مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه‌ای سه روش مختلف پردازش خون بند ناف: هیدروکسی اتیل استارچ، سانتریفیوژ ساده و سامانه خودکار سپکس

محمد محمد زاده وردین* [۱و۲]، مهین نیکوگفتار ظریف [۱]، احمد قره باغیان [۳]، ناصر امیری زاده [۱]، مهریار حبیبی رودکنار [۴]، محسن سقاء [۵]، شهرام وائلی [۶]

[۱] PhD هماتولوژی و بانک خون، استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران

[۲] PhD هماتولوژی و بانک خون، استادیار مرکز تحقیقات جنین شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

[۳] PhD ایمونوهماتولوژی بالینی، استاد دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماری‌های مادرزادی خونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۴] PhD بیوتکنولوژی پزشکی، دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران

[۵] PhD علوم تشریح، استادیار مرکز تحقیقات جنین شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

[۶] دکترای علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

نشانی نویسنده مسئول: اردبیل، خیابان دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، محمد محمد زاده وردین

E-mail: m.mohammadzadeh@arums.ac.ir

وصول:۹۳/۳/۲۸، اصلاح:۹۳/۴/۲۹، پذیرش:۹۳/۵/۶

چکیده

زمینه و هدف: به منظور ارتقای کیفیّت پیوند سلول‌های بنیادی خون ساز، روش‌های پردازش متعدّدی به کار می‌روند. هدف این مطالعه مقایسه سه روش پردازش متداول هیدروکسی اتیل استارچ، سانتریفیوژ ساده و نیز سامانه خودکار سپکس بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۹۰ نمونه خون بند ناف توسّط روش‌های هیدروکسی اتیل استارچ، سانتریفیوژ ساده و نیز سامانه خودکار سپکس پردازش شدند. سپس میزان شمارش سلول‌های هسته دار، CD34 مثبت و کلنی زایی آنها، اندازه گرفته شد. در پایان، نتایج با استفاده از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه تحلیل شدند و مقدار p کم تر از ۰.۰۵ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میزان بازیافت سلول‌های هسته دار در استفاده از روش‌های هیدروکسی اتیل استارچ، سانتریفیوژ ساده و نیز سامانه خودکار سپکس، به ترتیب ۷۶٪، ۷۱٪ و ۸۰٪ بود (p>۰/۰۵). میزان بازیافت سلول‌های CD34 مثبت در استفاده از روش خودکارسپکس ۹۱٪ و در دو روش دیگر ۸۵٪ بود (p>۰/۰۵). همچنین تفاوت معنی داری بین سه روش از نظر میزان بازیافت کلنی زایی نیز دیده نشد (p>۰/۰۵).

نتیجه گیری: شمارش‌های سلول‌های هسته دار، CD34 مثبت و کلنی زایی نمونه های خون بند ناف پردازش شده با سه روش مختلف، تفاوت معنی داری باهم نداشتند.

واژه‌های کلیدی: *سلول‌های بنیادی خون ساز، خون بند ناف، ترکیبات هیدرو کسی اتیل استارچ، سانتریفیوژ ساده، سامانه خودکار سپکس (Sepax).*

مقدمه

سلول‌های بنیادی خون ساز، گروهی کوچکی از سلول‌های مغز استخوان هستند که می‌توانند سلول‌های میلوئیدی و لنفوئیدی خون را به وجود آورند(۱و۲). امروزه استفاده از این سلول‌ها درمان مؤثّری برای بیماری‌های خون، بدخیمی، ایمونولوژیک و متابولیک می‌باشد(۳). ازجمله شاخص‌های اصلی این سلول‌ها، CD34 هست که اغلب سلول‌های بنیادی خون ساز آن‌را بیان می‌کنند(٤). مهم‌ترین منابع این سلول‌ها، مغز استخوان، خون محیطی و بند ناف است که در سال‌های اخیر به طور گسترده جهت پیوند استفاده می‌شوند(۵). در مقایسه با سایر منابع ، سلول‌های بنیادی خون بند ناف مزایای ظرفیّت تکثیری بالاتر، خطر کم تر آلودگی ویروسی، واکنش ضعیف به آلو آنتی ژن‌ها، کم بودن شیوع و شدّت واکنش پیوند علیه میزبان، در دسترس بودن، بی اثر بر دهنده، عاری از مسائل اخلاقی، کاهش زمان جست و جوی دهنده و... را دارد(٦و۷).

