

# ارزیابی تاثیر داروی FK506 (تاکرولیموس) بر سلولهای بنیادی

## خون ساز بند ناف

مریم نیکپور <sup>\*</sup>M.Sc، یوسف مرتضوی <sup>\*</sup>Ph.D، مسعود سلیمانی <sup>\*</sup>Ph.D، سعید کاویانی <sup>\*</sup>Ph.D

<sup>\*</sup> دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی

<sup>\*</sup> دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده پزشکی گروه پاتولوژی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۵۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی

پست الکترونیک: [Email:ymort@yahoo.com](mailto:Email:ymort@yahoo.com)

## چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۳/۹، پذیرش مقاله: ۸۴/۳/۱

**\* هدف:** بررسی تاثیر داروی FK506 بر سلولهای تک هسته ای خون بند ناف

**\* مواد و روشها:** در این مطالعه پس از جمع آوری خون بند ناف و جداسازی سلولهای تک هسته ای، درصد سلولهای زنده تعیین شد. سپس سلولها به مدت یک هفته در محیط DMEM و در حضور سایتوکاینهای IL-6، TPO، SCF، FL و دوزهای مختلف FK506 انکوبه شدند. پس از این مدت، شمارش سلولی انجام گرفت. سپس مورفولوژی سلولها مورد بررسی قرار گرفته و نسبت رده میلویدی به اریترویدی مشخص شد. همچنین درصد سلولهای CD34<sup>+</sup> به روش فلوسایتومتری تعیین گردید. در این تحقیق سنجش کلونی در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول، بلافاصله پس از جدا سازی سلولهای تک هسته ای (در حضور FK506) و در مرحله دوم، از سلولهایی که به مدت یک هفته در حضور دوزهای مختلف دارو و سایتوکاینها انکوبه شده بودند استفاده شد. برای آنالیز داده ها آزمونهای کولموگراف - اسمیرنوف و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد استفاده قرار گرفت.

**\* یافته ها:** پس از یک هفته تیمار سلولها در حضور FK506 و سایتوکاینها، شمارش سلولی در مقایسه با کنترل تغییر قابل ملاحظه ای نشان نداد (p=۰/۱۲۶). همچنین نسبت رده میلویدی به رده اریترویدی در مقایسه با کنترل تغییر معنی داری نشان نداد (p=۰/۸۱۹). با این وجود درصد سلولهای CD34<sup>+</sup> در مقایسه با کنترل افزایش معنی داری نشان داد (p=۰/۰۱۸). سنجش کلونی در مرحله اول در مقایسه با کنترل کاهش یافته (p=۰/۰۰۰) و در مرحله دوم در مقایسه با کنترل تغییری نشان نداد (p=۰/۱۰۹).

**\* نتیجه گیری:** FK506 علاوه بر این که به عنوان داروی سرکوب گر ایمنی نقش مهمی در پیش گیری و درمان GVHD حاد دارد، در *in vitro* موجب ازدیاد سلولهای خون ساز و افزایش توانایی کلونی زایی آنها شده و در ضمن تاثیری نیز بر تمایز سلولهای خون ساز ندارد.

**کل واژگان:** خون بند ناف، FK506، کلونی زایی، ازدیاد سلولی

نشریه پزشکی یاخته، سال هفتم، بهار ۸۴، شماره ۲۵، صفحات ۲۴-۱۹

## مقدمه

وجود سلولهای بنیادی خون ساز (HPC: Hematopoietic Progenitor Cella) نسبتاً بالغ در خون بندناف انسان اولین بار توسط Knudtson و همکاران، شرح داده شد (۱). در حدود ده سال بعد Ogawa و همکاران وجود سلولهای بنیادی خون ساز اولیه در خون بندناف را اثبات نمودند (۲، ۳). با این وجود اولین بار در سال ۱۹۸۴ بندناف بالینی نمود و در همین سال، اولین مورد پیوند سلولهای خون ساز بندناف توسط Gluckman و همکاران گزارش شد (۴). از آن زمان استفاده از خون بندناف به عنوان یک منبع جدید سلولهای بنیادی و خون ساز (HSPC: Hematopoietic Stem/ Progenitor Cells)، در موارد پیوند و دست کاریهای ژنتیکی *ex vivo* گسترش یافت.

