارد از نوع ۱۳۰ هزار بوده و بیشترین

داده‌های آزمایشگاهی در زمینه جداسازی RBC ها نیز مربوط به این نوع ازHES است. در این مطالعه ابتدا خون بند ناف با PBS (بدون یون‌های Ca و Mg) و HES ۶درصد برای رسیدن به غلظت نهایی ۲/۵درصد مخلوط شد و در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰و ۱۸۰دقیقه در دمای ۲۲°C انکوبه شد تا میزان جداسازی سلول‌ها در زمان‌های مختلف بررسی شود. سپس خون بند ناف با همان رقت قبلی HES در لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری با نیروی نسبی سانتریفوژهای ۵۰g، ۱۰۰g, ۲۰۰g در سانتریفوژ 3-30KH (Sigma, Germany ،Rotor: 11390) به مدت ۱، ۵ و ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا RCF مناسب برای شرایط جداسازی مشخص شود. سپس با مشخص شدن نیروی نسبی سانتریفوژ مناسب و زمان مناسب جهت سانتریفوژ، غلظت‌های مختلفHES ۰/۵درصد، ۱/۱درصد، ۱/۸درصد، ۲/۵درصد و ۳درصد مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین اثر دما بر میزان جداسازی سلول‌های هسته‌دار و میزان تقلیل تعداد گلبول‌های قرمز، میزان رسوب در دماهای ۴°C، ۱۰°Cو ۲۰° C در غلظت‌های ۱/۱درصد، ۱/۸درصد و ۲/۵درصد در ۵۰RCF g و زمان ۱۰ دقیقه نیز مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی شمارش سلولی و Viability: تعداد سلول هسته‌دار و گلبول‌های قرمز در مراحل جداسازی در هر قسمت از لوله از بالا تا پایین به اختلاف حجم یک سی سی، با سل کانترهای اتوماتیک KX-21N (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) شمارش شدند و سپس مجموع شمارش ۵ میلی لیتر بالائی لوله به دست آمده و درصد سلول‌های موجود در این ۵ میلی لیتر به تعداد کل سلول‌های موجود در لوله محاسبه شد. میزان درصد زیست‌پذیری سلول‌های هسته‌دار پس از جداسازی و رنگ آمیزی با تریپان بلو، توسط مشاهده میکروسکوپی ارزیابی شدند. درصد بازیابی سلول‌ها از طریق تقسیم تعداد مطلق سلول‌های بدست آمده در ۵ میلی لیتر بالائی پس از فرآوری به تعداد سلول‌های موجود در واحد اصلی بدست آمد.

بررسی اثر ارتفاع به قطر لوله آزمایش بر جداسازی NC و RBC: نظر به تأثیر ارتفاع لوله آزمایش بر میزان مسافت پایین آمدن سلول‌ها در طی سدیمانتاسیون سلولی در زمان، تأثیر ارتفاع و قطر لوله‌ها و شتاب گرانشی ثابت بر میزان رسوب سلولی سنجیده شد. جهت بررسی اثر ارتفاع به قطر لوله آزمایش بر میزان جداسازی سلول‌های هسته‌دار، فرآیند جداسازی در لوله فالکون ۵۰ (قطر لوله ۲۵ میلی‌متر) با غلظت ۱/۸ درصد HES و در دمای ۲۲°C و ۵۰g RCF نیز انجام شد و با میزان جداسازی در لوله فالکون ۱۵ (قطر لوله ۱۲ میلی‌متر) در همان شرایط جداسازی مقایسه شد.

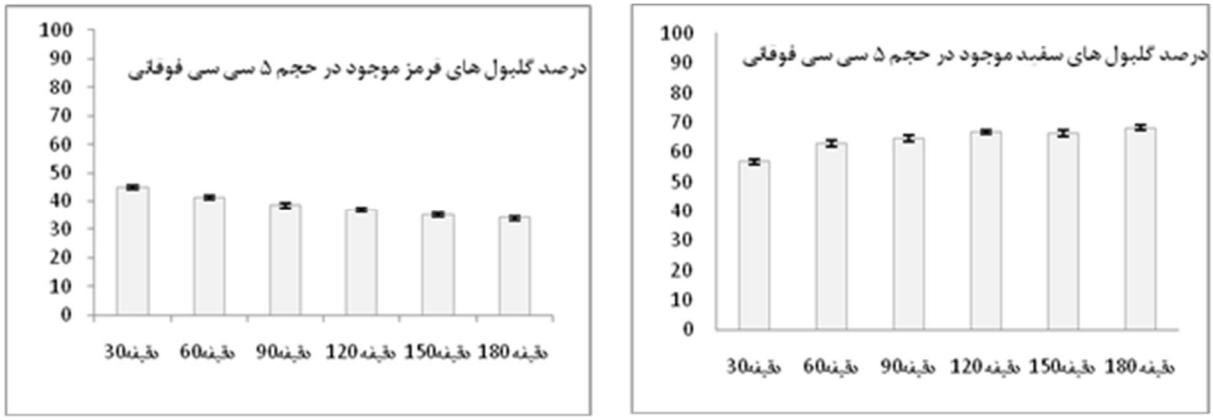
آمار: نتایج شمارش گلبول‌های قرمز و سلول‌های هسته‌دار در هر مرحله به صورت± SD mean(میانگین حاصل از ۳ بار تکرار ± انحراف معیار) و با نرم افزار آماری SPSS17 محاسبه و بیان شد.