بخش عمده خون‌های بند ناف جمع آوری شده را گلبول‌های قرمز تشکیل می‌دهند. روش‌های مختلفی جهت حذف این سلول‌ها وجود دارند که عبارتند از: رسوب توسّط هیدرو کسی اتیل استارچ، سانتریفیوژ جهت دسترسی به سلول‌های تک هسته ای غنی شده و روش خودکار دستگاه سپکس (Sepax) (۸-۱۰). کاهش گلبول‌های قرمز نه تنها بانکداری را تسهیل می‌کند؛ بلکه، نگرانی‌های ناشی از ناهمخوانی ABO و Rh را نیز از بین می‌برد. از سایر مزایای کاهش حجم و حذف گلبول‌های قرمز می‌توان به کاهش مواجهه با سایر آنتی ژن‌های ناسازگار گلبول‌های قرمز، کاهش تزریق هموگلوبین آزاد، افزایش میزان بقای سلولی، انجماد یکنواخت و ذوب سریع واحدهای کم حجم، اشاره کرد(۱۱). امروزه بانک خون‌های بند ناف در سراسر جهان از یکی از روش‌های مذکور پردازش خون بند ناف استفاده می‌کنند. با توسعه بانک خون‌های بند ناف، نیاز به انتخاب روش پردازشی که کارآمد و پر بازده باشد؛ بیشتر می‌شود. همچنین با انتخاب روش مناسب و افزایش دوز سلولی نهایی، مدّت زمان بستری شدن گیرنده و مصرف فراورده های خونی نیز کاهش می‌یابد. هدف از این مطالعه مقایسه میان سه روش پردازش استفاده از هیدرو کسی اتیل استارچ، سانتریفیوژ ساده و نیز دستگاه خودکار سپکس بود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری خون بند ناف

این مطالعه از نوع مطالعات تجربی بود. تعداد ۹۰ نمونه خون بند ناف برای آزمایش ها به کار رفتند. به طور خلاصه، در مرکز جمع آوری نمونه خون بند ناف بیمارستان‌های میلاد و بقیه ا... تهران، اقدام به اخذ رضایت نامه کتبی از والدین شد. سپس نمونه‌ها در کیسه های مخصوص خون بند ناف جمع آوری گردیدند و در شرایط استریل و حرارت ۲-۸ درجه انتقال یافتند. نمونه‌ها در سریع‌ترین زمان مورد پردازش و آزمایش قرار گرفتند.

روش‌های پردازش خون بند ناف

تعداد ۳۰ نمونه خون بند ناف با روش افزودن هیدرو کسی اتیل استارچ که اوّلین بار توسّط رابینشتین و همکارانش ارائه شده است پردازش شدند(٤). به طور خلاصه، از محلول هیدرو کسی اتیل استارچ (HES) با غلظت ٦٪، به نسبت ۱ به ٤ به خون بند ناف اضافه کردیم تا غلظت نهایی آن ۱.۲٪ شود. به منظور تهیه پلاسمای سرشار از لوکوسیت، نمونه را به مدّت ۵ دقیقه در ۵۰g سانتریفیوژ نمودیم. پلاسمای سرشار از لوکوسیت را جدا کردیم و در ٤۰۰g به مدّت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم به این ترتیب لوکوسیت های موجود رسوب کردند. به آرامی لایه پلاسما را جدا کردیم. لوکوسیت های جدا شده را در باقی مانده پلاسما حل نمودیم.

تعداد ۳۰ نمونه خون بند ناف را با روش سانتریفیوژ ساده پردازش نمودیم. این روش توسّط آرمیتاژ و همکارانش ارایه شده است (۱۲). برای این منظور

نمونه‌ها را به مدّت ۱۲ دقیقه در g ۳۳۰۰ سانتریفیوژ نمودیم و به آرامی فقط لایه بافی کوت را جدا کردیم.

تعداد ۳۰ نمونه بند ناف نیز با استفاده از دستگاه سپکس (شرکت بیوسیف، سوئیس) و کیت مخصوص آن پردازش شدند. به طور خلاصه نحوه عملکرد دستگاه سپکس بدین صورت است که نمونه خون بند ناف داخل محفظه جداسازی کشیده می‌شود. سپس برنامه سانتریفیوژهای خاصّی اعمال می‌گردد. در حین چرخش، پلاسما خارج می‌شود. این کار تا زمانی ادامه می‌یابد که حسگر مخصوص عبور اوّلین سلول را از لوله شناسایی نماید. در این زمان بافی کوت جداسازی می‌گردد و در مرحله آخر گلبول‌های قرمز نیز جدا می‌شوند.

شمارش سلول‌های هسته دار

به منظور شمارش سلول‌های هسته دار خون بند ناف در نمونه های خون بند ناف پردازش نشده و بعد از پردازش، از دستگاه شمارنده سلولی (سیسمکس، ژاپن) استفاده گردید. تعداد شمارش لکوسیتی ارایه شده توسّط دستگاه به عنوان شمارش سلول‌های هسته دار در نظر گرفته شد. این سنجش به صورت تکرار سه تایی بر روی هر نمونه انجام گرفت.

