Archive Of SID

مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۳، شماره ۱۴۹، آبان ۱۳۹۵ http://rjms.iums.ac.ir مقاله پژوهشی

# بررسی تاثیر تغییرات درجه حرارت در نگهداری خون بند ناف قبل از جدا سازی در زمان‌های متفاوت

*طاهره زندیه: دکتری بیوتکنولوژی، دانشیار و مدیر کنترل کیفی بانک خون رویان، تهران، ایران (*نویسنده مسئول).. tz7892000@yahoo.com
سلاله صمیمی: کارشناس کنترل کیفی بانک خون رویان، تهران، ایران. s.samimi@rsct.ir
سید هادی موسوی: گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. haematology81@gmail.com
مریم رادمنش: پزشک مشاور بانک خون بند ناف رویان، تهران، ایران. d.rad_m@yahoo.com
اشکان مزدگیر: کارشناس ارشد و مدیر تضمین کیفیت بانک خون رویان و دانشجوی دکتری صنایع دانشگاه خواجه نصیر، تهران، ایران. a.mozdgir@rsct.ir
مرتضی ضرابی: مدیرعامل بانک خون ایران و دانشجوی دکتری پژوهشگاه رویان، تهران، ایران. m.zarrabi@rsct.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۷

**چکیده**

**زمینه و هدف:** استفاده از سلول‌های بنیادی خون بند ناف بعنوان یکی از منابع سلولی جهت درمان بیماری‌های هماتولوژی و سایر بیماری‌ها مرتب رو به افزایش است. موفقیت پیوند و طول عمر بیمار بعد از دریافت سلول‌های خون بند ناف بستگی زیادی به تعداد کل سلول‌های تک هسته‌ای (TNCs) و درصد تعداد سلول‌های CD34 به ازای هر کیلوگرم وزن بدن گیرنده پیوند دارد. اجرای یک روش استاندارد برای جمع آوری و نگهداری خون بند ناف قبل و در طول مدت جداسازی سلول‌ها بسیار حیاتی و حساس می‌باشد. هدف این تحقیق تاثیر درجه حرارت و زمان‌های مختلف نگهداری خون بند ناف قبل از پروسه جدا سازی بر روی تعداد کل سلول‌ها و درصد زنده ماندن آن‌ها و امکان بروز لخته بود.

**روش کار:** در این آزمایش ۳۰ نمونه خون بند ناف به صورت تصادفی از زایمان‌های انجام شده در بیمارستان‌های سطح تهران جمع آوری و به بانک خون بند ناف ارسال گردید. تعداد کل سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده آن‌ها محاسبه و از نظر لخته به روش چشمی بررسی گردید و هر نمونه به ۴ قسمت تقسیم و در درجه حرارت‌های ۴، ۱۲، ۲۲ و ۳۷ درجه نگهداری شد و بعد از ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تعداد کل سلول‌ها، درصد زنده ماندن آن‌ها و بروز لخته بررسی گردید. جهت تحلیل تاثیر زمان و دماهای متفاوت بر روی کیفیت محصول نهایی و با توجه به در نظر گرفتن چندین زمان و دمای متفاوت از جداول آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA استفاده گردید.

**یافته‌ها:** تعداد کل سلول‌ها در شروع کار بین ۱۰-۵ میلیون در میلی‌لیتر بود و مشاهده گردید که درصد زنده بودن سلول‌ها در ۴ درجه حرارت بعد از ۲۴ ساعت کاهش یافت که از نظر آماری ($p<0/005$) معنی دار بود ولی در ۱۲ درجه و ۲۴ درجه حرارت پس از ۲۴ ساعت کاهش مختصری داشت که از نظر آماری ($p>0/005$) معنی دار نبود ولی پس از ۷۲ ساعت از نظر آماری ($p<0/005$) معنی دار بود در صد زنده بودن سلول‌ها در ۳۷ درجه بعد از ۲۴ ساعت کاهش شدید داشت که از نظر آماری ($p<0/005$) معنی دار بود.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه مشاهده گردید درجه آسیب پذیری سلول‌ها درمحیط خارج از بدن در فاصله گرفتن خون تا جدا سازی و فریز ارتباط مستقیم با زمان نگهداری و درجه حرات آن دارد که از نظر آماری ($p<0/005$) معنی دار بود ولی تغییرات درجه حرارت و زمان نگهداری تاثیری در ایجاد لخته نداشت. نتایج ما پیشنهاد می‌کند بهترین درجه حرارت برای نگهداری خون بند ناف ۲۲ -۱۲ درجه تا زمان ۴۸ ساعت می‌باشد.

