

In vitro effects of Erythropoietin stimulated hematopoietic progenitor cells on osteoblastic differentiation

Moslehabadi Farahani M¹, Amirizadeh N², Odi A², Khorshidfar M², Nikougofar Zarif M²

1-Lecturer, M.Sc in Hematology, Department of Hematology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- Department of Hematology, Iranian Blood Transfusion Organization Research Center , Tehran, Iran

Received: 13 Aug 2014, Accepted: 27 Aug 2014

Abstract

Background: Hematopoietic stem cell transplants are routinely used to treat patients with cancers and other disorders of blood and immune systems. Osteoblasts constitute part of the stromal cell support system in marrow for hematopoiesis by participating in the formation of the HSC niche. It is believed that interaction between hematopoietic cells and bone forming osteoblasts regulate each other's function. It is established that acute blood loss in animal models activates bone formation and niche development because of EPO stimulation. In this experimental study we have examined the co-culture of HSCs derived from cord blood which treated with EPO in vitro, on osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells.

Materials and Methods: In this experimental study MSCs isolated from bone marrow and co-cultured with CD 34+ CD38- HSCs isolated from cord blood. These co-cultured cells were treated with different doses of erythropoietin for 14 days, after that RNA were extracted from MSCs and analysed with RT-PCR to evaluate the expression of osteopontin and osteocalcin. Alizarin red and alkaline phosphatase staining were done for osteoblastic differentiation.

Results: Osteopontin and osteocalcin were expressed in MSCs. Cellular staining were positive for osteoblastic differentiation. Differentiated cells expressed osteoblastic markers.

Conclusion: These data suggest that EPO regulates the osteoblastic differentiation from bone marrow MSCs in vitro.

Keywords: Erythropoietin, Osteoblastic differentiation, Cord blood, Hematopoietic stem cells , Mesenchymal stem cells, Osteopontin, Osteocalcin

*Corresponding Author:

Address: Department of Hematology, Arak Medical University, Sardasht , Arak , Iran

Email: Farahanimohammad86@gmail.com

بررسی تأثیر سلول های بنیادی بند ناف تحریک شده با اریتروپویتین روی تمایز استئوبلاستیک سلول های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان در شرایط برون تنی

محمد مصلح آبادی فراهانی^{۱*}، ناصر امیری زاده^۲، آرزو اودی^۲، مونا خورشید فر^۳، مهین نیکوگفتار ظریف^۲

۱- مری، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

۳- کارشناس ارشد هماتولوژی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۵

چکیده

زمینه و هدف: امروزه پیوند سلول های بنیادی خونساز به طور گسترده ای برای درمان بیماران مبتلا به سرطان و دیگر اختلالات خونی استفاده می گردد. استئوبلاست ها بخشی از سلول های استرومال مغز استخوان می باشند که خون سازی را با تشکیل نیچ حمایت می کنند. عقیده بر این است که سلول های خونساز و استئوبلاست ها، فعالیت های یکدیگر را تنظیم می کنند. ثابت شده است که از دست دادن حاد خون در مدل های حیوانی، تشکیل استخوان و توسعه نیچ را به دلیل تحریک اریتروپویتین فعال می کند. در این مطالعه تجربی تأثیر سلول های بنیادی خونساز جدا شده از خون بند ناف که با اریتروپویتین تیمار شده اند، روی تمایز استئوبلاستیک سلول های بنیادی مزانشیمال بررسی شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی سلول های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان جدا و با سلول های بنیادی خونساز CD34⁺, CD38⁻ خون بند ناف، تحت تأثیر دوزهای متفاوت اریتروپویتین به مدت ۱۴ روز کشت همزمان داده شد، RNA سلول های مزانشیمال استخراج و از روش RT-PCR برای ارزیابی بیان ژن های استئوپوننتین و استئوکلسین استفاده گردید. رنگ آمیزی های آلکالین فسفاتاز و آلیزارین رد و فلوسایتومتری بر روی سلول های تمایز یافته صورت گرفت.

یافته ها: نتایج نشان دادند ژن های استئوپوننتین و استئوکلسین در سلول های مزانشیمال بیان شدند، رنگ آمیزی های آلکالین فسفاتاز و آلیزارین رد مثبت بود. سلول های تمایز یافته مارکرهای استئوبلاست ها را عرضه کردند.

نتیجه گیری: بر اساس این نتایج اریتروپویتین از طریق تأثیر بر سلول های بنیادی خونساز در کشت همزمان، باعث تمایز استئوبلاستیک سلول های مزانشیمال مغز استخوان می گردد.

واژگان کلیدی: اریتروپویتین، تمایز استئوبلاستیک، سلول های بنیادی خون ساز، خون بند ناف، سلول های بنیادی مزانشیمال، استئوپوننتین، استئوکلسین

*نویسنده مسئول: سردشت، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پیراپزشکی