نتایج

بازیافت سلول‌ها و تقلیل گلبول‌های قرمز: تعداد کل سلول‌های هسته‌دار خون و گلبول‌های قرمز بند ناف در هر دو مرحله قبل از پردازش و پس از پردازش در حجم مساوی مورد بررسی قرار گرفت. برای شمارش سلول‌ها از سطح رویی مایع با حجم یک میلی لیتر شروع به برداشت نموده و شمارش سلول‌های هسته‌دار خون و گلبول‌های قرمز در هر یک میلی لیتر بدست آمد. سپس تعداد کل سلول‌های هسته‌دار خون و گلبول‌های قرمز در حجم ۵ میلی لیتر بالایی و پایینی با جمع جبری شمارش هر میلی لیتر خون محاسبه و مقایسه شد. نتایج میزان جداسازی سلول‌های هسته‌دار خون و گلبول‌های قرمز در شرایط گوناگون بررسی و نتایج به شرح زیر می‌باشد.

اثر زمان بر میزان جداسازی سلول‌های هسته‌دار و گلبول‌های قرمز در غلظت ۲/۵ درصد هیدروکسی اتیل استارچ:

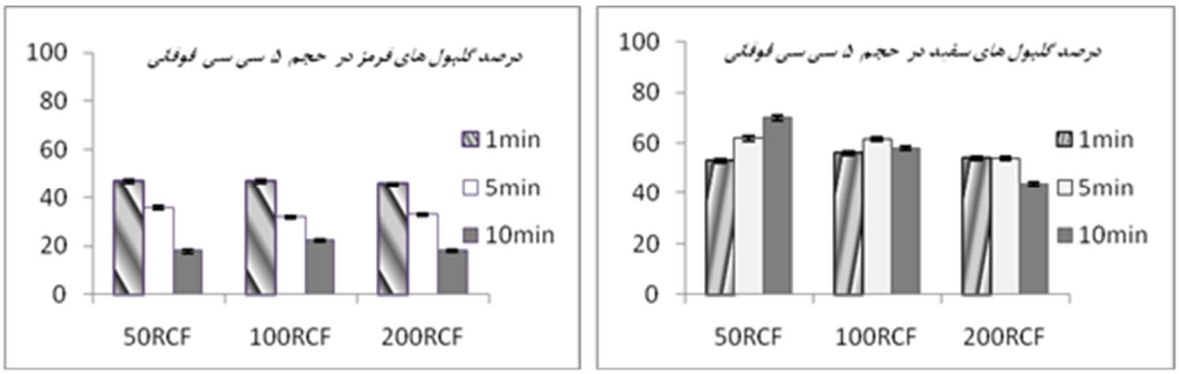
جهت دستیابی به زمان ایده آل برای بازیابی حداکثر سلول‌های هسته‌دار، خون بند ناف با غلظت نهایی ۲/۵درصد HES در حجم ۱۰ سی‌سی در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰و ۱۸۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. در طی بررسی مشخص شد که پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۲°C، درصد میانگین سلول‌های هسته‌دار جداشده در حجم ۵ سی سی بالایی لوله ۵۷±۲/۶درصد در ۶۰ دقیقه ۶۳±۳/۷درصد، در ۹۰ دقیقه ۶۴±۳/۱درصد و در زمان‌های ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ حدوداً یکسان و معادل ۶۶ ±۵/۱درصد کل سلول‌های هسته‌دار بوده است، که میزان جداسازی سلول‌های هسته‌دار در زمان ۶۰ دقیقه دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به زمان ۳۰ دقیقه می‌باشد (P =0.04). درحالی‌که میزان سلول‌های هسته‌دار جداشده در زمان‌های ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند (P=1.04) میزان زیستایی سلول‌های هسته‌دار در تمامی شرایط آزمایشگاهی در حدود ۹۸±۲ درصد بوده و فاقد اختلاف آماری معنی‌دار بود.



شکل شماره (۱): میانگین درصد تعداد سلول‌های هسته‌دار و گلبول‌های قرمز در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ دقیقه با هیدرو کسی اتیل استارچ .آزمایش جداسازی با استفاده از غلظت ۱/۸ درصد هیدروکسی اتیل استارچ در زمان‌های مختلف و در دمای ۲۲°c در لوله با قطر ۱۲ میلی‌متر در حجم نهایی ۱۰سی سی انجام شد.

اثر نیروی نسبی سانتریفوژ بر میزان جداسازی سلول‌های هسته‌دار و گلبول‌های قرمز در غلظت ۲/۵درصد هیدروکسی اتیل استارچ.