**کلیدواژه‌ها:** خون بند ناف، رسوب سلولی، سلول بنیادی هماتوپویتیک

## مقدمه

در سال‌های اخیر، سلول درمانی جایگاه ویژه‌ای را در درمان بسیاری از بیماری‌های صعب‌العلاج یافته است. به‌نحوی‌که پیوند سلول‌های بنیادی خون بند ناف جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها بخصوص اختلالات بدخیم خونی مانند لوکمیا، لنفوما، هموگلوبونمیا و بیماری‌های نقص ایمنی به‌طور چشمگیری رو به افزایش است. با اینکه اولین پیوند خون بند ناف در دو دهه اخیر گزارش شده است (۱) بیش از ۱،۰۰۰،۰۰۰ واحد خون در بانک‌های جهانی ذخیره گردیده و بیشتر از ۳۰،۰۰۰ پیوند موفقیت‌آمیز در بزرگسالان و کودکان انجام شده است (۲). موفقیت درمان و افزایش طول عمر بیماران پس از پیوند به‌طور چشمگیری به تعداد سلول‌های هسته‌دار اولیه و درصد سلول‌های CD34 پیوند شده ارتباط دارد (۳-۸). اخیراً نتایج آماری اثبات نموده که پیشرفت بهبود بیماران ارتباط مستقیم با تعداد سلول‌های

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 16:38 IRST on Monday February 20th 2017

www.SID.ir

Archive Of SID



Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 16:38 IRST on Monday February 20th 2017

اولیه به ازای هر کیلوگرم وزن بیمار دارد و مهم‌ترین فاکتور در بهبود بیماری است (۹ و ۱۰).

اخیراً به علت افزایش بیماران درخواست‌کننده پیوند، استفاده از دو نمونه خون بند ناف (از ۲ دهنده مختلف) جهت بیمارانی که سلول‌های یک دهنده برای آن‌ها کافی نیست صورت گرفته است که به‌هرحال موفقیت در بهبود گیرنده بستگی به تعداد سلول‌های بنیادی تزریق شده دارد؛ بنابراین نقطه بحرانی کار، رعایت دقیق فاکتورهای تأثیرگذار روی تعداد سلول‌ها می‌باشد (۱۱).

میزان استفاده از خون بند ناف انسانی به علت قابلیت دسترسی آسان، عدم نیاز به سازگاری کامل از نظر HLA بین دهنده و گیرنده و شیوع کمتر GVHD در مقایسه با سایر منابع سلول‌های بنیادی مانند مغز استخوان و خون محیطی بیشتر مورد توجه محققین بوده است. اگر چه میزان کم سلول‌های بنیادی جدا شده از این منبع پیوند آن را محدود کرده است، اما میزان سلول‌های استفاده شده در دوزهای بالا حاکی از موفقیت در پیوند و بقای بیماران بزرگسال و کودکان بوده است (۱۲ و ۱۳).

روش‌های استاندارد برای جداسازی، نگهداری سلول‌ها قبل از فریز، هنگام فریز و ذوب کردن آن‌ها هنوز مورد سؤال است و ثابت شده نیست؛ بنابراین افزایش کیفیت و کمیت دهنده خون بند ناف, خون‌گیری، ارسال آن، نحوه جداسازی و فریز آن از اهمیت خاصی برخوردار است. ازآنجایی‌که در تهیه سلول‌های بنیادی با سلول‌های زنده که بسیار حساس و تأثیرپذیر هستند سروکار داریم عوامل مختلفی در کیفیت و کمیت آن مؤثر است. با توجه به وجود عوامل متعدد دخیل در ارتباط با سلول‌های بنیادی تعمیم نتایج حاصله در سایر جوامع به کشور ما منطقی به نظر نمی‌رسد. بعلاوه بر اساس دانسته‌های ما تاکنون بررسی جامعی روی همه عوامل تأثیرگذار بر روی سلول‌های بنیادی انجام نشده است. لذا هدف این تحقیق تأثیر درجه حرارت و زمان‌های مختلف نگهداری خون بند ناف قبل از پروسه جداسازی روی تعداد کل سلول‌ها و درصد زنده ماندن آن‌ها و بروز لخته قبل از فریز بود.