Email: Farahanimohammad86@gmail.com

مقدمه

سلول های بنیادی خونساز (Hemayopoietic stem Cells-HSCs) دارای هر دو قابلیت خودنوسازی و تمایز بوده و این فعالیت ها نیز اغلب در نیچ های (Niche) واقع در مغز استخوان صورت می گیرند. مطالعات مورفولوژیک و برون تنی حاکی از آن است که نیچ های HSC، از مشارکت تعدادی از سلول های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) با عملکردهای مشابه و محدود، حاصل می گردند (۱-۳). مجاورت آناتومیک استئوبلاست ها و سلول های بنیادی خون ساز یک ارتباط دو طرفه را بین این سلول ها ایجاد می کند. این ارتباط و هم چنین تولید فاکتورهای رشد خون ساز متنوع توسط استئوبلاست ها نقش بالقوه ای را برای استئوبلاست ها در تنظیم HSC ها به همراه دارد (۴-۶). در مطالعات انجام شده در شرایط برون تنی و درون تنی ثابت شده است که حذف استئوبلاست ها منجر به تخلیه سلول های خون ساز از جمله HSC ها می شود که تاییدی در حمایت استئوبلاست ها از سلول های خون ساز است (۱). با توجه به نقش حمایتی استئوبلاست ها در توسعه Niche سلول های بنیادی، تاثیر متقابل HSC ها بر روی استئوبلاست ها مورد توجه قرار گرفته است و به نظر می رسد یکی از فاکتورهای موثر در توسعه استئوبلاست ها اثر اریتروپوئیتین (Erythropoietin-EPO) بر سلول های خونساز می باشد و همان طور که واضح است سطح EPO در پاسخ به از دست رفتن گلبول های قرمز افزایش می یابد (۷). مطالعات اخیر نشان داده است که سلول های بنیادی خونساز جدا شده از حیواناتی که با یک خونریزی حاد مواجه شده اند باعث تمایز استئوبلاستی سلول های استرومایی مغز استخوان می شوند. این امر نشان می دهد که سلول های بنیادی خونساز در تشکیل استخوان شرکت می کنند که پایه ملکولی این فعالیت تولید BMP2 و BMP6 توسط HSC هاست. نشان داده شده است که EPO مسیر پیام رسانی Jak-Stat را در HSC ها فعال می کند که منجر به تولید BMP ها می شود (۸). از آنجا که مطالعه ای در مورد اثر EPO روی هم کشتی سلول های مزانشیمال و سلول های بنیادی خونساز انسان صورت نگرفته، در این مطالعه تصمیم

گرفتیم تاثیر HSC های جدا شده از خون بند ناف را که با اریتروپوئیتین در شرایط برون تنی تیمار شده اند، روی تمایز استئوبلاستیک سلول های بنیادی مزانشیمال بررسی کنیم.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی نمونه خون بند ناف از نوزادان فول ترم و مادران با زایمان طبیعی و اخذ رضایت نامه کتبی از والدین نوزادان و به صورت استریل؛ توسط کارشناسان مامایی تهیه شد.

آماده سازی محیط ها

محیط تمایزی اریتروئیدی: از سایتوکاین های استوک به ترتیب زیر محیط تمایزی اریتروئیدی حاوی 3 u/ml rh (Stem cell technologies) erythropoietin، و 50 ng/ml rh SCF (Stem cell technologies) factor، 10 ng/ml rh IL-3 در ویال های ۱ میلی لیتری الیکوت شد.

تهیه محیط حاوی EPO با غلظتهای ۵، ۱۰ و ۲۰ u/ml: از استوک erythropoietin که حاوی ۵۰۰ u/ml اریتروپوئیتین بود به ترتیب ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر در ۵ میلی لیتر محیط Stem span حل شد.

جداسازی سلول های تک هسته ای از خون بند ناف

۳ نمونه خون بند ناف (با میانگین حجمی معادل ۸۰ میلی لیتر) در کیسه های مخصوص خون بند ناف حاوی ماده ضد انعقاد و نگه دارنده CPD-A1 جمع آوری شد. نمونه خون بند ناف به نسبت ۱ به ۳ با بافر فسفات (PBS) حاوی آلبومین و بسته به هماتوکریت آن با هیدروکسی اتیل استارچ، مخلوط گردید. پس از رسوب گلبول های قرمز محلول رویی به یک لوله دیگر منتقل شد و به مدت ۷ دقیقه با دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. سپس رسوب حاصله در ۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون پلاسما مخلوط گردید. سپس لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید (۵ دقیقه اول با دور rpm ۱۱۰۰ و ۲۵ دقیقه دوم دور rpm ۲۲۰۰). پس از سانتریفوژ لایه بافی کوت جدا شد. در

و در محیط کشت اختصاصی (سیگما-آمریکا) DMEM-Low Glucose با ۱۰ درصد FBS (اینویترورژن - آمریکا)، ۱ درصد پنی سیلین و ۱ درصد استرپتومایسین (سیناژن- ایران) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند. دو روز پس از کشت اولیه، سلول های غیر چسبنده بوسیله تعویض محیط کشت حذف شدند اما سلول های مزانشیمی به کف فلاسک چسبیدند. در نهایت سلول های بنیادی مزانشیمال (Mesenchymal stromal cells-MSCs) حاصل از پاساژ چهارم جهت مطالعه مورد نظر فراهم شدند. به منظور تایید سلول های بنیادی مزانشیمال جدا شده در مراحل قبل، پس از رشد سلول ها در محیط کشت اختصاصی، خصوصیات مورفولوژیکی (شکل ظاهری) سلول ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس و هم چنین حضور مارکرهای سطحی اختصاصی سلول های بنیادی مزانشیمال به وسیله فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. شمارش سلول ها و تعیین میزان زنده بودن آنها انجام شد.

برای تایید سلول های مزانشیمی از تکنیک فلوسایتومتری و با استفاده از آنتی بادی های ضد CD105 و CD166 نشان دار شده با PE و آنتی بادی های ضد CD90 و CD44 نشان دار شده با EITC (داکو-دانمارک) استفاده شد.