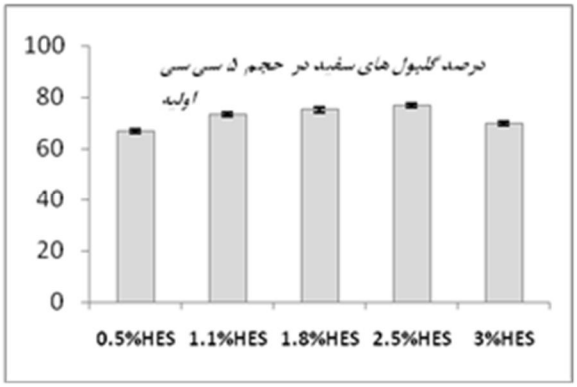
جهت دستیابی به روش مناسب برای جداسازی سریع و موثر سلول‌های هسته‌دار، جداسازی سلول‌های هسته‌دار خون بند ناف و کاهش تعداد سلول‌های قرمز در غلظت مشخص HES ۲/۵درصد در دمای ۲۲°C، در حجم نهایی ۱۰ سی سی، در نیروی نسبی سانتریفوژ ۵۰g، ۱۰۰g , ۲۰۰g در سانتریفوژ 3-30K (Rotor: 11390، Sigma, Germany) به مدت ۱، ۵ و ۱۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. در نیروی نسبی سانتریفوژ ۵۰g در زمان ۱۰ دقیقه میانگین سلول‌های هسته‌دار در نیمه فوقانی ۷۰±۴/۱درصد کل سلول‌های هسته‌دار بود که دارای اختلاف معنی‌دار با سایر زمان‌های یاد شده بود (P =0.03). در مقایسه درصد میانگین رسوب گلبول‌های قرمز در نیروی نسبی سانتریفوژ ۵۰g، ۱۰۰g , ۲۰۰g در زمان‌های متناظر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P =0.1).

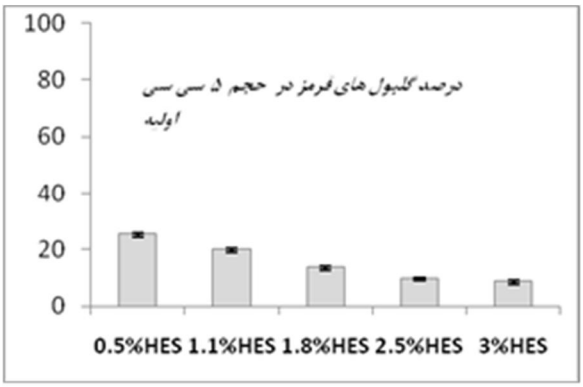


شکل شماره (۲): میانگین درصد تعداد سلول‌های هسته‌دار و گلبول‌های قرمز در غلظت ۲/۵درصد هیدروکسی اتیل استارچ در RCF های ۵۰g، ۱۰۰g و ۲۰۰ g. آزمایش جداسازی با استفاده از غلظت ۲/۵درصد هیدروکسی اتیل استارچ در زمان ۱۰ دقیقه، در دمای ۲۲°c در لوله با قطر ۱۲ میلی‌متر در حجم نهایی ۱۰سی سی و در RCF های ۵۰g، ۱۰۰g و ۲۰۰ g انجام شد.

اثر غلظت‌های مختلف HES بر جداسازی سلول‌های هسته‌دار و گلبول‌های قرمز در نیروی نسبی سانتریفوژ ۵۰g و زمان۱۰ دقیقه: غلظت‌های ۰/۵درصد، ۱/۱درصد، ۱/۸درصد، ۲/۵درصد و ۳درصد از HES تهیه و در نیروی نسبی سانتریفوژ ۵۰g در دمای ۲۲°C مورد آزمایش قرار گرفت که میانگین درصد بازیابی سلول‌های هسته‌دار به ترتیب ۶۶/۸ ±۴/۱درصد، ۷۳/۳±۳/۲درصد،

۳/۶± ۷۵/۱درصد، ۲/۹± ۷۶/۹درصد و ۴/۳±۶۹/۹درصد بود. جداسازی در غلظت ۲/۵ درصد HES دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به جداسازی در غلظت ۰/۵درصد و ۳درصد می‌باشد (P=0.03)، اما بین جداسازی در غلظت‌های ۱/۱درصد، ۱/۸درصد و ۲/۵درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P =1.15). میزان میانگین درصد RBC باقی مانده در ۵ سی سی بالایی لوله به ترتیب ۲/۸±۲۵/۶درصد، ۳/۳±۲۰درصد، ۴/۲±۱۳/۷درصد، ۲/۵±۱۱/۸درصد و ۵/۳±۸/۹درصد حاصل شد که در همه غلظت‌ها اختلافات مشاهده شده معنی‌دار بود. و میزان زیست‌پذیری سلول‌های جدا شده در تمامی شرایط جداسازی به طور میانگین ۴±۹۶درصد بوده، فاقد اختلاف معنی‌دار بود.