شمارش مطلق سلول‌های CD34 مثبت

به منظور شمارش سلول‌های CD34 مثبت از کیت شمارش CD34 (داکو، گلوستراپ، دانمارک) استفاده شد. بر اساس آن، ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه های خون بند ناف پردازش نشده و بعد از پردازش را برداشته و با ۱۰ میکرو لیتر از مخلوط Anti-Human CD45/FITC و Anti-Human CD34/RPE انکوبه نمودیم. سپس ۲ میلی لیتر از معرف لیز کننده را اضافه و انکوبه کردیم. پس از انکوباسیون با ۱۰ میکرو لیتر از معرف 7-AAD (7-Aminoactinomycin D)، ۱۰۰ میکرو لیتر از معرّف بید CytoCount را اضافه کردیم و بلافاصله نتایج شمارش را با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری (پارتک، آلمان) به دست آوردیم. این سنجش به صورت تکرار دوتایی بر روی هر نمونه انجام گرفت.

سنجش کلونی

به منظور سنجش قدرت تمایز سلول‌های بنیادی خون ساز از کیت متوکالت (شرکت فناوری سلول های بنیادی، ونکوور، کانادا) استفاده شد. ابتدا با استفاده از فایکول سلول‌های تک هسته ای جداسازی شدند و در محیط IMDM همراه با ۲٪ FBS با غلظت صد هزار عدد در هر میلی لیتر شناور شدند. سپس ۰.۱ میلی لیتر از این سلول‌ها را با یک میلی لیتر محیط متوکالت ترکیب کردیم و در پلیت های مخصوص به مدّت ۱٤ روز در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵٪ CO2 قرار دادیم. سپس کلونی‌ها توسّط دو فرد متخصّص به صورت یک سو کور بر اساس شکل آنها و به وسیله میکروسکوپ اینورت شمارش شدند. این آزمایش به صورت تکرار سه تایی بر روی نمونه‌ها انجام گرفت.

آزمون آماری

به منظور مقایسه گروه‌های پردازش شده، از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه استفاده و مقدار p کم تر از ۰.۰۵ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

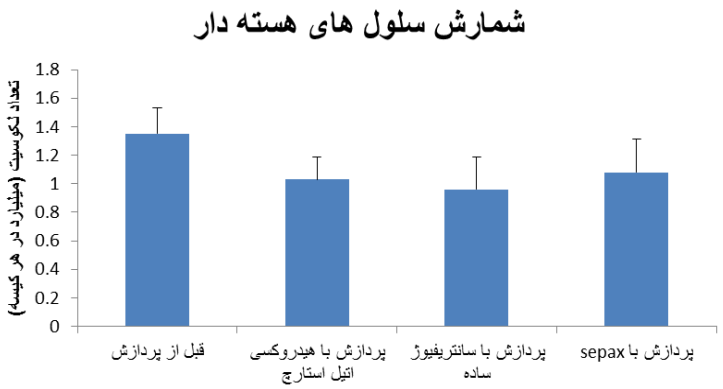
یافته‌ها

تأثیر روش‌های مختلف پردازش بر شمارش سلول‌های هسته دار

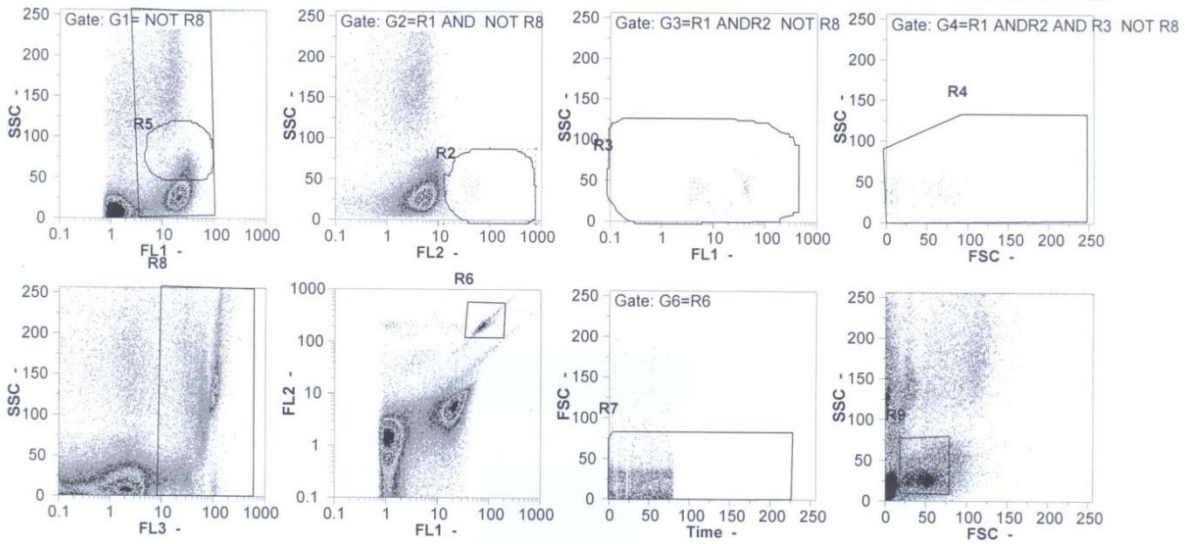
به منظور مقایسه تأثیر روش‌های مختلف پردازش خون بند ناف بر میزان شمارش سلول‌های هسته دار، شمارش لکوسیت‌ها در نمونه‌های مختلف پردازش شده و قبل از آن اندازه گیری شد. همان‌طوری که نمودار ۱ نشان می‌دهد؛ روش‌های مختلف پردازش از نظر تأثیر بر تعداد سلول‌های هسته دار تفاوت معنی داری با هم نداشتند (مقدار۰/۱۰۸=P).