یکی از اساسی ترین عوامل محدود کننده پیوند سلولهای بنیادی خون ساز، بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD: Graft Versus Host Disease) است (۵). دو روش عمومی که به منظور پیش گیری از GVHD حاد به کار می روند، عبارتند از استفاده از داروهای سرکوبگر ایمنی و برداشت سلولهای T از

پیوند. با توجه به این که برداشت سلولهای T می تواند موجب کاهش کارایی و عدم موفقیت پیوند شود در حال حاضر بهترین روش پیش گیری از بروز GVHD با استفاده از داروهای سرکوب گر ایمنی است. این داروها شامل کورتیکواستروئیدها نظیر پردنیزولون، سموم متابولیک نظیر سیکلوفسفامید و داروهای متصل شونده به ایمونوفیلینها نظیر سایکلو اسپورین A، FK506 و راپاماسین می باشند. داروهای متصل شونده به ایمونوفیلینها کاملاً اختصاصی عمل نموده لذا بر سایر داروهای سرکوب گر ایمنی ارجحیت دارند (۶). سایکلو اسپورین A برای همه پیوندها مناسب نبوده و دوز کافی دارو برای سرکوب ایمنی مطلوب می تواند آسیب کلیوی ایجاد نماید. به همین دلیل اخیراً، توجه زیادی به یک متابولیت قارچی به نام FK506 شده است.

FK506 برای اولین بار از یک سوش *Streptomyces* در ژاپن جدا شد. اولین استفاده بالینی از این دارو در سال ۱۹۸۹ انجام گرفت. FK506 یک ماکرولید قارچی با عنوان تاکرولیموس (Prograf) نیز نامیده می شود (۷). مهمترین عملکرد این دو دارو مهار نسخه برداری از ژنهای معینی است که مهمترین آنها ژن IL-2 است. علاوه بر مصرف این داروها به عنوان رایج ترین عوامل سرکوبگر ایمنی، سایکلو اسپورین



سلولی که حاوی  $1 \times 10^6$  سلول بود با  $7/5$  میکرولیتر از آنتی‌بادی مونوکلونال علیه CD34 به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. یک آنتی‌بادی مونوکلونال غیر واکنش‌دهنده (کنترل‌کننده با RPE) با ایزوتایپ مشابه به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از این مرحله سلولها دو مرتبه با بافر PBS شستشو و توسط پارافرمالیدید ۱ درصد فیکس شدند. نمونه‌ها به دستگاه فلوسایتومتری ارایه شد.

### آنالیز آماری

قبل از انجام آزمونهای آماری به منظور آنالیز اختلاف میانگینها، می‌بایستی نحوه توزیع داده‌ها از لحاظ نرمال یا غیرنرمال بودن بررسی شود. به منظور بررسی نرمال بودن توزیع متغیر مورد نظر در گروههای مختلف (۴ گروه) از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف (Kolmogorov Smirnov Test) (نرم افزار SPSS، نگارش ۹، کمپانی SPSS Inc) استفاده شد. در صورت نرمال بودن توزیع داده‌ها، آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرف (ANOVA: Analysis of Variance) انجام شد. آزمون آماری ANOVA برآوردی کلی از اختلاف میانگین گروههای مختلف ارایه می‌دهد.

### یافته‌ها

نتایج شمارش سلولها پس از یک هفته تیمار با دارو در مقایسه با کنترل در جدول و نمودار یک مشاهده می‌گردد (کلیه اعداد به صورت  $Mean \pm SD$  می‌باشند). آزمون ANOVA اختلاف معنی‌داری را بین گروههای مورد بررسی نشان نداد ( $P=0/126$ ). نتایج بررسی نسبت رده میلیویدی به رده اریترویدی پس از یک هفته تیمار با داروها در مقایسه با کنترل در جدول و نمودار دو مشاهده می‌گردد. نتایج به دست آمده تفاوتی را در نسبت رده میلیویدی به رده اریترویدی در گروههای مورد بررسی نشان نمی‌دهد ( $P=0/819$ ).