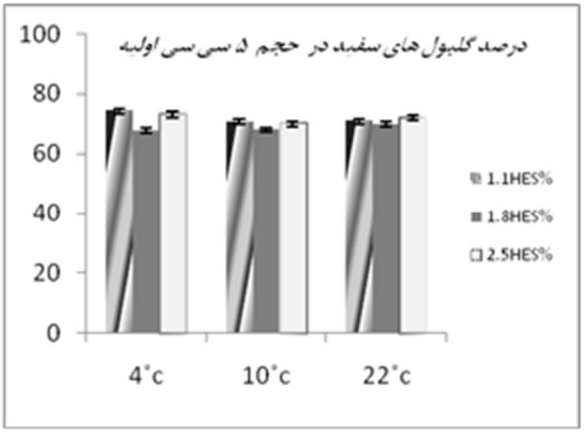


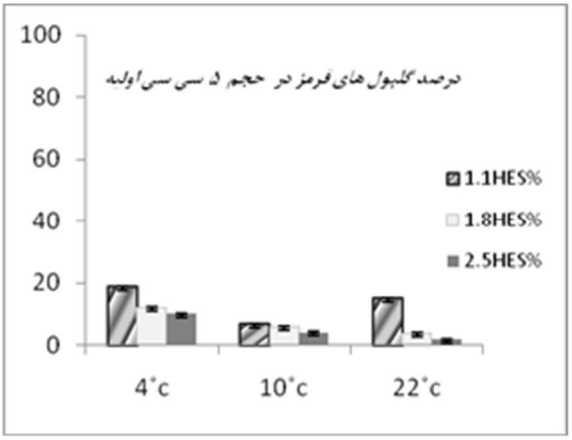


شکل شماره (۳): درصد میانگین تعداد سلول‌های هسته‌دار و گلبول‌های قرمز در غلظت‌های مختلف ۰/۵درصد، ۱/۱درصد، ۱/۸درصد، ۲/۵درصد و ۳درصد از هیدروکسی اتیل استارچ. . آزمایش جداسازی با استفاده از غلظت‌های مختلف هیدروکسی اتیل استارچ در RCF 50g و زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۲۲°c در لوله با قطر ۱۲ میلی‌متر انجام شد.

اثر دما بر میزان جداسازی NC و RBC در غلظت ۲/۵ درصد هیدروکسی اتیل استارچ:

در بررسی اثر دما بر روند جداسازی سلول‌های هسته‌دار، مشابه سایر نتایج، حداکثر جداسازی سلول‌های هسته‌دار در غلظت ۲/۵ درصدHES و ۲/۱±۷۶/۹درصد بوده و مقایسه میزان جداسازی در دماهای مختلف یاد شده تفاوت معنی‌داری را در جداسازی نشان نداد (P=1.01) . در مورد میزان کاهش گلبول‌های قرمز در غلظت ۲/۵ درصد HES بیشترین کاهش در دمای ۲۲°C مشاهده شد که نسبت به میزان رسوب سلول‌ها در دمای ۴°C تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد (P =0.01).

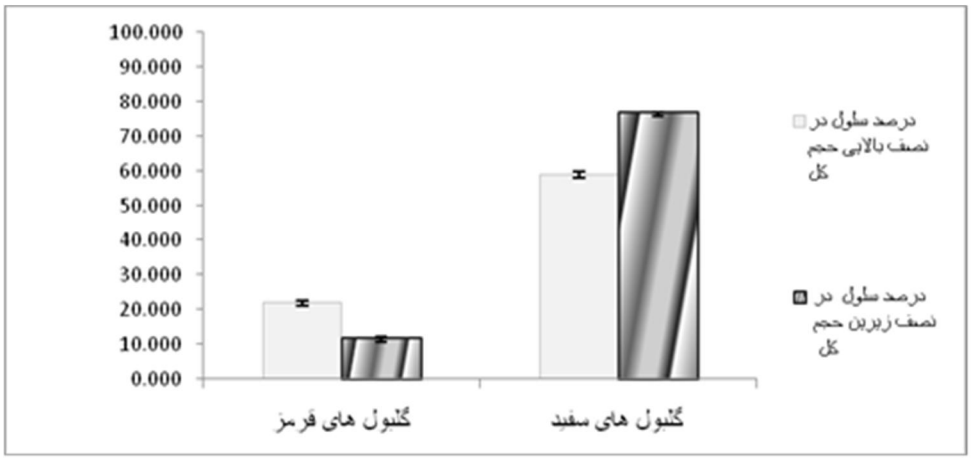




شکل شماره (۴): درصد میانگین تعداد سلول‌های هسته‌دار و گلبول‌های قرمز در غلظت ۱/۱درصد، ۱/۸درصد و ۲/۵ درصد از HES در دماهای مختلف ۴°C، ۱۰°Cو ۲۲°C . آزمایش جداسازی با استفاده از غلظت‌های مختلف هیدروکسی اتیل استارچ، در RCF50g و زمان ۱۰ دقیقه در دماهای مختلف در لوله با قطر ۱۲ میلی‌متر انجام شد.