## روش کار

این مطالعه به‌صورت تصادفی بود و از بین خانم‌های حامله مراجعه‌کننده به یکی از بیمارستان‌های تهران ۳۰ نفر خانم حامله و سالم انتخاب شدند. با آن‌ها مصاحبه و سؤالات موردنیاز پرسیده شد و سپس پرسشنامه پزشکی و فرم قرارداد خون بند ناف توسط آن‌ها تکمیل و امضا گردید. سپس خون بند ناف در کیسه‌های خون‌گیری ۲۵۰ میلی‌لیتری (کارخانه بعثت) حاوی ۳۵ میلی‌لیتر ماده ضد انعقاد سیترات-فسفات -دکستروز- آدنین (CPD-A) توسط پرسنل خون‌گیری ماهر و ورزیده طی یک ماه جمع‌آوری گردید. کیسه‌های محتوی خون بند ناف در فاصله ۳ ساعت بدون یخ جهت جداسازی سلول‌ها به بانک خون منتقل گردید. جهت تحلیل تأثیر زمان و دماهای متفاوت بر روی کیفیت محصول نهایی با توجه به در نظر گرفتن چندین زمان و دمای متفاوت از جدول آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA استفاده گردید ه است.

برای هر نمونه خون، دمای ورود نمونه, نحوه خون‌گیری (داخل رحمی و خارج رحمی), حجم خون و تعداد کل سلول‌ها و در صد زنده‌بودن آن‌ها با روش نوکلئوکانت محاسبه گردید. به‌طور خلاصه اساس روش نوکلئوکانتر بر پایه رنگ کردن DNA با رنگ فلورسانت یدید پروپیدیوم است که رنگ داخل نوکلئوکاستهای دستگاه تثبیت شده و قادر است DNA سلول‌های مرده را رنگ کند. لذا برای اندازه‌گیری کل سلول‌ها، لازم است دیواره سیتوپلاسمی سلول تخریب شود تا همه سلول‌ها توسط یدید پروپیدیوم رنگ شوند. قبلاً دیواره سلول را با بافر لیز کننده، لیز نموده و با بافر تثبیت‌کننده، تثبیت می‌کنند؛ و تعداد کل سلول‌ها و سلول‌های زنده را با کمک نرم‌افزار Nucleo view و با فرمول خاص و تناسب بین سلول‌های رنگ نشده بر کل سلول‌های شمارش شده محاسبه می‌گردد. وجود لخته در نمونه اولیه با روش چشمی بررسی و یادداشت گردید. هر کیسه خون پس از مخلوط شدن کامل به ۴ لوله فالکون به‌طور مساوی تقسیم شد و هر لوله همراه کارت دیتا لاگر در درجه حرارت‌های مختلف ۴ درجه (یخچال ۴



www.SID.ir

Archive Of SID



درجه) ۱۲ درجه (یخچال ۱۲ درجه) ۲۲ درجه (در اتاق کلین که درجه حرارت آن کنترل شده و ثابت است) و ۳۷ درجه (انکوباتور ۳۷ درجه) قرار داده شد. شمارش کلی سلول‌های تک‌هسته‌ای به‌وسیله دستگاه سل کانتر شرکت سیسمکس همراه در صد زنده‌بودن آن‌ها بعد از زمان‌های مختلف (شروع کار، ۱۰ نمونه بعد از ۲۴ ساعت، ۱۰ نمونه بعد از ۴۸ ساعت و ۱۰ نمونه هم بعد از ۷۲ ساعت) اندازه‌گیری شد. بروز لخته به‌صورت چشمی و حین تقسیم نمونه در لوله‌های فالکون و حین نمونه‌برداری جهت کانت سلولی مشاهده، ثبت و یادداشت گردید.