نتایج شمارش تعداد کلونینها در مرحله اول سنجش کلونی، در جدول و نمودار سه مشاهده می‌گردد. نتایج به دست آمده نشان دهنده کاهش توانایی کلونی‌زایی سلولها در حضور این دارو در مقایسه با کنترل می‌باشد ( $P=0/000$ ). نتایج شمارش تعداد کلونینها در مرحله دوم سنجش کلونی در جدول و نمودار چهار مشاهده می‌گردد. آزمون ANOVA اختلاف معنی‌داری را بین گروههای مورد بررسی نشان نمی‌دهد ( $P=0/109$ ). نتایج مقایسه شمارش تعداد کلونینها در مرحله اول سنجش کلونی و مرحله دوم آن در جدول و نمودار پنج مشاهده می‌گردد. نتایج بررسی درصد مارکر CD34 پس از یک هفته تیمار سلولها با FK506 در مقایسه با کنترل در جدول و نمودار شش مشاهده می‌گردد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد یک هفته تیمار سلولها با این دارو در حضور سایتوکاینها، درصد سلولهای CD34 را در مقایسه با کنترل (بدون دارو) افزایش می‌دهد ( $P=0/018$ ).

این سلولها مورد بررسی و نسبت سلولهای رده میلیویدی به اریترویدی تعیین شد.

### سنجش کلونی (Colony Assay)

در این تحقیق سنجش کلونی در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول بلافاصله پس از جداسازی سلولهای تک‌هسته‌ای سنجش کلونی در حضور دوزهای مختلف داروی FK506 انجام گرفت. در مرحله دوم از سلولهایی که به مدت یک هفته در حضور دوزهای مختلف FK506 انکوبه شده بودند برداشت نموده و سنجش کلونی انجام گرفت.

### روش انجام مرحله اول سنجش کلونی

در ابتدا محیط DMEM حاوی سلولهای تک‌هسته‌ای جدا شده (۳۳۰ میکرولیتر)، FBS ۳۳۰ میکرولیتر و فاکتورهای GM-CSF (Stem Cell Technologies) با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر (۱۰ میکرولیتر) در یک لوله فالكون با یکدیگر مخلوط شدند. برای هر نمونه خون بندناف ۴ چاهک در نظر گرفته شد و سپس مقدار مورد نظر دارو FK506 (۱، ۲، ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و در مرحله آخر آگار ۱ درصد (۳۳۰ میکرومولار) (Sigma) به هر چاهک اضافه شد. حجم نهایی در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه ای ۱ میلی‌لیتر و تعداد سلولها در هر چاهک ۲۰۰۰۰ در نظر گرفته شد. پلیتها به مدت دو هفته در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد  $CO_2$  انکوبه شدند. پس از گذشت این مدت، کلونینها در هر یک از چاهکهای پلیت با استفاده از میکروسکوپ معکوس شمارش شدند. تجمعات سلولی که حاوی بیش از ۵۰ سلول هستند به عنوان کلون در نظر گرفته می‌شوند. تجمعات سلولی پراکنده با تعداد کمتر از ۵۰ سلول به عنوان Cluster در نظر گرفته می‌شوند.

### روش انجام مرحله دوم سنجش کلونی

در مرحله دوم سنجش کلونی، روش ذکر شده برای مرحله اول بر روی سلولهایی که به مدت یک هفته در پلیت حاوی DMEM و FBS و فاکتورهای رشد شامل SCF، IL-6، TPO و FL (هر کدام با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و غلظتهای مورد نظر دارو (۱، ۲ و ۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر) انکوبه شده بودند، انجام شد. از آنجایی که سلولها از قبل در معرض دوزهای مختلف دارو قرار گرفته بودند در این مرحله FK506 به چاهکها اضافه نشد.