بررسی اثر ارتفاع به قطر لوله آزمایش، بر روند جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای و گلبول‌های قرمز در غلظت ۲/۵ درصد هیدروکسی اتیل استارچ در لوله فالکون ۱۵ و ۵۰ سی سی:

جهت بررسی ارتباط بین نسبت ارتفاع لوله به قطر لوله و میزان جداسازی، فرآیند جداسازی در لوله ۵۰ سی سی با قطر ۲۵ میلی‌متر، در شرایطی مشابه شرایط با لوله ۱۵ با قطر ۱۲ میلی‌متر انجام شد. از آن جایی که ارتفاع هر دو لوله فالکون یکسان بوده، عامل تأثیرگذار قطر لوله می‌باشد. میانگین درصد سلول‌های هسته‌دار در نیمه حجم بالایی لوله با قطر ۲۵ میلی‌متر ۶±۵۸ درصد و در لوله با قطر ۱۵ میلی‌متر ۳/۸± ۷۶ درصد مشاهده شد که می‌توان گفت میزان جداسازی سلول‌های هسته‌دار در لوله ۵۰ نسبت به لوله ۱۵ با اختلاف معنی‌دار کمتر می‌باشد (P=0.03).



شکل شماره (۵): مقایسه درصد میانگین سلول‌های هسته‌دار و گلبول‌های قرمز در لوله فالکون با قطر۱۲و ۲۵ میلی‌متر . آزمایش جداسازی با استفاده از هیدروکسی اتیل استارچ ۲/۵درصد، در RCF50g و زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۲۲°c در دو لوله با قطر ۱۲ و ۲۵ میلی‌متر انجام شد.

بحث

مطالعات نشان داده‌اند که یکی از عوامل مهم در رد یا پذیرش و نتیجه نهایی پیوند، تعداد سلول‌های هسته‌دار پیوند شده بند ناف است (۲۲). نتایج حاصل از این مطالعه روشی ساده و قابل استفاده در آزمایشگاه‌ها با بررسی پارامترهای تأثیر گذار را نشان می‌دهد. بر اساس داده‌های بدست آمده به نظر می‌رسد از بین غلظت‌های مختلف HES، جداسازی سلول‌ها با ۲/۵HESدرصد، در زمان سانتریفوژ ۱۰ دقیقه و ۵۰g RCF به ایجاد بهترین شرایط برای جداسازی سلول‌های هسته‌دار از خون بند ناف کمک می‌کنند.

روش‌های زیادی معرفی شد که در هر کدام درصد بازیابی سلول‌های هسته‌دار متفاوت گزارش شده است. حداکثر میزان بازیابی سلول‌های هسته‌دار، در اکثر مراکز بانک خون بند ناف ۶۰درصد گزارش شده است (۲۳). میزان جداسازی در پردازش دو مرحله‌ای با استفاده از HES توسط Koliakos و همکارانش، که بجای سانتریفوژ از انکوباسیون طولانی مدت دو مرحله‌ای در دمای اتاق استفاده شد ۲/۲± ۹۳/۶ درصد گزارش شد که با وجود بازیابی بیشتر سلول‌های تک هسته‌ای، در مقایسه با روش مورد استفاده ما بسیار زمان‌بر و طولانی می‌باشد (۱۲). در سال ۱۹۹۹ Schwinger و همکارانش به بررسی کارایی چهار روش مختلف برای جداسازی سلول‌های سفید و هسته‌دار پرداختند. مطالعات آن‌ها نشان داد که جداسازی دو مرحله‌ای با فایکول (۹۴/۲درصد) و جداسازی با HES (۹۰/۲ درصد) بازیابی بهتری نسبت به روش استاندارد تک مرحله‌ای فایکول(۷۸/۳۵درصد) و نیز روش بر پایه ژلاتین(۶۷/۲درصد) دارد (۲۴). استفاده از فایکول بدون رسوب دادن گلبول‌های قرمز توسط HES چندان کارا نبوده و همچنین استفاده از مقادیر زیاد فایکول در زمان‌های طولانی برای سلول‌ها سمی می‌باشد. همچنین استفاده از ژلاتین برای موارد با حجم خون بند ناف بالا ارجح گزارش شده است (۲۵). در سال ۲۰۰۷، به منظور مقایسه روش دستگاهی Sepax(دستگاه سانتریفوژ مدرن برای جداسازی اتوماتیک خون و اجزای آن) با روش جداسازی سلول و پلاسما توسط Top and Bottom و نیز روش HES برای جداسازی سلول‌های هسته‌دار، Lapierre و همکارانش مطالعه‌ای انجام دادند. درصد میانگین سلول‌های هسته‌دار بازیابی شده در این روش‌ها به ترتیب ۸۰/۲۶درصد، ۶۰/۷۲درصد، ۷۶/۸۲درصد