## یافته‌ها

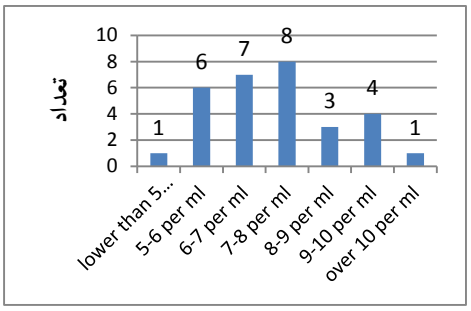
همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود تعداد کل سلول‌ها در ابتدای کار بین ۱۰ – ۵ میلیون در میلی‌لیتر می‌باشد. در این مطالعه مشاهده گردید که زمان و درجه حرارت در فاصله گرفتن خون و انجام آزمایش‌ها تأثیر مستقیم در میزان کل سلول‌ها، درصد زنده‌بودن آن‌ها دارد که با استفاده از نرم‌افزار SPSS و با کمک تست آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست دانکن بررسی گردید. هم‌چنین مشاهده گردید که طول زمان و درجه حرارت در فاصله خون‌گیری و انجام آزمایش‌ها، تأثیری در بروز لخته نداشت.

همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است درصد زنده‌بودن سلول‌ها در ۴ درجه حرارت نسبت به زمان بعد از ۲۴ ساعت با ($p<۰/۰۰۵$) کاهش نشان داد.

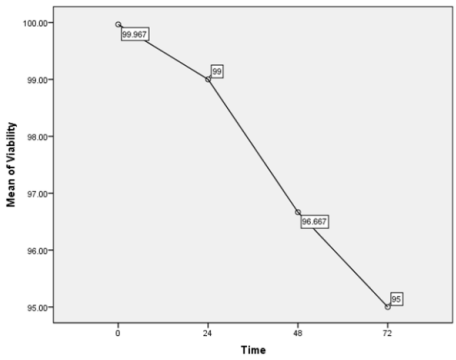
همان‌طور که در نمودار ۳ ملاحظه می‌شود در ۱۲ درجه حرارت نیز در صد سلول‌ها بعد از ۴۸ - ۲۴ ساعت با ($p>۰/۰۰۵$) کاهش یافت ولی از نظر آماری معنی‌دار نیست ولی پس از ۷۲ ساعت کاهش یافت که از نظر آماری معنی‌داراست.

نمودار ۴ تعداد سلول‌ها و در صد زنده ماندن آن‌ها را در ۲۲ درجه حرارت نشان می‌دهد که تعداد سلول‌ها و در صد زنده ماندن آن‌ها تا ۴۸ ساعت کاهش یافت ولی معنی‌دار نیست ($p>۰/۰۰۵$) اما بعد از ۷۲ ساعت کاهش بیشتری داشت.

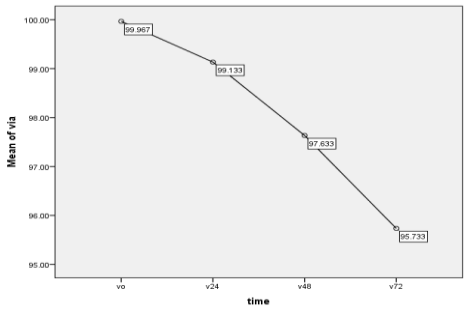
نمودار ۵ درصد زنده‌بودن سلول‌ها را در ۳۷



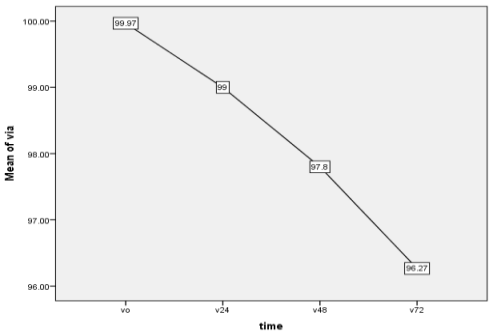

نمودار ۱- طبقه‌بندی شمارش سلولی




نمودار۲- تاثیر زمان و حرارت در درصد زنده ماندن سلولها در ۴ درجه




نمودار ۳- تاثیر زمان و حرارت در زنده ماندن سلولها در ۱۲ درجه حرارت




نمودار ۴- تاثیر زمان و حرارت در زنده ماندن سلولها در ۲۲ درجه حرارت

درجه حرارت نشان می‌دهد که بعد از ۲۴ ساعت به‌شدت کاهش یافت که از نظر آماری معنی‌دار است ($p<۰/۰۰۵$). نمودار ۶ و ۷ تأثیر زمان را در درجه حرارت‌های مختلف پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت