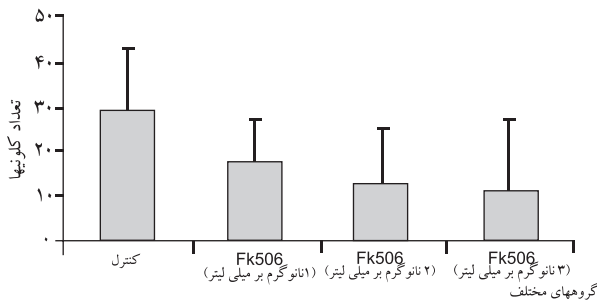
### بررسی مارکر CD34 از طریق فلوسایتومتری

از آنجایی که مشخصه سلولهای بنیادی وجود آنتی ژن CD34 است در این تحقیق درصد سلولهای  $CD34^+$  نیز تعیین گردید. به این منظور ابتدا سوسپانسیون سلولهایی را که به مدت یک هفته تحت تاثیر دوزهای مختلف FK506 قرار گرفته بودند، برداشت نموده و شمارش سلولی انجام گرفت. سلولهای مذکور دو مرتبه با بافر PBS (با  $PH=7/2-7/4$ ) شستشو شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون

جدول ۱: نتایج شمارش سلولی پس از یک هفته تیمار با FK506 در مقایسه با کنترل

شمارش سلولها	چاهک
۱۱۴۷۵۰۰ ± ۷۲۹۰۸۶	شماره ۱ (کنترل)
۱۱۶۷۵۰۰ ± ۷۳۴۹۰۳	شماره ۲ (۱ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)
۱۰۸۱۰۰۰ ± ۶۵۴۶۹۸	شماره ۳ (۲ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)
۷۲۵۴۰۰ ± ۴۸۴۸۷۲	شماره ۴ (۳ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)

کلید اعداد به صورت Mean±SD می باشند.

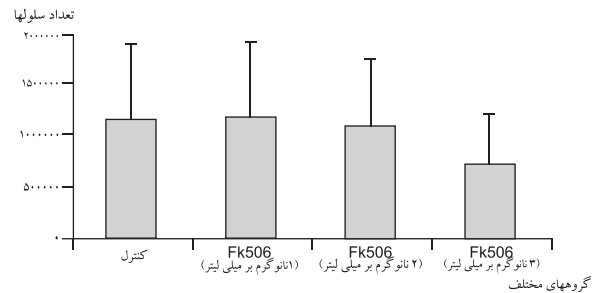


نمودار ۳: نتایج شمارش تعداد کلونیا در مرحله اول سنجش کلونی. کلید اعداد به صورت Mean±SD نشان داده شده است.

جدول ۴: نتایج شمارش تعداد کلونیا در مرحله دوم سنجش کلونی

تعداد کلونی	چاهک
۳۹/۲ ± ۲۸/۷۱	شماره ۱ (کنترل)
۵۰/۲ ± ۴۸/۱۹	شماره ۲ (۱ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)
۲۸/۱ ± ۲۵/۹۶	شماره ۳ (۲ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)
۶۳/۵ ± ۴۵/۸۹	شماره ۴ (۳ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)

کلید اعداد به صورت Mean±SD می باشند.

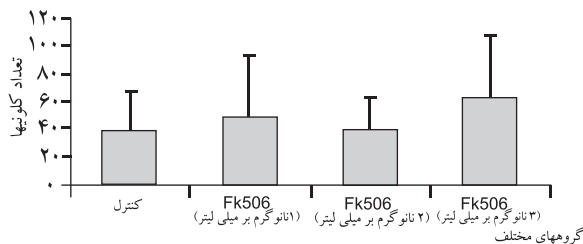


نمودار ۱: نتایج شمارش سلولی پس از یک هفته تیمار با FK506 در مقایسه با کنترل. نتایج به صورت Mean±SD نشان داده شده است.

جدول ۲: نتایج بررسی نسبت رده میلویدی به رده اریترویدی پس از یک هفته تیمار با FK506 در مقایسه با کنترل

M/E	چاهک
۶/۳۷ ± ۱/۷۷	شماره ۱ (کنترل)
۶/۵۸ ± ۱/۶۳	شماره ۲ (۱ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)
۷/۱ ± ۱/۸۱	شماره ۳ (۲ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)
۶/۸۱ ± ۱/۹۱	شماره ۴ (۳ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)

کلید اعداد به صورت Mean±SD می باشند.