گزارش شد. این مطالعه استفاده از Sepax را روش با کارایی بیشتر، صرف زمان کمتر و احتمال کمتر آلودگی به علت بسته بودن محیط جداسازی معرفی می‌کند. در مطالعه دیگری درصد میانگین جداسازی سلول‌های هسته‌دار توسط جداکننده‌های اتوماتیک ۸۶±۱۱/۶ درصد گزارش شده است (۲۷، ۲۶). این در حالی است که دستگاه‌های اتوماتیک و نیمه اتوماتیک جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای در بسیاری از مراکز بانک خون سلول‌های بند ناف در دسترس نبوده و لذا نیاز به روش ساده‌تری می‌باشد که در این مطالعه با پردازش یک مرحله سلول‌ها، میزان بازیابی سلول‌های هسته‌دار ۷۶±۳ درصد می‌باشد. با وجود سادگی این روش، به علت باز بودن سیستم امکان آلودگی بیشتری نسبت به سیستم‌های بسته جود دارد.

در فرآیند جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از خون بند ناف متغیرهای زیادی دخیل بوده که تاکنون اثرات این متغیرها در هیچ مطالعه‌ای به طور جامع مورد بررسی قرار نگرفته است. در این مطالعه سعی شد متغیرهای موجود در روش جداسازی سلول‌های بند ناف با HES و تقلیل گلبول‌های قرمز به طور دقیق بررسی و ارزیابی شوند. در این مطالعه پنج فاکتور اثر نیروی جاذبه غیرفعال اعمال شده، زمان‌های مختلف، RCF های مختلف سانتریفوژ و غلظت‌های مختلف HES و نیز نسبت ارتفاع به قطر لوله فولکون مورد استفاده، جهت کاهش حجم خون بندناف و تقلیل گلبول‌های قرمز و افزایش بازیابی هرچه بیشتر سلول‌های تک هسته‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. . از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر دما بر میزان جداسازی سلول‌های هسته‌دار و اثر آن بر میزان تقلیل گلبول‌های قرمز توسط HES انجام نشده در این مطالعه سعی بر آن شد که اثر این فاکتور نیز بر میزان جداسازی سلول‌ها بررسی شود. در این مطالعه بین دمای جداسازی و میزان بازیابی سلول‌های هسته‌دار و نیز بین دمای جداسازی و زیست‌پذیری سلول‌ها رابطه معنی‌داری مشاهده نشد($P = 0.06$) و زیست‌پذیری سلول‌ها بالاتر از ۹۷±۱درصد بود که تقریباً مشابه زیست‌پذیری سلول‌ها در سایر مطالعات انجام شده می‌باشد. بر خلاف سلول‌های هسته‌دار، دما بر تقلیل گلبول‌های قرمز اثر دارد. میزان تقلیل گلبول‌های قرمز در دمای $4^{\circ}C$ کاهش یافته که نشانگر تأثیر منفی کاهش دما بر میزان رسوب گلبول‌های قرمز می‌باشد. در بررسی اثر RCF بر روند جداسازی، مشاهده شد که در نیروی پایین g ۵۰ سانتریفوژ، در زمان ۱۰ دقیقه، میزان سلول‌های هسته‌دار در مایع شفاف رویی حدود ۷۰درصد بود و با افزایش نیروی سانتریفوژ، در RCF های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و g ۱۰۰۰ درصد سلول‌های هسته‌دار همراه با گلبول‌های قرمز در مایع شفاف رویی کاهش پیدا کرد. به طوری که درg RCF ۱۰۰۰ مایع رویی کاملاً شفاف و فاقد سلول‌های هسته‌دار و گلبول‌های قرمز می‌باشد. در زمان‌های ۱ و ۵ دقیقه نیز درصد تقلیل گلبول‌های قرمز بسیار کم بوده و لذا از این زمان‌ها نمی‌توان به عنوان زمان ایده‌آل نام برد. در این روش نزدیک ۹۰ درصد تقلیل گلبول‌های قرمز و بیش از ۷۶درصد بازیافت سلول‌های هسته‌دار وجود دارد. در این مطالعه سعی شده که به امکان‌پذیری و در دسترس بودن روش جداسازی سلول‌های بنیادی بند ناف در تمام مراکز بانک خون بند ناف با حداقل از دست رفتن سلول‌ها توجه بیشتری شود.