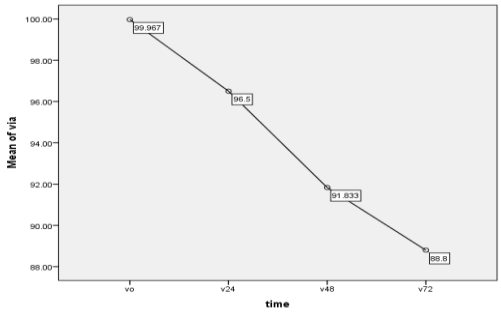
Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 16:38 IRST on Monday February 20th 2017

www.SID.ir

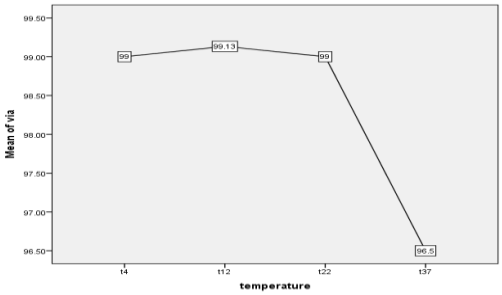
Archive Of SID



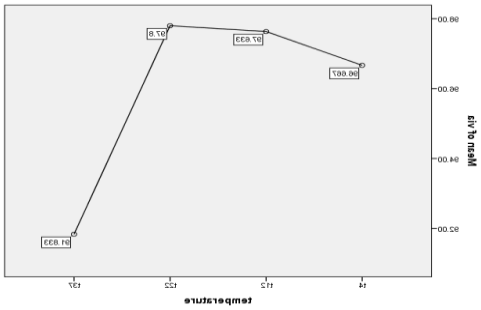
Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 16:38 IRST on Monday February 20th 2017




نمودار ۵- تاثیر زمان و حرارت در زنده ماندن سلولها در ۳۷ درجه حرارت




نمودار ۶- درصد زنده ماندن سلولها در درجه حرارتهای مختلف بعد از ۲۴ ساعت



نمودار ۷- درصد زنده ماندن سلولها در درجه حرارتهای مختلف بعد از ۴۸ ساعت

نشان می‌دهد که بهترین درجه حرارت در این فاصله زمانی ۲۲ -۱۲ درجه بود و از نظر آماری معنی‌دار است ($p<۰/۰۰۵$). ولی بعد از ۷۲ ساعت در صد سلول‌ها تا ۹۵٪ کاهش یافت.

جدول ۱ در صد زنده ماندن سلول‌ها را به تفکیک زمان و حرارت نشان می‌دهد، اعداد داخل ستون در بالا در صد زنده ماندن سلول‌ها و اعداد داخل پرانتز SD آن‌ها را نشان می‌دهد که بر اساس تحلیل‌های آماری انجام شده و با توجه به جدول و مقایسه مقدار به‌دست‌آمده برای P Value با $\alpha=۰/۰۵$ متوجه می‌شویم که در کلیه زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مقدار میانگین Viability در دماهای ۱۲ و ۲۲ درجه دارای بیشترین مقدار بوده است. مقدار P Value به‌دست‌آمده بیانگر این است که نتایج به‌دست‌آمده با احتمال بسیار بالا تقریباً ۱۰۰٪ معتبر است و صحت آماری دارد.

جدول ۱- درصد زنده ماندن سلول‌ها بر حسب زمان و درجه حرارت

| دما / زمان | ۴ | ۱۲ | ۲۲ | ۳۷ |
|---|---|---|---|---|
| ۰ | ۹۹/۹۶ (۰/۱۸) | ۹۹/۹۵ (۰/۱۸) | ۹۹/۹۵ (۰/۱۸) | ۹۹/۹۵ (۰/۱۸) |
| ۲۴ | ۹۹ (۱/۵۰) | ۹۹/۱۳ (۱/۶۳) | ۹۹ (۱/۰۵) | ۹۶/۵ (۲/۳۰) |
| ۴۸ | ۹۶/۶۶ (۲/۵۵) | ۹۷/۶۳ (۲/۴۹) | ۹۷/۸ (۱/۳۲) | ۹۱/۸۳ (۴/۲۶) |
| ۷۲ | ۹۵/۰۴ (۳/۰۳) | ۹۵/۷۳ (۳/۰۸) | ۹۶/۲۶ (۲/۳۶) | ۸۸/۸ (۵/۷۲) |

## بحث و نتیجه‌گیری

با اینکه تاکنون مطالعات زیادی جهت استاندارد نمودن بانک‌های خون بند ناف از نظر انتخاب اهداکننده، خون‌گیری و جداسازی خون بند ناف انجام شده است (۱۲-۱۴) ولی هنوز نیاز به استاندارد نمودن روش‌ها، افزایش کیفیت نمونه از نظر مصارف بالینی و کاهش قیمت تولید می‌باشد. افزایش تعداد سلول‌ها و در صد زنده‌بودن آن‌ها دو فاکتور اساسی در پروسه جداسازی سلول‌ها می‌باشد و از طرفی استاندارد نمودن روش‌های انتخاب اهداکننده، خون‌گیری، چگونگی حمل نمونه، جداسازی، فریز و دفریز آن از اهمیت بالایی برخوردار است و نیاز به بررسی دارد (۱۵-۱۶).