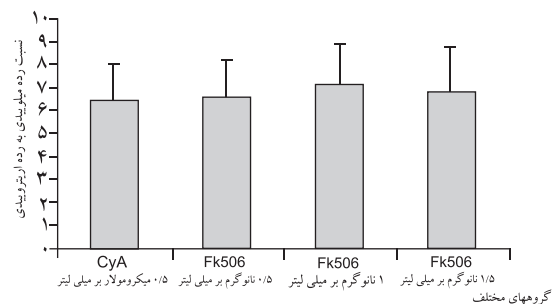


نمودار ۴: نتایج شمارش تعداد کلونیا در مرحله دوم سنجش کلونی. کلید اعداد به صورت Mean±SD نشان داده شده است.

جدول ۵: مقایسه نتایج شمارش کلونیا در مرحله اول و دوم سنجش کلونی

تعداد کلونیا در مرحله دوم	تعداد کلونیا در مرحله اول	چاهک
۳۹/۲ ± ۲۸/۷۱	۲۹/۳۵ ± ۱۴/۱۱	شماره ۱ (کنترل)
۵۰/۲ ± ۴۸/۱۹	۱۷/۸۵ ± ۹/۷۹	شماره ۲ (۱ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)
۲۸/۱ ± ۲۵/۹۶	۱۲/۶ ± ۱۲/۱۶	شماره ۳ (۲ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)
۶۳/۵ ± ۴۵/۸۹	۱۱/۵ ± ۱۵/۶۶	شماره ۴ (۳ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)

کلید اعداد به صورت Mean±SD می باشند.



نمودار ۲: نتایج بررسی نسبت رده میلویدی به رده اریترویدی پس از یک هفته تیمار با FK506 در مقایسه با کنترل. نتایج به صورت Mean±SD نشان داده شده است.

جدول ۶: نتایج بررسی درصد سلولهای CD34+ پس از یک هفته تیمار با FK506 در مقایسه با کنترل

درصد سلولهای CD34+	چاهک
۴/۷ ± ۲/۲	شماره ۱ (کنترل)
۸/۱ ± ۲/۴	شماره ۲ (۱ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)
۱۰/۲ ± ۲/۸	شماره ۳ (۲ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)
۱۲/۸ ± ۴/۳	شماره ۴ (۳ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)

کلید اعداد به صورت Mean±SD می باشند.

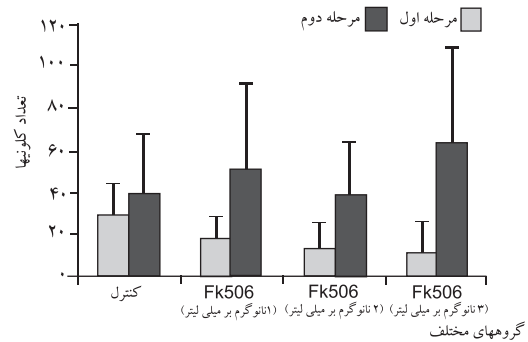
جدول ۳: نتایج شمارش تعداد کلونیا در مرحله اول سنجش کلونی

تعداد کلونیا	چاهک
۲۹/۳۵ ± ۱۴/۱۱	شماره ۱ (کنترل)
۱۷/۸۵ ± ۹/۷۹	شماره ۲ (۱ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)
۱۲/۶ ± ۱۲/۱۶	شماره ۳ (۲ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)
۱۱/۵ ± ۱۵/۶۶	شماره ۴ (۳ نانوگرم بر میلی لیتر FK506)

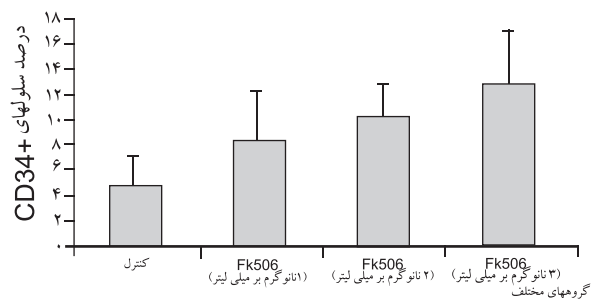
کلید اعداد به صورت Mean±SD می باشند.

