

## آیا سلول‌های $CD4^+/CD8^+$ و $CD45RA^+/RO^+$ خون بند ناف پره ترم، خصوصیات عملکردی

### متفاوتی را در مقایسه با سلول‌های مشابه در خون بند ناف ترم نشان می‌دهند؟

دکتر مریم خیراندیش<sup>۱</sup>، دکتر معصومه ابتکار<sup>۲</sup>، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله<sup>۳</sup>، دکتر زهیر محمدحسن<sup>۴</sup>،

دکتر سید داور سیادت<sup>۴</sup>، دکتر اردشیر کاظم‌نژاد<sup>۳</sup>

#### چکیده

#### سابقه و هدف

گزارش‌های مختلف نشان می‌دهند که سلول‌های خونساز خون بند ناف نوزادان پره ترم، توانایی تکثیر و خصوصیت خود تجدید شونده بالایی را در مقایسه با مغز استخوان و خون بند ناف نوزادان ترم نشان می‌دهند. در این تحقیق، وضعیت سلول‌های ایمنی خون بند ناف پره ترم به عنوان مرحله‌ای از مراحل تکاملی و هم از جنبه بررسی وضعیت بی‌تجربه بودن، با سلول‌های مشابه در خون بند ناف ترم مقایسه شدند.

#### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پس از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از خون بند ناف ترم (بالای ۳۷ هفته) و پره ترم (کمتر از ۳۷ هفته) در محیط کشت کامل و حاوی  $50 \text{ ng/ml}$  PMA و  $1 \mu\text{g/ml}$  یونومايسين در حضور مونت زین کشت داده شد. سپس با استفاده از ساپونین ۰/۱ درصد نفوذ پذیر شده، جهت بررسی میزان فعال شدن سلول‌ها پس از تحریک با PMA و یونومايسين، با منوکلونال آنتی‌بادی Anti-CD69 و برای ارزیابی تولید سایتوکاین با آنتی‌بادی‌های اختصاصی کونژوگه IL-2، IL-4، IFN- $\gamma$  و IL-10 رنگ آمیزی شد. میانگین درصد فراوانی سلول‌های تولید کننده سایتوکاین و میزان بیان سایتوکاین در فنوتیپ سلولی  $CD4^+/CD8^+$ ،  $CD45RA^+/RO^+$  با استفاده از دستگاه کولتر Epics-XL و با استفاده از نرم‌افزار Immuno-4 آنالیز شد. جهت تحلیل آماری نتایج از آزمون‌های کولموگروف - اسمیرنوف و (t(student's t-test) با سطح معنی داری  $p < 0.05$  استفاده شد.

#### یافته‌ها

مطالعه فنوتیپ سلولی نشان داد که در میانگین درصد سلول‌های  $CD4^+CD45RO^+$ ،  $CD4^+CD45RA^+$  و  $CD8^+CD45RO^+$  خون بند ناف ترم و پره ترم تفاوت معنی‌داری دیده نمی‌شود. مقایسه میانگین درصد سلول‌های  $CD3^+$ ،  $CD4^+$ ،  $CD8^+$ ،  $CD3^+HLA-DR$ ،  $CD4^+HLA-DR$  و  $CD25^+$  در خون بند ناف ترم افزایش معنی‌داری در مقایسه با خون بند ناف پره ترم نشان می‌دهد. علاوه بر این، مقایسه میانگین درصد سلول‌های تولید کننده سایتوکاین‌های IL-2، IFN- $\gamma$ ، IL-4، IL-10 و میزان بیان آن‌ها تفاوت معنی‌داری را بین دو نوع سلول نشان نداد.

#### نتیجه‌گیری

از آنجایی که سلول‌های ایمنی خون بند ناف پره ترم در مقایسه با خون بند ناف ترم از نظر عملکردی تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهند، پیوند سلول‌های بنیادی از این منبع سلولی نه تنها دارای رفتار ایمونولوژیک یکسان با خون بند ناف ترم به خصوص از نقطه نظر GVHD می‌باشد، بلکه با توجه به فراوانی و توانایی تکثیر بالاتر سلول‌های بنیادی آن و علاوه بر آن حضور پیش‌سازهای غیر بالغ‌تر از نظر آنتوژنی، می‌تواند احتمالاً نسبت به خون بند ناف ترم اولویت داشته در موارد پیوند کاربرد یابد.