هدف این مطالعه بررسی اثر درجه حرارت و زمان نگهداری نمونه خون بند ناف از زمان خون‌گیری تا مرحله ورود به پردازش و جداسازی سلول‌ها و در صد زنده ماندن سلول‌ها می‌باشد. بیشتر بانک‌های دنیا خون بند ناف را ۳ روز تا زمان جداسازی در حرارت اتاق نگهداری می‌کنند (۱۷ - ۱۸). جهت ارزیابی این طرح، شمارش کل سلول‌های تک‌هسته‌ای و در صد زنده‌بودن سلول‌ها را در زمان‌های متفاوت ورود به آزمایشگاه پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از خون‌گیری و همچنین در درجه حرارت‌های مختلف ۴، ۱۲، ۲۲ و ۳۷ درجه ارزیابی گردید. در این مطالعه، رابطه مستقیمی بین درجه حرارت نگهداری نمونه و سایر پارامترها مشاهده شد. تا ۲۴ ساعت تفاوت چشمگیری در نگهداری نمونه‌ها در ۴، ۱۲ و ۲۲ درجه مشاهده نگردید ولی پس از ۴۸ ساعت



www.SID.ir

Archive Of SID



Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 16:38 IRST on Monday February 20th 2017

درصد زنده‌بودن سلول‌ها کاهش یافت و مشاهده گردید بهترین درجه حرارت برای زنده ماندن سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت ۲۲-۱۲ درجه حرارت می‌باشد و این تغییرات تأثیری در تشکیل لخته نداشت؛ بنابراین پیشنهاد می‌گردد نمونه‌ها جهت جداسازی تا ۴۸ ساعت در ۲۲ -۱۲ درجه نگهداری و حمل شوند اما بهتر است جداسازی هرچه زودتر و در فاصله زمان کوتاه‌تری انجام شود و شرایط فصلی و آب‌وهوای محیط نیز در نظر گرفته شود. به‌عنوان مثال در مناطق سردسیر یا برعکس مناطق گرمسیر نیاز یا عدم نیاز به یخ متفاوت می‌باشد. جمع‌آوری، جداسازی و نگهداری خون بند ناف جهت مصارف کلینیکی برای آینده نزدیک و دور با شرایط مختلف بررسی شده است. شرایط مختلف نگهداری قبل از جداسازی سلول‌ها ارزیابی و آنالیز گردیده است تا اثر فاکتورهای مختلف را روی نگهداری و حمل نمونه‌ها مشخص نماید. دستورالعمل German national (۱۹) حداکثر زمان نگهداری را ۴۸ ساعت در حرارت اتاق تعیین کرده است. اثر نگهداری نمونه را از زمان خون‌گیری تا ۴۸ ساعت بررسی نموده و به این نتیجه رسیدند که حداکثر تا ۴۸ ساعت نگهداری تأثیری در تعداد سلول‌ها و درصد زنده ماندن آن‌ها ندارد و هیچ تغییر قابل‌ملاحظه‌ای از نظر شمارش سلولی، درصد زنده‌بودن سلول‌ها و فعالیت CFU در نگهداری نمونه‌ها در حرارت اتاق و تا ۲۴ ساعت اولیه مشاهده نگردید. ولی در صد سلول‌های زنده بعد از ۴۸ ساعت شروع به کاهش نمودند.