بندناف تاثیر قابل ملاحظه‌ای ندارد که با توجه به ترکیب سایتوکاینهای استفاده شده قابل انتظار بود. اگرچه میانگین شمارش سلولهای تیمار شده با داروها در مقایسه با کنترل افزایش نشان نمی‌دهد اما تعداد کل سلولهای تک هسته‌ای موجود در سوسپانسیون سلولی، مقیاس مستقیمی از تعداد سلولهای بنیادی خون‌ساز نیست. با توجه به تعریف توانایی ازدیاد سلولی (توانایی تولید بالاتر سلولهای بنیادی) و با توجه به افزایش درصد سلولهای  $CD34^+$  (مارکر مشخصه سلولهای بنیادی و اجدادی) پس از یک هفته تیمار با دارو در مقایسه با کنترل می‌توان نتیجه گرفت این دارو باعث ازدیاد سلولهای خون‌ساز بندناف می‌گردد. مشخصه سلولهای بنیادی وجود آنتی ژن  $CD34$  است. این آنتی ژن یک گلیکوپروتئین سطحی است که در اتصال سلولهای بنیادی به سلولهای استروما نقش دارد (۱۶). دقیق‌ترین آزمون پیشگویی کننده تعداد سلولهای بنیادی خون‌ساز که وجود آنها برای انجام پیوند ضروری است، سنجش کلونی است. نتایج حاصل از انجام سنجش کلونی بدون تیمار قبلی سلولها با دارو و سایتوکاینهای *early acting*، کاهش کلونی‌زایی را نشان می‌دهد، در حالی که انجام سنجش کلونی پس از یک هفته تیمار با دارو و سایتوکاینهای *early acting* افزایش کلونی‌زایی را نشان می‌دهد. این تفاوت در رفتار دو گانه سلولها در دو مرحله، می‌تواند به علت حضور سایتوکاینهای *early acting* (TPO, FL, SCF), IL-6 در مرحله دوم و یا به عبارت دیگر به علت تفاوت در ترکیب محیط کشت سنجش کلونی در طی دو مرحله باشد. البته به نظر می‌رسد داروی FK506 با این سایتوکاینها اثر هم افزایی نیز دارد به طوری که تعداد کلونیا در مرحله دوم در چاهکهای حاوی دارو، در مقایسه با کنترل افزایش بیشتری را نشان می‌دهد. هر چند افزایش حاصل معنی‌دار نبود اما این امکان وجود دارد که در صورت استفاده از غلظتهای بالاتر دارو تفاوت مشاهده شده معنی‌دار شود. تفاوت مشاهده شده در نتایج مرحله اول و دوم سنجش کلونی می‌تواند به علت تفاوت در طول مدت تیمار سلولها با این دارو باشد. در تنها مطالعه‌ای که در آن پیش از انجام سنجش کلونی، تیمار سلولها با داروها (سایکلواسپورین، FK506 و KM2210) انجام گرفت، یافته‌های به دست آمده هم در تیمار ۴ ساعته و هم در تیمار ۲۴ ساعته با یکدیگر مطابقت داشتند (۱۱). البته در مدت زمان تیمار سلولهای هدف با داروها پیش از انجام سنجش کلونی، نوع سایتوکاینهای مورد استفاده در محیط کشت در زمان انجام تیمار، و نوع سلولهای هدف در تحقیق مذکور و تحقیق موجود تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده می‌گردد. پس به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت تفاوت در رفتار دو گانه سلولها در دو مرحله می‌تواند به علت تفاوت در ترکیب محیط کشت طی دو مرحله یا به علت تفاوت در طول مدت تیمار سلولها با این دارو یا هر دو عامل باشد.