کشت و تمایز سلول های مزانشیمی در

حضور عوامل تمایز دهنده: کشت و تمایز سلول های مزانشیمی در حضور عوامل تمایز دهنده مطابق پروتکل کیت Chemicon انجام شد.

کشت هم زمان سلول های بنیادی خونساز

و مزانشیمی: جهت بررسی تأثیر HSC ها بر تمایز MSC ها به سمت سلول های استئوبلاست، با توجه به این که تا پیش از این کاری در این زمینه بر روی سلول های بنیادی انسانی مذکور صورت نگرفته بود، تمام جزئیات و مراحل کار پس از تکرارهای متوالی حاصل و پروتکل زیر طراحی گردید. این آزمایش شامل دو گروه تست و کنترل بود: ۱- گروه تست شامل MSC هایی که با HSC ها تحت تاثیر ۳ دوز متفاوت EPO و هم چنین یک گروه از HSC ها که تحت

نهایت محلول رویی کاملاً خارج شده و رسوب باقی مانده در ۱۰۰-۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS حاوی آلومین حل گردید و از فیلترهای ۳۵ میکرونی عبور داده شد. سپس دو مرحله با بافر PBS حاوی آلومین شستشو داده شد (به مدت ۸ دقیقه با دور ۱۵۰۰rpm سانتریفوژ شد) و رسوب در ۱ میلی لیتر بافر PBS حاوی آلومین حل شد.

جداسازی سلول های CD34⁺ به روش MACS و گزینش مثبت صورت گرفت و ارزیابی درجه خلوص سلول های CD34 با استفاده از آنتی بادی منوکلونال نشان دار شده با EITC صورت گرفت.

سپس شمارش سلولی با استفاده از لام نتوبار انجام شد و برای تعیین درصد سلول های زنده از روش Dye exclusion استفاده شد.

ارزیابی توانایی کلنی زائی سلول های CD34+

جدا شده: یک ویال از محیط H4435 Methocult که به صورت فریز نگهداری می شود ذوب گردید. تعداد ۱۰۰۰ سلول از سلول های CD34⁺ تازه به آن اضافه شد، این مرحله به صورت دوپلیکیت انجام گرفت. سلول ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ قرار داده شد و در مدت ۱۶-۱۴ روز انکوباسیون به کلونی های واحد تکثیر و تمایز پیدا کردند. پس از ۱۶-۱۴ روز کلونی ها به وسیله استرئو میکروسکوپ و به کمک یک پلیت ۱۰۰ میلی متری تقسیم بندی شده شمارش شدند.

جدا سازی سلول های تک هسته ای مغز استخوان:

مقدار ۱۰ میلی لیتر نمونه آسپیراسیون مغز استخوان یک اهدا کننده سالم (با کسب رضایت)، به وسیله متخصص مربوطه در مرکز خون و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی گرفته شد و بعد از انتقال نمونه به لوله های حاوی ضد انعقاد هپارین، تحت شرایط استریل در درجه حرارت ۲-۸ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه مرکز تحقیقات انتقال خون ایران منتقل شد. به طور خلاصه، سلول های تک هسته ای که سلول های مزانشیمی نیز جزء این دسته از سلول ها هستند، با استفاده از فایکول (Amersham bio sciences, Sweden) و روش گرادینت غلظت جداسازی

تاثیر سایتوکاین های تمایزی اریترئیدی قرار گرفته بودند هم کشتی داده شده و سپس سلول های مزانشیمال از نظر تمایز استئوبلاستی مورد بررسی قرار گرفتند. ۲- گروه کنترل شامل MSCهایی که در هم کشتی با HSCها بدون استفاده از هر گونه سایتوکاینی قرار گرفتند، استفاده شد. قابل ذکر است که سلول های MSC در هر ۲ گروه از یک اهدا کننده و از یک پاساژ سلولی برداشت شده اند و تمام مراحل کار ۳ بار تکرار شده است.

تشکیل لایه استرومال مزانشیمی: به منظور

مهیا نمودن شرایط کشت هم زمان، ابتدا سلول های مزانشیمال در محیط کشت ۶ خانه ای با محیط DMEM low glucose ریخته شد. پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار ۵ درصد CO₂ قرار داده شد و هر ۳ روز یک بار محیط چاهک ها تعویض شد تا به هم پوشانی ۸۰ درصد رسید. سپس محیط چاهک ها به دقت تخلیه شد و توسط PBS شستشو داده شد.

اضافه نمودن سلول های بنیادی CD34⁺

جهت کشت هم زمان: به هر چاهک تعداد ۱×۱۰^۵ سلول CD34⁺, CD38⁻ حاوی محیط Stem Span (Stem cell technologies) اضافه شد که چاهک های استفاده شده در این مطالعه به صورت سه تایی (Triplicate) به قرار زیر بودند: ۱- کشت هم زمان سلول های مزانشیمال با سلول های CD34⁺, CD38⁻ با استفاده از محیط تمایزی اریترئیدی (EPO, SCF, IL3). ۲- کشت هم زمان سلول های مزانشیمال با سلول های CD34⁺, CD38⁻ با استفاده از محیط حاوی ۵ واحد در میلی لیتر EPO: به این چاهک ۵۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۵ واحد در میلی لیتر اریترئوپوئین اضافه شد. ۳- کشت هم زمان سلول های مزانشیمال با سلول های CD34⁺, CD38⁻ با استفاده از محیط حاوی ۱۰ واحد در میلی لیتر EPO: به این چاهک ۵۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۱۰ واحد میلی لیتر اریترئوپوئین اضافه شد. ۴- کشت هم زمان سلول های مزانشیمال با سلول های CD34⁺, CD38⁻ با استفاده از محیط حاوی EPO 20 /ml