بنابراین بر اساس یافته‌های این مطالعه و مطابقت آن با دستورالعمل German نگهداری سلول‌ها تا ۴۸ ساعت قبل از جداسازی در شرایط مناسب قابل‌قبول است. برخلاف یافته‌های ما گزارشاتی از دیگر محققین هست که نگهداری نمونه‌ها قبل از جداسازی در حرارت اتاق یا یخچال تأثیری در کیفیت و کمیت سلول‌ها ندارد (۲۰، ۲۱). دلیل اختلاف نتایج مشخص نیست ولی شاید به دلیل نامفهوم بودن درجه حرارت و شرایط محیط از یک طرف و اختلاف روش‌های شمارش سلول و شرایط خود خون بند ناف از طرف دیگر باشد. بهترین و مهم‌ترین گزارش مربوط به Moldenhauer و همکارانش می‌باشد (۲۲). آن‌ها گزارش نمودند که بهترین بازدهی CD34+/CD45+ و بالاترین کلونوژنیسیتی و کمترین آپوپتوزیس وقتی به دست می‌آید که نمونه‌ها در حرارت اتاق تا ۴۸ ساعت نگهداری شوند که با یافته‌های ما مطابقت دارد و همین داده‌ها باعث نوشتن دستورالعمل‌های بین‌المللی شده است.

کیفیت و کمیت سلول‌ها در پیوند برای سلامت گیرنده و پاسخ او بسیار مهم است؛ بنابراین یک روش استاندارد برای جمع‌آوری، جداسازی و نگهداری خون بند ناف ضروری می‌باشد. در این مطالعه ما بهترین درجه حرارت و زمان را برای نگهداری خون بند ناف قبل از جداسازی سلول‌ها به دست آوردیم. نتایج ما مشخص نمود که بهترین درجه حرارت ۲۲ – ۱۲ درجه سانتی‌گراد تا حداکثر ۴۸ ساعت است ولی به دلایل ناشناخته دیگر که ممکن است زمان نگهداری خون در کیفیت سلول‌ها داشته باشد و هنوز بررسی نشده، پیشنهاد می‌شود جداسازی سریع‌تر انجام شود.

## تقدیر و تشکر

لازم است از پرسنل فنی و آزمایشگاهی و خون‌گیری و آمار و سایر همکارانی که ما را در اجرای این پروژه یاری کردند تشکر نماییم.

## منابع

1.Gluckman E, Broxmeyer H, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med: 1989; 321(17). 1174-1178.

2.Zarrabi M, Mousavi SH, Abroun S, Sadeghi B. Potential uses for cord blood mesenchymal stem cells. Cell of Yakhteh: 2014;15(4). 274-279.

3.Yoder MC. Cord blood banking and transplantation: advances and controversies. C O in P : 2014;26(2). 163-168.

4.Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. N Engl J of Med: 1997;337(6).373-381.



www.SID.ir

Archive Of SID



Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 16:38 IRST on Monday February 20th 2017

5.Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. N Engl J of Med: 1998;339(22). 1565-1577.

6.Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. Blood: 2001;97(10). 2962-2971.

7.Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. Blood: 2002;100(5). 1611-1618.

8.Eapen M, Rubinstein P, Zhang M-J, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradavou A, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. The Lancet: 2007;369(9577). 1947-1954.

9.Kurtzberg J, Prasad VK, Carter SL, Wagner JE, Baxter-Lowe LA, Wall D, et al. Results of the Cord Blood Transplantation Study (COBLT): clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. Blood: 2008;112(10). 4318-4327.

10.Lim F, Beckhoven J, Brand A, Kluin-Nelemans J, Hermans J, Willemze R, et al. The number of nucleated cells reflects the hematopoietic content of Umbilical Cord Blood for Transplantation. B M Tra: 1999;24(9). 965-970.

11.Keersmaekers CL, Mason BA, Keersmaekers J, Ponzini M, Mlynarek RA. Factors affecting umbilical cord blood stem cell suitability for transplantation in an in utero collection program. Transfusion: 2014;54(3). 545-549.

12.Solves P, Perales A, Mirabet V, Blasco I, Blanquer A, Planelles D, et al. Optimizing donor selection in a cord blood bank. Eur J of Hae . 2004;72(2):107-12.

13.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). 654-659.

14.Jan RH, Wen SH, Shyr MH, Chiang BL. Impact of maternal and neonatal factors on CD34+ cell count, total nucleated cells, and volume of cord blood. Ped Tra: 2008;12(8). 868-873.

15.Rocha V, Broxmeyer HE. New approaches for improving engraftment after cord blood transplantation. B of B and M Tra: 2010;16(1). S126-s132.

16.Allan D, Petraszko T, Elmoazzen H, Smith S. A Review of Factors Influencing the Banking of Collected Umbilical Cord Blood Units. S C Int: 2013;2013.