همچنین مواد مورد استفاده در این روش نسبت به سایر روش‌ها ارزان قیمت‌تر و در دسترس‌تر بوده که در نتیجه استفاده از این روش را در قابل دسترسی و راحت می‌کند (۳) علاوه بر ان با توجه به محدودیت حجم اعمال این روش با کاهش تعداد سلول‌های سرخ امکان جداسازی با فایکول بر روی حجم کمتر حاوی سلول‌های سفید را فراهم می‌آورد. همچنین فرآیند جداسازی در این روش طولانی و زمان‌بر نمی‌باشد و در زمان کوتاه ده دقیقه سانتریفوژ بازیابی سلول‌ها بیش از ۷۶درصد می‌باشد. با این وجود به نظر می‌رسد بازیابی درصد سلول‌های هسته‌دار نسبت به برخی روش‌ها با صرف زمان بیشتر، کمتر می‌باشد، که می‌توان با افزودن مرحله فایکول بازیابی سلول‌ها و تقلیل گلبول‌های قرمز را تا حدود ۱۰۰درصد افزایش داد. با وجود این، این روش برای جداسازی سلول‌ها در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی نیز مناسب و در دسترس می‌باشد. همچنین می‌توان اثر سایر فاکتورهای موثر مانند نوع ماده ضد انعقاد و نیز مدت زمان نگهداری نمونه قبل از جداسازی را نیز بررسی و اثر آن‌ها بر فرآیند جداسازی مشخص نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات پرسنل سازمان انتقال خون تبریز و سازمان انتقال خون استان چهارمحال و بختیاری تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1. Bhattacharya A, Slatter MA, Chapman CE, Barge D, Jackson A, Flood TJ, et al. Single centre experience of umbilical cord stem cell transplantation for primary immunodeficiency. Bone Marrow Transplant. 2005;36(4): 295-9.
2. Peters C, Steward CG. Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases:

an overview of outcomes and practice guidelines. Bone Marrow Transplant 2003;31(4): 229-39.

3. Regidor C, Posada M, Monteagudo D, Garaulet C, Somolinos N, Forés R, et al. Umbilical cord blood banking for unrelated transplantation: Evaluation of cell separation and storage methods. Exp Hematol 1999;27(2): 380-5.
4. Dhot PS, Sirohi D, Swamy GLN. Collection, separation, enumeration and cryopreservation of umbilical cord blood haematopoietic stem cells - An experimental study. Med J Armed Forces India 2003;59(4): 298-301.
5. Chularojmontri L, Wattanapitayakul SK. Isolation and characterization of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. J Med Assoc Thai 2009;92 Suppl 3:S88–94.
6. Cairo MS, Wagner JE. Placental and/or Umbilical Cord Blood: An Alternative Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation. Blood. 1997;90(12): 4665-78.
7. Balduzzi A, Gooley T, Anasetti C, Sanders J, Martin P, Petersdorf E, et al. Unrelated donor marrow transplantation in children. Blood 1995;86(8): 3247-56.
8. Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow orumbilical cord blood? Blood 2003;101(11): 4233-44.
9. Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-saito K, Hara Y, et al. Human Umbilical Cord Blood as a Source of Transplantable Hepatic Progenitor Cells. STEM CELLS 2003;21(2): 217-27.
10. Adorno G, Bruno A, Caravita T, Venditti A, Ballatore G, Santinelli S, et al. Red blood cell depletion of cord blood using hydroxyethylstarch double sedimentation: analysis of 40 cases. Clinical & Laboratory Haematology 1998;20(6): 341-4.
11. Epoetin alpha and beta in their erythropoetin isoform compositions and biological properties. Br J Haematol 1998;100(1): 79-89.
12. Koliakos G, Alamdari D, Tsagias N, Kouzi-Koliakos K, Michaloudi E, Karagiannis V. A novel high-yield volume-reduction method for the cryopreservation of UC blood units. Cytotherapy 2007;9(7): 654-9.
13. Hirase N, Yanase T, Mu Y-m, Muta K, Umemura T, Takayanagi R, et al. Thiazolidinedione suppresses the expression of erythroid phenotype in erythroleukemia cell lineK562. Leukemia Research 2000;24(5): 393-400.
14. Solves P, Mirabet V, Planelles D, Blasco I, Perales A, Carbonell-Uberos F, et al. Red blood cell depletion with a semiautomated system or hydroxyethyl starch sedimentation for routine cord blood banking: acomparative study. Transfusion 2005;45(6): 867-73.
15. Nagler A, Peacock M, Okrongly. Red blood cell deplection and enrichment of CD341 hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood using soybean agglutinin and CD34immunoselection. Exp Hematol 1994 .
16. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92(22):10119–22.
17. Sousa T, de Sousa ME, Godinho MI, Mendes C, Carvalhais A, Barbosa IL. Umbilical cord blood processing: volume reduction and recovery of CD34+ cells. Bone Marrow Transplant 1997;19(4):311–3.
18. Almici C, Carlo-Stella C, Mangoni L, Garau D, Cottafavi L, Rizzoli V, et al. Density separation of umbilical cord blood and recovery of hemopoietic progenitor cells: Implications for cord blood banking. STEM CELLS 1995;13(5): 533-40.