۱: به این چاهک ۵۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۲۰ واحد در میلی لیتر اریترئوپوئین اضافه شد. ۵- کشت هم زمان سلول های مزانشیمال با سلول های CD34⁺, CD38⁻ بدون استفاده از هر گونه سایتوکاین (کنترل منفی): به منظور پایش تست، به این چاهک فقط محیط Stem span اضافه شد. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار ۵ درصد CO₂ انکوبه گردیدند. هر دو روز یک بار محیط های کشت با محیط تازه حاوی سایتوکاین های مربوط به هر چاهک، تعویض گردید. سلول ها به مدت ۲ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند.

در پایان و در روز چهاردهم، ۳۰۰۰۰ عدد از سلول های چاهک حاوی محیط تمایزی اریترئیدی و چاهک های حاوی سلول های تحریک شده با اریترئوپوئین از نظر مارکرهای CD38 و CD34، CD71، Gly.A با استفاده از فلوسایتومتری بررسی شدند.

واکنش RT-PCR: پس از اتمام مدت کشت و

خارج نمودن سلول های HSC دو گروه تست و کنترل، سلول های MSC برای استخراج RNA جدا شدند. واکنش RT-PCR در این مطالعه با استفاده از AccuPower PreMixSerieskit (Bioneer) و طبق پروتکل آن صورت گرفت.

واکنش PCR: از ژن GAPDH به عنوان کنترل

در واکنش PCR ژن استوکلسین و استئوپونین استفاده شد. این واکنش با استفاده از کیت Takara و طبق پروتکل آن صورت پذیرفت. در ابتدا مخلوط واکنش PCR در دو قسمت جهت بررسی بیان ژن های OPN و OCN تهیه شد. برای کنترل منفی و مثبت نیز به همان صورتی که مخلوط واکنش برای نمونه های مذکور شرح داده شد، تهیه گشت. در این مطالعه طول قطعه مورد شناسایی توسط پرایمرهای رفت و برگشت استئوپونین مورد استفاده، ۵۰۰bp و طول قطعه مورد شناسایی توسط پرایمرهای رفت و برگشت استوکلسین مورد استفاده، ۴۰۰bp بود (جدول ۱).

جدول ۱. پرایمرزن های (GAPDH) استئوپونتین و استئوکلسین

سکانس	دمای ذوب	رفت و برگشت
5'-TGA GAG CAA TGA GCA TTC CGA TG-3'	۶۸	رفت OPNF
5'-CAG GGAGTT TCC ATG AAG CCA C-3'	۶۸	برگشت OPNF
5'-AGC GAG GTA GTG AAG AGA-3'	۵۴	رفت OCNF
5'- AGG GGA AGA GGA AAG AAG-3'	۵۴	برگشت OCNF
5'-CCACTCCTCCACCTTTGACGCT -3'	۵۹	رفت GAPDH
5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGTGGG-3'	۵۹	برگشت GAPDH

CD34+,CD38- جدا شده با استفاده از روش فلوسایتومتری $84/27 \pm 5/6$ درصد و نیز میانگین درصد زنده ماندن سلول های جدا شده حدود $93 \pm 3/6$ درصد بود (جدول ۳).

رنگ آمیزی آلیزارین رد و آلکالین

فسفاتاز: این رنگ آمیزی ها با استفاده از کیت سیگما و طبق پروتکل مربوطه صورت پذیرفت. سلول های رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۲. نتایج حاصل از جدا سازی سلول های تک هسته ای

درصد زنده ماندن	MNC	حجم نمونه (میلی لیتر)
۸۷	1.6×98	۱۰۵
۹۲	1.6×101	۹۰
۸۹	1.6×96	۱۰۱
2 ± 89	$1.6 \times 2/5 \pm 98/3$	میانگین

یافته ها

درصد خلوص، درصد زنده ماندن و

تعداد سلول های $CD34^+$ جدا شده: با استفاده از فایکول سلول های تک هسته ای خون بند ناف جدا شد. میانگین تعداد این سلول ها حدود $98/3 \pm 5/2 \times 10^6$ سلول تک هسته ای و میانگین درصد زنده ماندن آنها 89 ± 2 درصد (جدول ۲) بود. میانگین درصد خلوص سلول های

جدول ۳. خصوصیات ایمنوفنوتیپی و درصد زنده ماندن سلول های $CD34^+CD38^-$ جدا شده با روش MACS