تأثیر روش‌های مختلف پردازش بر شمارش سلول‌های CD34 مثبت

به منظور مقایسه روش‌های مختلف پردازش از



نمودار۱: شمارش سلول‌های هسته دار در نمونه های بند ناف پردازش نشده و نمونه های پردازش شده با سه روش. تفاوت معنی داری بین شمارش لکوسیت نمونه های پردازش شده با هیدرو کسی اتیل استارچ (۱.۰۳ ± ۰.۱٦)، پردازش شده با سانتریفیوژ ساده (۰.۹٦ ± ۰.۲۳) و پردازش شده با سپکس (۱.۰۸ ± ۰.۲۳) وجود نداشت (میانگین ± انحراف معیار).



شکل ۱: نمونه ای از اشکال مربوط به نتایج شمارش سلول‌های CD34 مثبت که بر اساس دستورالعمل سازنده کیت اجرا شده است.

نظر شمارش مطلق سلول‌های CD34 مثبت، شمارش این سلول‌ها در نمونه‌های پردازش شده و نمونه‌های قبل از پردازش اندازه گرفته شد (شکل ۱). همان‌طوری که نمودار ۲ نشان می‌دهد؛ تفاوت معنی داری بین سه روش پردازش خون بند ناف از نظر کاهش تعداد سلول‌های CD34 مثبت وجود ندارد (مقدار۰/۵۷۸=P).

تأثیر روش‌های مختلف پردازش بر شمارش تعداد کلنی‌ها

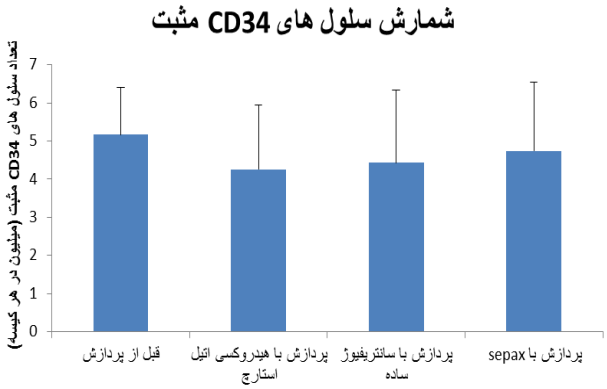
جهت مقایسه تأثیر روش‌های مختلف پردازش خون بند ناف بر خاصیّت کلنی زایی سلول‌های بنیادی خون ساز، میزان کلنی‌ها در نمونه های مختلف پردازش شده و قبل از پردازش سنجیده شدند. نتایج نشان دادند که بین گروه‌های مختلف پردازش شده، تفاوت معنی داری از نظر خاصیّت کلنی زایی وجود ندارد (شکل ۲ و نمودار۳). این یافته نشان داد که روش‌های مختلف پردازش خون بند ناف، موجب کاهش و یا افزایش خاصیّت کلنی زایی سلول‌های بنیادی خون ساز نمی‌گردند و از این نظر تفاوتی با هم ندارند (مقدار۰/۱۸۷=P در CFU-GM و مقدار ۰/۲٦۳=P در Total-CFU).