19. Aghdami N, NamiriM, Baharvand H. Methods for Isolation of Bone Marrow Stem Cells: Comparative Analysis. Cell Yakhteh 2010;12: 439-46.
20. Warkentin PI, Hilden JM, Kersey JH, Ramsay NKC, McCullough J. Transplantation of Major ABO-Incompatible BoneMarrow Depleted of Red Cells by Hydroxyethyl Starch1. Vox Sanguinis 1985;48(2): 89-104.
21. Treib J, Baron JF, Grauer MT, Strauss RG. An international view of hydroxyethyl starches. Intensive Care Medicine 1999;25(3): 258-68.
22. Kekarainen T, Mannelin S ,Laine J, Jaatinen T. Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. BMC Cell Biology 2006;7: 30.
23. Fraser JK, Cairo MS, Wagner EL, McCurdy PR, Baxter-Lowe LA, Carter SL, et al. Cord Blood Transplantation Study (COBLT): cord blood bank standard operating procedures. J Hematother 1998;7(6):521–61.
24. Schwinger W, Benesch M, Lackner H, Kerbl R, Walcher M, Urban C. Comparison of different methods for separation and ex vivo expansion of cord blood progenitor cells. Annals of Hematology 1999;78(8): 364-70.
25. Bertolini F, Lazzari L, Lauri E, Corsini C, Castelli C, Gorini F, et al. Comparative study of different procedures for the collection and banking of umbilical cord blood. J Hematother 1995;4(1):29–36.
26. Korbling M ,Ross W, Pflieger H, Arnold R, Fliedner T. Procurement of human blood stem cells by continuous-flow centrifugation- -further comment [letter]. Blood 1977;50(4): 753-4.
27. Lapierre V, Pellegrini N, Bardey I, Malugani C, Saas P, Garnache F ,et al. Cord blood volume reduction using an automated system (Sepax) vs. a semi-automated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study. Cytotherapy 2007;9(2): 165-9.

Original Article

OPTIMIZATION OF THE CONDITIONS IN ISOLATION OF NUCLEATED CELLS FROM UMBILICAL CORD BLOOD USING HYDROXYETHYL STARCH

Parvaneh Abbasi[1], Karim Shams asenjan*[2], Aliakbar Movassaghpour[3], Parvin akbarzadelale[4], Fateme sabaghi[5], Abdolnaser Moghadam[6], Nima Dehdilani[7], Parisa Lotfinejad[8]

Received: 18 May , 2013; Accepted: 27 Jul , 2013

Abstract

Background and aims: Implication of Umblical cord blood (UCB) as a safe and rich source of stem cell has opened a new window toward treatment of different disease in regenerative medicine. Many various methods have been exploited to purify the UCB in order to increase the percent of nucleated cells (NCs) and decrease the amount of red blood cells (RBCs) which is required for better outcome of transplantation. Hydroxyl ethyl starch (HES) is a sedimentation factor used for RBCs sedimentation and raised some paradox competence in different studies. Thus, in the present study we are aimed to determine the correlation among HES concentration, centrifugation force, temperature, tube diameter and time on the isolation efficiency of NCs and RBCs sedimentation.

Materials and methods: UCB was collected from the woman who was undergone normal vaginal delivery. The efficiency of isolation was investigated through enumeration and viability of NCs and RBCs in each step on taken UCB beyound the different concentrations of HES (0.5%, 1.1%, 1.8%, 2.5% and 3%), various relative centrifugation forces (RCFs) of 50g, 100g and 200g for 1, 5 and 10 minutes, diverse 22° C, 10°C and 4°C temperatures and different . In addition UCB sample was incubated in 22 ° for 30, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes to test the effect of time on RBCs sedimentation. The height to diameter ratio effect of test tube also was considered.

***Results*:** The mean percents of isolated NCs were 66.8±4.1%, 73.3±3.2%, 75.1±3.6%, 76.9±2.9 % and 69.9±4.3% for the concentrations of 0.5 %, 1.1%, 1.8%, 2.5% and 3% respectively. The most NCs were isolated by employing RCF of 50g and temperature of 22 °. Incubation in 30, 60, 90 minutes led to isolation of 57±2.6%, 63±3.7% and 64±3.1% of NCs. Using of tubes with the diameters of 25 mm and 15 mm resulted in 58±6% and 76±3.8 % isolation**.**

Discussion and conclusion: The number of NCs and RBCs in UBC palys pivotal role in transplantation success. The maximum NCs isolation and RBCs sedimentation percent were 76% and 90% respectively under the following condition: RCF of 50g, centrifugation for 10 minutes, and incubation for 60 minutes ($p<0.05$) and HES 2.5%. Further studies are required to assess the effect of other factors on isolation rate of NCs and RBCs sedimentation.

Key words: umblical cord blood (UBC), Hydroxyl ethyl starch (HES)**,** Nucleated cells (NCs)

Address: Tabriz, Tabriz of University of Medical Sciences, Department of immunology
Tel:+98 9146427690
Email: k.shams@ibto.ir

SOURCE: URMIA MED J 2013: 24(7): 492 ISSN: 1027-3727

[1] *MS hematology of Department of immunology , Tabriz of University of Medical Sciences , Iran Blood Transfusion Center*
[2] *Assistant Professor Hematology, Department of immunology , Tabriz of University of Medical Sciences (Corresponding Author)*
[3] *Assistant Professor Hematology, Department of immunology , Tabriz of University of Medical Sciences*
[4] *PhD, Department of Pharmaceutical Biotechnology , Tabriz of University*
[5] *Research center of iran Blood Transfusion*
[6] *Research center of iran Blood Transfusion*
[7] *East Azerbaijan Blood Transfusion Headquarters*
[8] *MSc Immunology, University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*