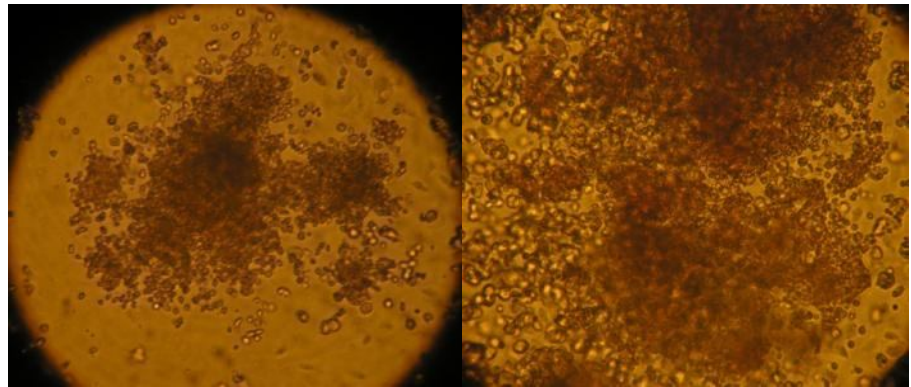
درصد زنده ماندن	(%CD38)	درجه خلوص (%CD34)	CD34+	حجم نمونه (میلی لیتر)
۹۷	۲۴/۷۹	۷۸/۱	1.5×18	۱۱۰
۹۲	۲۹/۳۱	۸۵/۴	1.5×11	۸۴
۹۰	۱۹/۰۲	۸۹/۳	1.5×14	۹۸
$93 \pm 3/6$	$24/37 \pm 5/1$	$84/27 \pm 5/6$	$1.5 \times 2/5 \pm 1.5 \times 14/3$	میانگین

شمارش شد. تعداد کلنی های تشکیل شده از کشت سلول های $CD34^+$ تازه جدا شده از خون بند ناف 90 ± 24 بود (شکل ۱).

بررسی میزان توان کلنی زائی (CFU-

assay) سلول های $CD34^+$ تازه:

توان کلنی زائی سلول های $CD34^+$ تازه جدا شده از خون بند ناف با استفاده از محیط متاکالت بررسی شد. پس از ۱۴ روز کشت کلنی های تشکیل شده با اندازه های متفاوت در محیط کشت



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپی CFU-assay در محیط متاکالت (بزرگنمایی $\times 40$)

ذکر شده در بخش قبل تأیید شدند. جدول ۴ نتایج آنالیز فلوسایتومتری را نشان می دهد.

کشت اولیه سلول ها در حدود ۱۰ تا ۱۴ روز طول کشید. در نهایت در روز ۱۴، سلول های مزانشیمی بیش از ۸۰ درصد کف فلاسک را پوشاندند. سپس سلول های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری، مطابق روش

جدول ۴. خصوصیات ایمنوفنوتیپی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

CD34 ⁺	CD45 ⁺	CD44 ⁺	CD105 ⁺	CD166 ⁺	CD90 ⁺	خصوصیات ایمنوفنوتیپی
۳/۴±۲	۴/۶±۳	۹/۶±۷/۳	۹۰±۹/۱	۹۴/۲±۶/۵	۹۱/۴±۸/۱	درصد

بررسی بیان مارکرهای سطحی در

سلول های هماتوپوئیتیک: پس از ۱۴ روز کشت سلول های CD34⁺ در شرایط هم کشتی با سلول های مزانشیمال و غلظت های مختلف EPO و نیز محیط حاوی سایتوکاین های تمایز اریترئوئید میانگین بیان مارکرهای سطحی به صورت زیر می باشد: (جدول ۶).

ارزیابی تعداد و Viability سلول های هماتوپوئیتیک در روز چهاردهم کشت در جدول ۵ آمده است.

جدول ۵. تعداد سلول ها و درصد زنده ماندن آنها پس از روز چهاردهم هم کشتی

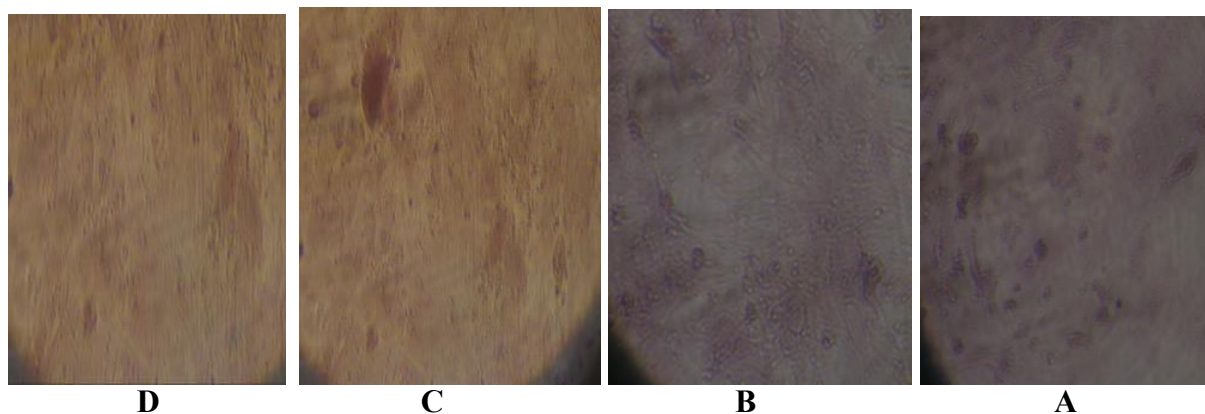
چاهک	تعداد سلول ها	درصد زنده ماندن سلول ها
چاهک حاوی EPO با غلظت 5 u/ml	$1.0^2 \times 11 \pm 1.0^4 \times 24$	۹۷±۳۰
چاهک حاوی EPO با غلظت 10 u/ml	$1.0^2 \times 22 \pm 1.0^4 \times 75$	۹۶±۲۵
چاهک حاوی EPO با غلظت 20 u/ml	$1.0^2 \times 34 \pm 1.0^4 \times 68$	۲۳±۹۷
چاهک حاوی سایتوکاین تمایز اریترئوئیدی	$1.0^5 \times 13 \pm 1.0^6 \times 3$	۳۶±۹۱