بحث

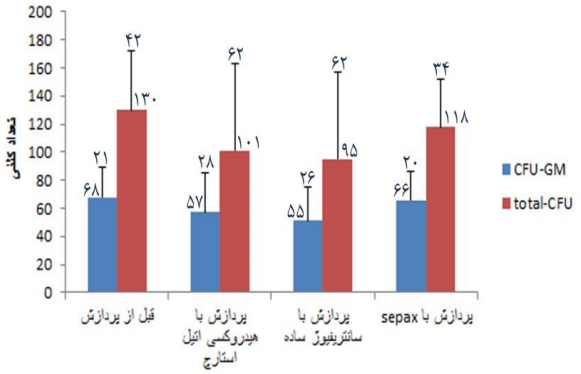
امروزه از روش‌های مختلفی جهت پردازش خون بند ناف استفاده می شود. از این میان انتخاب روش بهینه، می‌تواند نقش به سزایی در ارتقای فرایند پیوند سلول‌های

بنیادی خون ساز داشته باشد. در این مطالعه سه روش پردازش توسّط دستگاه سپکس، روش افزودن هیدروکسی اتیل استارچ و نیز روش سانتریفیوژ ساده با هم مقایسه گردیدند. به طور کلّی مطالعه ما نشان داد که بین سه روش پردازش مذکور، از نظر شمارش سلول‌های CD34 مثبت، سلول‌های هسته دار و کلنی زایی تفاوت معنی داری وجود ندارد.

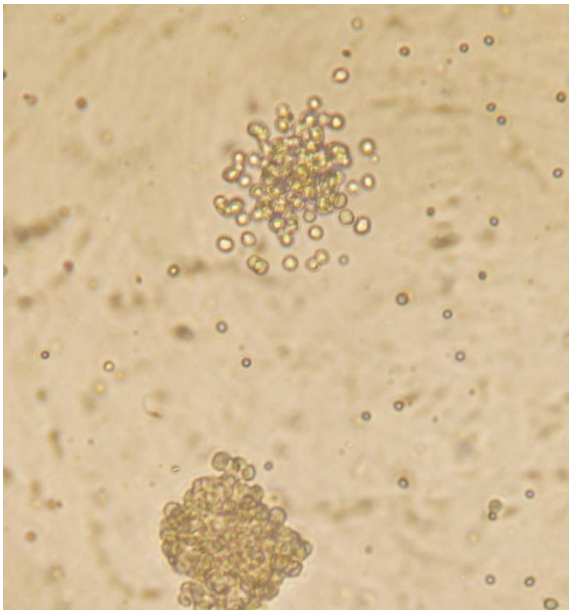
مهم‌ترین مسأله ای که در مورد سلول‌های بنیادی خون ساز بند ناف وجود دارد این است که تعداد سلول‌های بنیادی آن جهت پیوند به بالغین کافی نمی‌باشد(۱۳و۱٤). از این رو انتخاب روش بهینه پردازش خون بند ناف اهمیّت پیدا می‌کند. همچنین با انتخاب روش پردازش مناسب (افزایش تعداد سلول‌های بنیادی نهایی) و کاهش مدّت زمان گرفتن پیوند، مدّت دوره بستری و بنابراین مصرف فراورده های خونی همچون پلاکت‌ها و لکوسیت ها کاهش می‌یابد. مطالعه کورتزبرگ و همکارانش نشان داد که تعداد سلول‌های هسته دار بند ناف شاخص بسیار مهم‌تری از تعداد سلول‌های CD34 مثبت و یا تعداد CFU-GM در تعیین سرانجام و کیفیّت پیوند می‌باشد (۱۵). البتّه، در مطالعه دیگری که بعداً



نمودار۲: شمارش سلول‌های CD34 مثبت در نمونه های پردازش نشده و پس از پردازش با روش‌های مختلف. تفاوت معنی داری بین شمارش سلول‌های CD34 مثبت نمونه های پردازش شده با هیدرو کسی اتیل استارچ (٤.٢٦±١.٦٩)، پردازش شده با سانتریفیوژ ساده (٤.٤٣ ± ١.٩) و پردازش شده با سپکس (٤.٧٤ ± ١.٨) وجود نداشت (میانگین ± انحراف معیار).



نمودار۳: میزان کلنی زایی نمونه‌ها. تفاوت معنی داری بین میزان کلنی زایی نمونه های پردازش شده با هیدرو کسی اتیل استارچ، پردازش شده با سانتریفیوژ ساده و پردازش شده با سپکس وجود نداشت (میانگین ± انحراف معیار). تعداد کلنی‌ها بر حسب تعداد کلنی‌های حاصل از کشت ده هزار سلول تک هسته ای گزارش شده است.