با توجه به تفاوت‌های موجود در روش انجام سنجش کلونی در مطالعات قبلی و در مطالعه حاضر، از جمله تفاوت در مدت زمان تیمار سلولهای هدف با داروها پیش از انجام سنجش کلونی، تفاوت در نوع سایتوکاینهای مورد استفاده در محیط کشت در زمان انجام تیمار، یا عدم تیمار و افزودن مستقیم داروها به محیط نیمه جامد، تفاوت در نوع سایتوکاینهای افزوده شده به محیط نیمه جامد و نوع سلولهای هدف (سلولهای جدا شده از مغز استخوان انسان یا موش، خون محیطی و خون



نمودار ۵: مقایسه نتایج شمارش تعداد کلونیا در مرحله اول و دوم سنجش کلونی. کلیه اعداد به صورت  $Mean \pm SD$  نشان داده شده است.



نمودار ۶: نتایج بررسی درصد سلولهای  $CD34^+$  پس از یک هفته تیمار با FK506 در مقایسه با کنترل. کلیه اعداد به صورت  $Mean \pm SD$  نشان داده شده است.

## بحث

خون بندناف حاوی سلولهای بنیادی خون‌ساز است که از آنها سلولهای بالغ و عملکردی مشتق می‌شوند (۱۳). تکثیر (توانایی تقسیم دوتایی و ایجاد سلولهای جدید از یک جمعیت سلولی مشخص) و ازدیاد (افزایش تولید سلولهای بنیادی و اجدادی) سلولهای اجدادی خون‌ساز در آزمایشگاه به تمایز یا عدم تمایز این سلولها و در صورت متمایز شدن این سلولها بستگی به رده و مرحله بلوغ آنها دارد. تکثیر و ازدیاد سلولهای خون‌ساز همچنین به عواملی نظیر نوع محیط کشت، حضور یا فقدان سرم در محیط کشت، دما و تعداد سلولهای کشت شده در هر محیط مرتبط است (۱۴، ۱۵). به عنوان مثال استفاده از فاکتورهای *early acting* (سایتوکاینهایی که بر سلولهای بنیادی و اجدادی اولیه تاثیر دارند) نظیر SCF و FL باعث ازدیاد سلولهای خون‌ساز می‌گردد، در حالی که استفاده از فاکتورهای *late acting* (سایتوکاینهایی که بر سلولهای تمایز یافته‌تر تاثیر دارند) نظیر اریتروپویتین موجب تکثیر این سلولها می‌گردد. مطالعات نشان می‌دهند استفاده از ترکیبی از سایتوکاینهای *early acting* باعث ازدیاد مناسب سلولهای  $CD34^+$  می‌گردد. با توجه به مطالعات انجام گرفته، در تحقیق حاضر از چهار سایتوکاین TPO, FL, SCF و IL-6 (هر کدام با غلظت ۳۰ نانوگرم بر میلی لیتر) استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از شمارش سلولها پس از یک هفته تیمار با FK506 در حضور سایتوکاینهای *early acting*؛ می‌توان نتیجه گرفت که این دارو بر تکثیر سلولهای خون‌ساز

گروههای مختلف نشان می‌دهد تفاوت معنی‌داری در بین آنها وجود ندارد. پس می‌توان نتیجه گرفت این دارو موجب تمایز سلولهای خون‌ساز به سمت یک رده خاص نمی‌گردد. FK506 علاوه بر این که به عنوان داروی سرکوب‌گر ایمنی نقش مهمی در پیش‌گیری و درمان GVHD حاد دارد، می‌تواند در *in vitro* موجب ازدیاد سلولهای خون‌ساز و افزایش توانایی کلونی‌زایی آنها شود و در ضمن تاثیری نیز بر تمایز سلولهای خون‌ساز نداشته باشد. بررسی تاثیر FK506، سایکلواسپورین و راپامایسین (داروی سرکوب‌گر ایمنی متصل‌شونده به ایمنوفیلین (FKBP) بر سلولهای CD34<sup>+</sup> جدا شده از خون بند ناف، مغزاستخوان و خون محیطی پیشنهاد می‌گردد.