جدول ۶. درصد بیان مارکرهای CD38، CD71، GlycophorinA و CD34 در چاهک های تست

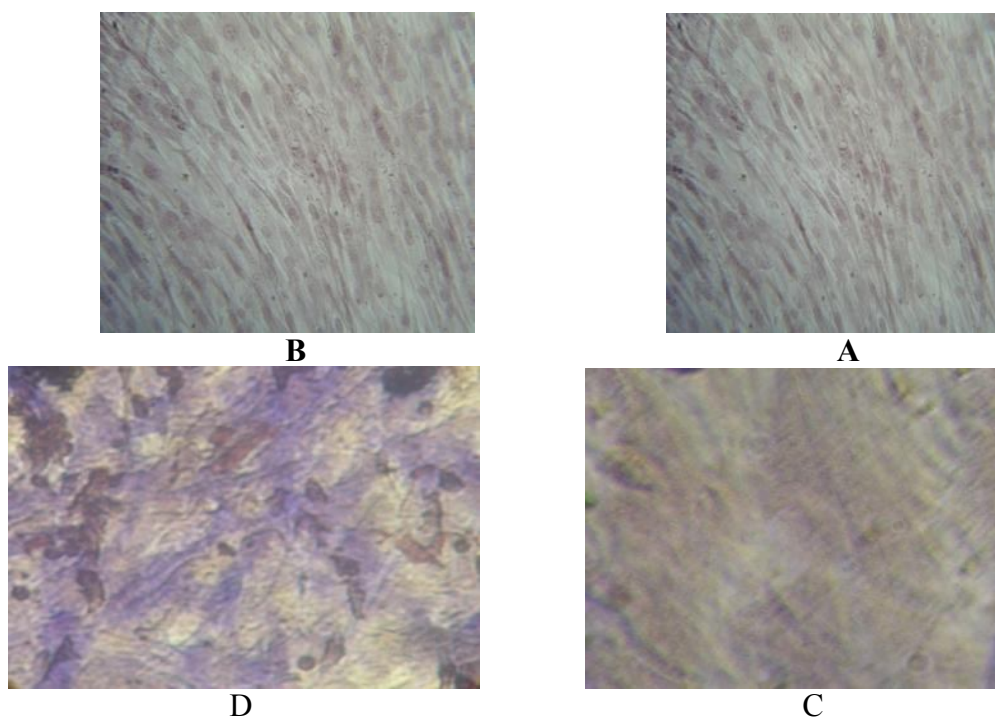
GlycophorinA	% CD71	% CD38	% CD34	شرایط کشت
۸۷/۲±۷	۹۵/۸±۶/۴	*	*	چاهک حاوی سایتوکاین تمایز اریتروئیدی
*	*	۲۴/۷±۷	۴۹/۱±۴/۴	چاهک حاوی EPO با غلظت 5 u/ml
*	*	۲۰/۴±۶/۸	۶۲/۴±۶/۲	چاهک حاوی EPO با غلظت 10 u/ml
*	*	۲۲/۹±۵/۶	۶۷/۱±۵/۸	چاهک حاوی EPO با غلظت 20 u/ml

مورفولوژیکی به صورت رشد فشرده سلول ها را نمایان ساخت (شکل ۲ و ۳). در سلول های مزانشیمی تمایز یافته میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافته که بیان گر تمایز این سلول ها به سلول های رده استئوبلاستیک می باشد. نتایج حاصل از PCR ژن های استئوپوننتین و استئوکلسین در سلول های مزانشیمی در دو گروه کنترل و تست نشان می دهد ژن های استئوپوننتینو استئوکلسین در سلول های مزانشیمی کشت داده شده به خوبی بیان می شوند (شکل ۴ و ۵).

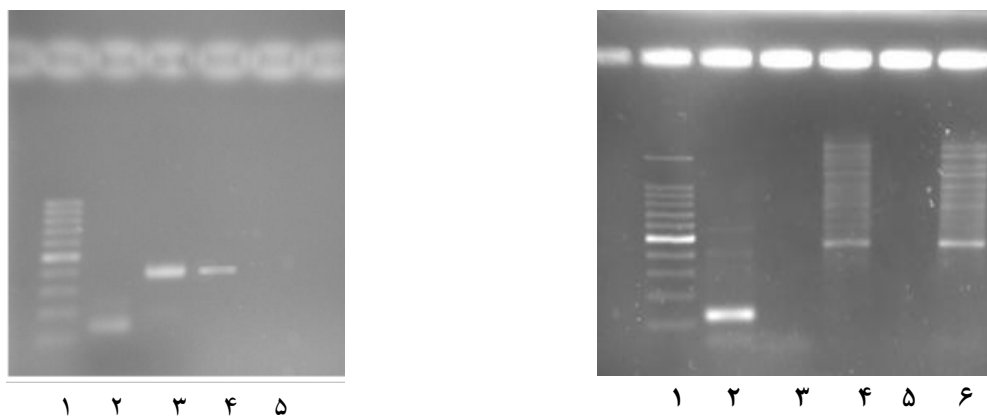
ارزیابی توانایی تمایز سلول های مزانشیمی به استئوبلاست در دو گروه تست و کنترل (رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز و آلیزارین رد): روی چاهک های تست و کنترل، در روز چهاردهم پس از کشت هم زمان، رنگ آمیزی های آلکالین فسفاتاز و آلیزارین رد انجام گرفت. از آنجا که هدف ما در این مطالعه تمایز استئوبلاستیک سلول های مزانشیمال تحت تاثیر هم کشتی این سلول ها با HSC ها بود، بلافاصله پس از اتمام روز چهاردهم رنگ آمیزی های آلکالین فسفاتاز و آلیزارین رد روی چاهک ها انجام شد (بدون استفاده از محیط تمایزی استئوبلاستی). مطالعه میکروسکوپی سلول ها، تغییرات