شکل ۲: نمونه ای از اشکال مربوط به سنجش کلنی. کلنی فوقانی مربوط به کلنی CFU-GM و کلنی تحتانی مربوط به سایر انواع کلنی‌ها می‌باشد

توسّط آروویتا و همکارانش صورت گرفت، نشان داده شده است که تعداد سلول‌های CD34 مثبت در نمونه های بند ناف شاخص مهم‌تری از تعداد سلول‌های هسته دار در انتخاب بند ناف جهت پیوند و نیز تعیین سرانجام پیوند می‌باشد(١٦).

به طور میانگین، میزان کلّ سلول‌های هسته دار (لکوسیت ها)، در نمونه های بند ناف این مطالعه بدون هیچ‌گونه پردازش ۱.۳۵ میلیارد می‌باشد . در صورت پردازش با روش هیدرو کسی اتیل استارچ این میزان به ۱.۰۳ میلیارد می رسدکه معادل ٧٦٪ بازیافت (recovery) می‌باشد. در روش سانتریفیوژ ساده مقدار لکوسیت ها ۰.۹٦ میلیارد و معادل ٧١٪ بازیافت بود. هرچند از نظر آماری تفاوت مشاهده شده معنی دار نبود؛ ولی، دلیل تفاوت مشاهده شده را می‌توان به تأثیر افزودن هیدرو کسی اتیل استارچ در رسوب گلبول‌های قرمز و لذا جداسازی بهتر لکوسیت ها دانست. این مقادیر توسّط سلوز و همکارانش به ترتیب ٧٤٪ و ٧٨٪ گزارش شده است که در این مطالعه نیز اختلاف مشاهده شده بین گروه‌ها معنی دار نبود(١٧).

مقدار لکوسیت ها در استفاده از دستگاه سپکس ۱.۰۸ میلیارد معادل ۸۰٪ بازیافت گردید . این مقدار، تفاوت معنی داری با بقیه نداشت؛ ولی، مقدار بالای حاصل را شاید بتوان به دلیل توانایی بالای دستگاه سپکس در جداسازی سلول‌های بنیادی خون ساز دانست. این مقدار در مطالعه راجریگوز و همکارانش، ۸۹٪ گزارش شده است. البتّه، در این مطالعه نیز تفاوت معنی داری بین روش‌ها مشاهده نگردیده است(١٨).

میزان شمارش سلول‌های CD34 مثبت در نمونه های قبل از پردازش، به طور میانگین ۵.۱۷ میلیون بود. در صورت پردازش توسّط روش افزودن هیدرو کسی اتیل استارچ این میزان به ٤.٢٦ میلیون معادل ۸۵٪ بازیافت می باشد و در صورت پردازش توسّط روش سانتریفیوژ ساده این میزان ٤.٤٣ میلیون معادل ۸۵٪ بازیافت می‌باشد. در مطالعه سلوز و همکارانش این مقادیر به ترتیب ۱۰۵٪ و ۸۹.۵٪ بوده‌اند. همچنین در این مطالعه نشان داده شده است که افزودن هیدرو کسی اتیل استارچ به طور معنی داری میزان بازیافت سلول‌های CD34 مثبت را افزایش می‌دهد(١٧).

در مطالعه ما، میزان شمارش سلول‌های CD34 مثبت در نمونه های حاصل از دستگاه سپکس، ٤.٧٤ میلیون و معادل ۹۱٪ بازیافت بود که هرچند عدد حاصل بالاتر از اعداد حاصل از سایر روش‌ها می‌باشد؛ ولی، این تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی دار نبود. در مطالعه راجریگوز و همکارانش نیز بازیافت سلول‌های CD34 مثبت در نمونه های این دستگاه، ۹۳٪ ارایه شده است و در این مطالعه نیز تفاوت معنی داری مشاهده نگردیده است(١٨).

روش پردازش خون بند ناف بایدکم ترین آسیب و تغییرات را در سلول‌های بنیادی خون ساز ایجاد نماید. به طوری که از نظر میزان کلنی زایی این سلول‌ها، نه موجب افزایش و نه موجب کاهش کلنی زایی سلول‌های بنیادی گردد. همچنان که کاهش کلنی زایی سلول‌های بنیادی می‌تواند نشانگر آسیب در این سلول‌ها باشد؛ افزایش کلنی زایی سلول‌های بنیادی خون ساز نیز به معنی خروج این سلول‌ها از حالت سکون (G0) است که بیان کننده ایجاد تغییرات در این سلول‌ها می‌باشد (١٩). مطالعه ما نشان داد که کم ترین میزان تغییرات از نظر کلنی زایی در پردازش سلول‌های بنیادی خون ساز توسّط دستگاه خودکار سپکس به دست می‌آید و این موضوع می‌تواند مزیّت مهمی برای این دستگاه به حساب آید. بیشترین تغییرات نیز در پردازش خون بند ناف توسّط سانتریفیوژ ساده، مشاهده شد. البتّه، لازم به ذکر است که اختلافات مشاهده شده از نظر آماری معنی دار نبودند. در مطالعه مشابه، سلوز و همکارانش، میزان کلّ کلنی زایی سلول‌های بنیادی خون ساز در پردازش با روش افزودن هیدرو کسی اتیل استارچ را ١٠٤.٦ ده هزار کلنی و معادل