17.Campos L, Roubi N, Guyotat D. Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells. Cryobiology: 1995;32(6). 511-515.

18.Louis I, Wagner E, Dieng MM, Morin H, Champagne MA, Haddad E. Impact of storage temperature and processing delays on cord blood quality: discrepancy between functional in vitro and in vivo assays. Transfusion: 2012;52(11). 2401-2415.

19.Richtlinien L. Richtlinien zur Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut (CB= Cord Blood). Dtsch Ärztebl A: 1999;96.1297-1304.

20.Bertolini F, Gibelli N, Lanza A, Cuomo A, Cuna GR, Nelson EJ. Effects of storage temperature and time on cord blood progenitor cells. Transfusion: 1998;38(6). 615-617.

21.Koenigbauer UF, Burger SR, McCullough J. Non-frozen preservation of umbilical cord blood. Transfusion: 2002;42(10). 1383-1384.

22.Moldenhauer A, Wolf J, Habermann G, Genter G, Kiesewetter H, Salama A. Optimum storage conditions for cord blood-derived hematopoietic progenitor cells prior to isolation. B M Tran: 2007;40(9). 837-842.



www.SID.ir

Archive Of SID

Original Article http://rjms.iums.ac.ir

# Effect of storage temperature on cord blood hematology parameters over the time

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 16:38 IRST on Monday February 20th 2017

**Tahereh Zandieh**, Associate.profe Cord Blood Bank - - Royan Stem Cell Technology Cord Blood Bank, Tehran, Iran, (*Corresponding author) tz7892000@yahoo.com
**Solaleh Samimi**, B.S Cord Blood Bank - - Royan Stem Cell Technology Cord Blood Bank, Tehran, Iran - s.samimi@rsct.ir
**Seyed Hadi Mosavi**, PhD Cord Blood Bank - - Royan Stem Cell Technology Cord Blood Bank, Tehran, Iran - haematology81@gmail.com
**Maryam Radmanesh**, M.D Cord Blood Bank - - Royan Stem Cell Technology Cord Blood Bank, Tehran, Iran - d.rad_m@yahoo.com
**Ashkan Mozdgir**, M.S Cord Blood Bank - - Royan Stem Cell Technology Cord Blood Bank, Tehran, Iran - a.mozdgir@rsct.ir
**Morteza Zarrabi**, M.D Cord Blood Bank - - Royan Stem Cell Technology Cord Blood Bank, Tehran, Iran - m.zarrabi@rsct.ir

## Abstract

**Background**: Umbilical cord blood has been increasingly used as an alternate source of hematopoietic stem cells in the treatment of Hematologic malignancies and life-threatening diseases. The success of engraftment and survival of patients after cord blood transplantation highly depend on either the number of infused total nucleated cells (TNCs) or the number of CD34+ cells per kilogram of recipient body weight. A standardization procedure for cord blood (CB) storage before and during cryopreservation is critical. This work is concerned with the effect of CB storage temperature and storage duration through the stages before cryopreservation on cell recovery, viability, aggregation of cells.

**Methods**: Total of 30 CB samples were casual collected from Tehran hospitals and remittances to cord blood bank. Total cells and viability were calculated and aggregation was evaluated. Each sample divided to 4 sample and stored at 4°C, 12 °C, 22 °C, and 37 °C for different periods of time after 12, 24, 48 and 72 hours. Total cells and viability were calculated and aggregation was evaluated. Subsequently, these results were evaluated with ANOVA methods.

**Results**: At the beginning of the experiment, the total number of cells was 5-10 million/ml. All the specimens were investigated after 24 hours. At 4 c° a decrease in the number of viability cells was observed that was statistically significant with a $p<0.005$. However, the reduction in the number of live cells at 12 degrees Celsius and 24 degrees Celsius was not statistically significant ($p>0.005$). A significant drop ($p<0.005$) in the number of live cells was observed at 37 c°.

**Conclusion**: This study shows that the vulnerability level of cells outside the body from cord blood collection till separation and freezing is directly correlated with storage time and temperature, which is statistically significant with a $p<0.005$. Nevertheless, changing temperature and storage time did not affect aggregation of cells. These findings suggest that the optimum temperature for storing cord blood is 12-22 c° degrees Celsius for up to 48 hour

**Keywords:** Cord Blood, Cryopreservation, Hematopoietic



www.SID.ir