شکل ۲. (A) رنگ آمیزی آلیزارین رد مربوط به چاهک 5 u/ml rh EPO در روز چهاردهم (منفی)، (B) رنگ آمیزی آلیزارین رد مربوط به چاهک 10 u/ml rh EPO در روز چهاردهم (مثبت)، (C) رنگ آمیزی آلیزارین رد مربوط به چاهک 20 u/ml rh EPO در روز چهاردهم (مثبت) و (D) رنگ آمیزی آلیزارین رد مربوط به چاهک حاوی سایتوکاین تمایز اریتروئیدی در روز چهاردهم (منفی)، (بزرگ نمایی ۴۰x).



شکل ۳. رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز در سلول های مزانشیمی کشت داده شده با HSC ها در گروه مربوط به چاهک 5 u/ml rh EPO (منفی) (A) و در گروه مربوط به چاهک حاوی سایتو کاین تمایز اریتروئیدی (منفی) (B) و در گروه مربوط به چاهک حاوی 10 u/ml rh EPO (C) و در گروه مربوط به چاهک حاوی 20 u/ml rh EPO (مثبت بود) (بزرگ نمائی 40x).



شکل ۵. بیان ژن های استئوکلسین (OCN) و GAPDH در سلول های مزانشیمی کشت داده شده با سلول های هماتوپوئیتیک. (۱) نشانگر شاخص وزن مولکولی (DNA Size Marker 100bp). (۲) بیان ژن گلیسرآلدئید فسفات (۳) بیان ژن استئوکلسین در شرایط هم کشتی حاوی 20 EPO u/ml (۴) بیان OCN در شرایط هم کشتی حاوی 10 EPO u/ml (۵) بیان OCN در شرایط هم کشتی حاوی محیط تمایز اریتروئید.

شکل ۴. نشانگر شاخص وزن مولکولی (DNA Size Marker 100bp) است. (۲) بیان ژن GAPDH در سلول های مزانشیمی (۳) بیان ژن OPN در شرایط هم کشتی حاوی محیط تمایز اریتروئید (۴) بیان OPN در شرایط هم کشتی حاوی 10 u/ml EPO (۵) بیان OPN در شرایط هم کشتی حاوی 5 u/ml EPO (۶) بیان OPN در شرایط هم کشتی حاوی 20 u/ml EPO

بحث

در مطالعات صورت پذیرفته توسط محققین متعددی از جمله تاکنم و همکاران ارتباط تنگاتنگی میان سلول های بنیادی خونساز و سلول های استئوبلاست مشاهده گردید که به موجب آن، HSC ها بیان فعالیت های حمایتی خونسازی را از طریق سلول های استئوبلاست القا می نمایند لذا این فرضیه مطرح می شود که ارتباط متقابل میان این دو سلول، جهت توسعه و نمو هر دو جمعیت سلولی، امری ضروری می باشد (۹). همان طور که پیش تر بیان گردید، امروزه نقش استئوبلاست ها در حمایت از HSC ها و خون سازی به خوبی ثابت شده است. نقش Niche استئوبلاستیک در هماتوپوئز و القای خاموشی HSC ها بسیار حیاتی بوده و در مطالعات انجام شده در شرایط برون تنی و درون تنی ثابت شده است که حذف استئوبلاست ها منجر به تخلیه سلول های خون ساز از جمله HSC ها می شود که تاییدی در حمایت استئوبلاست ها از سلول های خون ساز است (۸). با توجه به نقش حمایتی استئوبلاست ها در توسعه Niche سلول های بنیادی، تاثیر متقابل HSC ها بر روی استئوبلاست ها مورد توجه قرار گرفته است و به نظر می رسد یکی از فاکتورهای موثر در توسعه استئوبلاست ها اثر EPO بر سلول های خونساز می باشد و همان طور که واضح است سطح EPO در پاسخ به از دست رفتن گلبول های قرمز افزایش می یابد (۷، ۸). اخیرا نشان داده شده است که سلول های بنیادی خونساز جدا شده از حیواناتی که با یک خونریزی حاد مواجه شده اند باعث تمایز استئوبلاستی سلول های استرومایی مغز استخوان می شوند. این امر نشان می دهد که سلول های بنیادی خونساز در تشکیل استخوان شرکت می کنند که پایه ملکولی این فعالیت تولید BMP2 و BMP6 توسط HSC ها است (۸). کیم و همکاران نشان دادند که ممانعت از پیام رسانی mTOR توسط راپامایسین باعث بلوکه شدن فنوتیپ های استئوبلاستیک وابسته به EPO و مستقل از EPO به ترتیب در سلول های استرومایی مغز استخوان انسان (hBMSCs) و سلول های ST2 می شود. این یافته ها قویا نشان می دهند که پیام رسانی از طریق mTOR نقش مهمی را در هموستاز استخوانی وابسته به EPO بازی