۱۰۲.۵٪ بازیافت و در پردازش با روش سانتریفیوژ ساده را ۱۲۵.۹ ده هزار کلنی و معادل ۹۲.٦٪ بازیافت اعلام کردند. در این مطالعه ذکر شده است که چنان چه در زمان آزمایش کلنی سنجی میزان گلبول‌های قرمز بیشتر از ۰.۰۲ میلیارد در هر میلی لیتر باشد، موجب کاهش میزان کلنی زایی سلول‌های بنیادی خون ساز می‌شود و چون در پردازش با روش افزودن هیدرو کسی اتیل استارچ، میزان گلبول‌های قرمز بسیار کم تر از روش سانتریفیوژ ساده می‌باشد؛ لذا، میزان کلنی زایی افزایش پیدا می‌کند. در این مطالعه نیز اعداد حاصل از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشتند(۱۷). همچنین راجریگوز و همکارانش نشان دادند که میزان بازیافت کلنی زایی در روش پردازش با دستگاه سپکس ۹٦٪ است. در این مطالعه نیز اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی دار نبود(۱۸). هرچند اطّلاعات چندانی در مورد ارتباط میزان کلنی زایی در نمونه بند ناف با میزان موفّقیّت پیوند وجود ندارد؛ ولی، این ارتباط به خوبی در مورد سلول‌های بنیادی خون محیطی و مغز استخوان نشان داده شده است و این موضوع از این فرضیّه حمایت می‌کند که میزان کلنی زایی نمونه خون بند ناف، پیش گویی کننده میزان موفّقیّت بالینی است(۱۱).

مهم‌ترین محدودیّتی که در این مطالعه وجود داشت؛ عدم امکان افزایش بیشتر حجم نمونه‌ها بود. هزینه بسیار بالای کیت های به کار رفته در این مطالعه، به خصوص کیت های سپکس، امکان افزایش حجم نمونه‌ها را نداد. البتّه، لازم به ذکر می‌باشد که مطالعات مشابهی با حجم نمونه های بسیار پایین در تعداد ده نمونه نیز وجود دارند (۲۰).

نتیجه گیری

سه روش پردازش خون بند ناف، از نظر شمارش سلول‌های CD34 مثبت، سلول‌های هسته دار و کلنی زایی تفاوت معنی داری با هم ندارند. در کل، معنی دار نبودن آماری نتایج در مطالعه حاضر برجسته بود. به نظر می‌رسد با افزایش حجم نمونه‌ها بتوان به نتایج معنی دار دست یافت.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با حمایت‌های مالی سازمان انتقال خون ایران با شماره ۲۵۵۸٤ و در مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون انجام شده است .در این جا و بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را اعلام می‌نمایند. همچنین از کادر بیمارستان‌های میلاد و بقیه ا... به خاطر تهیه نمونه های خون بند ناف صمیمانه تشکّر می‌شود.

References

1. Baker SJ, Ma'ayan A, Lieu YK, John P, Reddy MR, Chen EY, et al. B-myb is an essential regulator of hematopoietic stem cell and myeloid progenitor cell development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(8):3122-7.
2. Liu B, Yee KM, Tahk S, Mackie R, Hsu C, Shuai K. PIAS1 SUMO ligase regulates the self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. EMBO J. 2014;33(2):101-13.
3. Butler MG, Menitove JE. Umbilical cord blood banking: an update. J Assist Reprod Genet. 2011;28(8):669-76.
4. Oburoglu L, Tardito S, Fritz V, de Barros SC, Merida P, Craveiro M, et al. Glucose and Glutamine Metabolism Regulate Human Hematopoietic Stem Cell Lineage Specification. Cell Stem Cell. 2014. Ahead of print.
5. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Kawamata T, Tojo A, et al. Comparable Long-Term Outcome of Unrelated Cord Blood Transplantation with Related Bone Marrow or Peripheral Blood Stem Cell Transplantation in Patients Aged 45 Years or Older with Hematologic Malignancies after Myeloablative Conditioning. Biol Blood Marrow Transplant. 2014;20(8):1150-5.
6. Chevaleyre J, Rodriguez L, Duchez P, Plainfossé M, Dazey B, Lapostolle V, et al. A Novel Procedure to