### تقدیر و تشکر

در این تحقیق از کمکها و مساعدتهای سرکار خانم ابراهیمی، سرکار خانم دکتر ذنوبی، پرسنل محترم بیمارستان مادران تهران و سرکار خانم نیکوگفتار بهره‌مند شدیم که بدینوسیله از زحمات و مساعدتهای این عزیزان سپاسگزاری می‌شود.

بندناف)؛ در نتایج به دست آمده از این مطالعه و مطالعات قبلی اختلافاتی مشاهده می‌گردد. به عنوان مثال در تنها مطالعه‌ای که در آن پیش از انجام سنجش کلونی، تیمار سلولها با داروها انجام گرفت (البته مدت زمان تیمار و نوع سایتوکاینهای مورد استفاده در محیط کشت تفاوت داشت).؛ تاثیر داروهای سرکوب‌گر سایکلواسپورین، FK506 و KM2210 بر توانایی کلونی‌زایی سلولهای بنیادی خون‌ساز موش بررسی شد. در این تحقیق سلولها به مدت ۴ ساعت و ۲۴ ساعت در مجاورت غلظتهای متفاوت این سه دارو قرار گرفتند. پس از آن آزمایش سنجش کلونی در مورد آنها انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان دادند که FK506 در دوزهای پایین‌تر از ۱۰۰-۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، تشکیل کلونی را افزایش و دوزهای بالاتر از این مقادیر ایجاد کلونی را کاهش می‌دهند و این یافته‌ها هم در تیمار ۴ ساعته و هم در تیمار ۲۴ ساعته صدق می‌کند (۱۱). با توجه به این که توانایی کلونی‌زایی مشخصه سلولهای بنیادی است، می‌توان گفت تیمار سلولهای تک هسته‌ای خون بندناف با FK506 در حضور سایتوکاینهای *early acting* باعث افزایش سلولهای بنیادی و اجدادی خون‌ساز می‌گردد. نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین نسبت رده میلویدی به رده اریترویدی در



### References

- Knudtson S: In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood*, 1974; 43: 357-361
- Nakahata T, Ogawa M: Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *J Clin Invest*, 1982; 70: 1324
- Leary AG, Ogawa M: Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. *Blood*, 1987; 69: 953-956
- Gluckman E, Broxmeyer H, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P: Hematopoietic reconstitution of a patient with Fanconi anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.*, 321: 1174-1178, 1989.
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL: Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*, 1990; 323: 570
- Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps U, Seligsohn U: *Williams Hematology*, Sixth Edition, McGraw-Hill, 2001; 229-231
- Dreux J: *Immuno-pharmacology*. Springer-Verlag, 1990; 158-160
- Almawi WY, Melemedjian OK: Clinical and mechanistic differences between FK506 (Tacrolimus) and cyclosporine A. *Nephrol. Dial Transplant*, 2000; 15: 1916-1918
- و جگانی م، ایمونولوژی. جلد دوم، چاپ اول، تهران، انتشارات معاونت پژوهشی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، صفحات ۲۲۴-۲۲۱
- Hirao A, kawano Y, Takaue Y: Effects of Immunosuppressants FK506, Deoxyspergualin and CSA on immature human hematopoiesis. *Blood*, 1993; 81: 1179-1183
- Zhu X, Imamura M, Hashino S, Tanaka J, Kobuyashi S: Enhancing and suppressive effects of immunosuppressants CSA, FK506, and KM2210 on the colony formation of murine bone marrow cells. *Ann Hematol*, 1995; 71(6): 301-306
- Perry SS, Kim M, Spangrude GJ: Directs effects of cyclosporin A on proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells. *cell Transplant*, 1999; 8(4): 339-344
- Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA: Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1989; 86: 3828-3832
- Flores-Guzman P, Gutierrez-Rodriguez M, Mayani H: In vitro proliferation, expansion and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Archives of Medical Research*, 2002; 33: 107-114
- Mayani H, Gilbert LJ, Janowska -Wieczorek A: Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol*, 1992; 49: 225-233
- Sutherland DR, Keating A: The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J Hematother*, 1992; 1:115-129