می کند (۱۰). حیواناتی که هدف خونریزی قرار گرفتند، افزایشی با معنی در میزان معدنی شدن استخوان، تعداد استئوبلاست ها و سطوح سرمی پپتید رشد استخوان ساز داشتند. این یافته ها پیشنهاد می دهد که خونریزی تنها، بدون ترومای اسکلتی، ممکن است باعث القای پاسخ استئوژنیک شود که فرایندی فیزیولوژیک می باشد (۸، ۱۱، ۱۲). مطالعات گذشته یک ارتباط متقابل بین HSCs و استئوبلاست ها را پیشنهاد می دهد که به موجب آن HSCs باعث افزایش القای فعالیت های حمایتی خون سازی توسط استئوبلاست ها می گردند (۱۳-۱۵). بنابراین، این فرضیه مطرح شد که ارتباط دوطرفه بین HSCs و استئوبلاست ها برای توسعه هر دو جمعیت ستوتی ضروری است. اطلاعات ارائه شده در این طرح پیشنهاد می کنند که HSCs جدا شده از خون بند ناف قادر به تمایز استئوبلاستیک سلول های مزانشیمال مغز استخوان تحت شرایط خاص کشت در حضور EPO هستند. سلول های تیمار شده با غلظت های ۱۰ و ۲۰ واحد در میلی لیتر اریتروپوئین باعث تمایز استئوبلاستیک سلول های مزانشیمال شدند در حالی که سلول های تیمار شده با غلظت ۵ واحد در میلی لیتر اریتروپوئین و سلول های حاوی محیط تمایزی اریتروئیدی هیچ گونه تمایز استئوبلاستیک را موجب نشدند. با توجه به مطالب گذشته می توان گفت که ترشح BMP 2 و BMP 6 توسط HSCs مسئول این تمایز می باشد. هم چنین این یافته ها نشان می دهند که سلول های بنیادی خون ساز در Niche خود به صورت غیر فعال نمی باشند و در یک تعادل دینامیک با سایر سلول های استرومال مغز استخوان قرار دارند. با توجه به موضوعات اشاره شده در بالا، پس از کشت هم زمان سلول های HSC تحریک شده با EPO با سلول های MSC انتظار داشتیم که HSC های تحریک شده با EPO، سبب تمایز استئوبلاستیک سلول های مزانشیمال شوند. برای اثبات این فرضیه، پس از اتمام هم کشتی از رنگ آمیزی های آلکالین فسفاتاز و آلزارین رد و هم چنین بررسی بیان دو ژن مهم تمایز استئوبلاستیک، استئوکلسین و استئوپونین استفاده نمودیم. نتایج حاصله برای هر دو روش رنگ آمیزی سلولی و بررسی بیان ژن ها مثبت بود. در حالی که در سلول های

5. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *The Journal of clinical investigation*. 2006; 116(5): 1195-201.
6. Maeda H, Hitomi Y, Hirata R, Tohyama H, Suwata J, Kamata S, et al. The effect of phlebotomy on serum erythropoietin levels in normal healthy subjects. *International journal of hematology*. 1992;55(2):111-5.
7. Shiozawa Y, Jung Y, Ziegler AM, Pedersen EA, Wang J, Wang Z, et al. Erythropoietin couples hematopoiesis with bone formation. *PloS one*. 2010;5(5):e10853-4.
8. Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood*. 1996;87(2):518-24.
9. Kim J, Jung Y, Sun H, Joseph J, Mishra A, Shiozawa Y, et al. Erythropoietin mediated bone formation is regulated by mTOR signaling. *Journal of cellular biochemistry*. 2012; 113(1):220-8.
10. Lucas TS, Bab IA, Lian JB, Stein GS, Jazrawi L, Majeska RJ, et al. Stimulation of systemic bone formation induced by experimental blood loss. *Clinical orthopaedics and related research*. 1997;340:267-75.
11. McGee S, Havens A, Shiozawa Y, Jung Y, Taichman R. Effects of erythropoietin on the bone microenvironment. *Growth Factors*. 2012; 30(1): 22-8.
12. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*. 2004; 103(9): 3258-64.
13. Calvi L, Adams G, Weibrecht K, Weber J, Olson D, Knight M, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-6.
14. Haylock DN, Nilsson SK. Perspective Stem Cell Regulation by the Hematopoietic Stem Cell Niche. *Cell Cycle*. 2005;4(10):1353-5.
15. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine reviews*. 2000; 21(4):393-411.

گروه کنترل، رنگ آمیزی های سلولی منفی بود و بیان این ژن ها مشاهده نگردید. این نتایج همگی تأیید می نمایند که سلول های HSC تحریک شده با EPO در شرایط درون تنی باعث تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست می شوند. با استناد به نتایج حاصله اثبات گردید که سلول های HSC انسانی -CD34+CD38 جدا شده از خون بند ناف قادرند سبب تمایز سلول های MSC انسانی به دست آمده از مغز استخوان به سلول های استئوبلاست شوند و به عبارت دیگر بتوانند Niche خود را تنظیم نموده و سبب گسترش Niche استئوبلاستیک گردند.

نتیجه گیری

در این مطالعه علاوه بر اثبات مجدد ارتباط دو طرفه سلول های MSC و سلول های HSC انسانی -CD34+CD38، می توان نتیجه گرفت اریتروپویتین نیز یکی از فاکتورهای موثر در استوژنز می باشد.

تشکر و قدردانی

در پایان لازم است از مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران به دلیل تامین منابع مالی تشکر و قدردانی به عمل آوریم.

منابع

1. Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(5):1677-82.
2. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*. 2005;439(7076):599-603.
3. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118(2):149-61.
4. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends in biochemical sciences*. 2006;31(10):589-95.