Improve Functional Preservation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Cord Blood Stored at+ 4° C Before Cryopreservation. Stem cells and development. 2014. Ahead of print.
7. 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 U S A. 1995;92(22):10119-22.
8. Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. Blood. 1993;81(7):1679-90.
9. Harris D, Schumacher M, Rychlik S, Booth A, Acevedo A, Rubinstein P, et al. Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. Bone Marrow Transplant. 1994;13(2):135-43.
10. Papassavas A, Gioka V, Chatzistamatiou T, Kokkinos T, Anagnostakis I, Gecka G, et al. A strategy of splitting individual high volume cord blood units into two half subunits prior to processing increases the recovery of cells and facilitates ex vivo expansion of the infused haematopoietic progenitor cells in adults. Int J Lab Hematol. 2008;30(2):124-32.
11. Diaz A, Castro A, Villaescusa R. Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. Bone Marrow Transplant. 2000;26(12):1263-70.
12. Armitage S, Fehily D, Dickinson A, Chapman C, Navarrete C, Contreras M. Cord blood banking: volume reduction of cord blood units using a semi-automated closed system. Bone Marrow Transplant. 1999;23(5):505-9.
13. Scaradavou A, Brunstein CG, Eapen M, Le-Rademacher J, Barker JN, Chao N, et al. Double unit grafts successfully extend the application of umbilical cord blood transplantation in adults with acute leukemia. Blood. 2013;121(5):752-8.
14. Somers JA, Brand A, van Hensbergen Y, Mulder A, Oudshoorn M, Sintnicolaas K, et al. Double umbilical cord blood transplantation: a study of early engraftment kinetics in leukocyte subsets using HLA-specific monoclonal antibodies. Biol Blood Marrow Transplant. 2013;19(2):266-73.
15. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. N Engl J Med. 1996;335(3):157-66.
16. Aroviita P, Teramo K, Westman P, Hiilesmaa V, Kekomäki R. Associations among nucleated cell, CD34+ cell and colony-forming cell contents in cord blood units obtained through a standardized banking process. Vox Sang. 2003;84(3):219-27.
17. 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: a comparative study. Transfusion. 2005;45(6):867-73.
18. Rodriguez L, Azqueta C, Azzalin S, Garcia J, Querol S. Washing of cord blood grafts after thawing: high cell recovery using an automated and closed system. Vox Sang. 2004;87(3):165-72.
19. Gothot A, van der Loo JC, Clapp DW, Srour EF. Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34+ cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. Blood. 1998;92(8):2641-9.
20. Moezzi L, Pourfathollah AA, Alimoghaddam K, Soleimani M, Ardjmand AR. The effect of cryopreservation on clonogenic capacity and in vitro expansion potential of umbilical cord blood progenitor cells. Transplant Proc. 2005;37(10):4500-3.

Comparison of three cord blood processing methods: hydroxyethyl starch, simple centrifugation and Sepax automated system

Mohammad Mohammadzadeh-Vardin.,
Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences and Pathology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Mahin Nikougoftar Zarif.,
Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Mohsen Sagha.,
Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences and Pathology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Naser Amirizadeh.,
Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Mehryar Habibi Roudkenar.,
Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Ahmad Gharehbaghian.,
Hematology and Blood Banking Department, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Shahram Vaeli.,
Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Received:18/06/2014**, Revised:**20/07/2014**, Accepted:**28/07/2014

Corresponding author:
Mohammad Mohammadzadeh-Vardin, Department of Anatomical Sciences and Pathology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
E-mail:
m.mohammadzadeh@arums.ac.ir

Abstract

Background: Different processing methods are being used to improve the quality of hematopoietic stem cell transplantation. Using hydroxyethyl starch, simple centrifugation and Sepax automation, this study was aimed to compare these three conventional methods.

Material and Methods: 90 cord blood samples were taken and processed by hydroxyethyl starch, simple centrifugation and Sepax automation methods. Then they were subjected to total nucleated cell (TNC) counting and CD34 positive counting as well as colony assay. Finally, all data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and ps less than 0.05 were considered statistically significant.

Results: The TNC recoveries in hydroxyethyl starch, simple centrifugation and Sepax automation methods were 76%, 71% and 80%, respectively ($p > 0.05$). The CD34+ cell recoveries in the Sepax automation and in the other two methods were 91% and 85%, respectively ($p > 0.05$). Also, the colony assay recoveries were not significantly different among the three methods ($p > 0.05$).

Conclusion: No significant difference was seen in TNC number, CD34 positive counting and colony formation among the three different methods.

Keywords: *Hematopoietic Stem Cells, Umbilical Cord Blood, Hydroxyethyl Starch Derivatives, Simple Centrifugation, Sepax Automated System*