**کلمات کلیدی:** بند ناف، پره ترم،  $CD4^+$  T لنفوسیت،  $CD8^+$  T لنفوسیت، سایتوکاین

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۳/۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۷/۱۵

۱- مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۲- PhD ایمونولوژی - دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۳- PhD ایمونولوژی - استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۴- PhD میکروبیولوژی - استادیار انستیتو پاستور ایران

**مقدمه**

کاهش قابل توجه بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD = Graft Versus Host Disease) پس از پیوند خون بند ناف به طور عمده به بی تجربه بودن (Naivete) سیستم ایمنی خون بند ناف نسبت داده می‌شود. مطالعات مختلف فنوتیپ سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف و بالغین را مقایسه کرده‌اند، اگر چه تناقض‌هایی در مقاله‌های مختلف دیده می‌شود، اما عموماً گزارش شده است که سلول‌های T خون بند ناف از نظر فنوتیپی و عملکردی بالغ نیستند. این موضوع، از نظر بیان ایزوفرم‌های CD45 و هم چنین بیان سایر مارکرهای سطحی سلول نظیر CD38 و CD24 نشان داده شده است (۱). اکثریت سلول‌های T خون بند ناف، ایزوفرم CD45RA را بیان می‌کنند و درصد خیلی کمی از سلول‌های CD45RO, T را بیان می‌نمایند. بر خلاف آن درصد کمی از سلول‌های T خون محیطی بالغین، CD45RA را بیان می‌دارند در حالی که در درصد بیشتری از سلول‌های T حافظه‌ای، CD45RO<sup>+</sup> وجود دارد (۲، ۳). در مجموع تحلیل فنوتیپی سلول‌های T خون بند ناف دلالت بر آن دارد که این سلول‌ها، بی تجربه‌تر از سلول‌های مشابه در خون محیطی بالغین‌اند (۴-۶). برای تعیین این که، آیا فنوتیپ بی تجربه بر فعالیت سلول T تاثیر می‌گذارد، با استفاده از انواع روش‌های تحریکی، مطالعات بسیار زیادی بر عملکرد این سلول‌ها صورت گرفته است (۳۰-۷). مطالعات مختلف نشان می‌دهند که سلول‌های CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> خالص شده خون بند ناف پس از تحریک قادر به ساختن IL-2 نیستند. در خصوص نتایج مربوط به مطالعات تولید سایتوکاین توسط سلول‌های T خون بند ناف در مورد IL-4 و IFN- $\gamma$  نتایج یکسانی گزارش شده است. بدون در نظر گرفتن روش تحریک به کار گرفته شده، تولید IL-4 و IFN- $\gamma$  از سلول‌های T خون بند ناف کمتر از سلول‌های بالغین است. این اختلافات علاوه بر کاهش تولید پروتئین، کاهش میزان mRNA و نسخه‌برداری را نیز شامل می‌شود (۱). از طرفی گزارش‌ها نشان داده‌اند، شناسایی سلول‌های بنیادی خونساز در خون بند ناف نوزادان نابالغ که طی هفته‌های ۳۱-۲۳ بارداری متولد می‌شوند، در مقایسه با مغز استخوان و خون بند ناف

نوزادان بالغ، توانایی تکثیر بیشتری دارند. داده‌ها و شواهد مختلف نشان می‌دهند که جنین بسیار نارس (extremely preterm) حاوی ذخیره‌ای از سلول‌های اجدادی خونساز بسیار نابالغ در گردش خون بند ناف است. با افزایش سن بارداری، مسیر پیشرونده تمایز و تعهد سلولی در اجداد خونساز افزایش می‌یابد. از آن جایی که سلول‌های اجدادی/بنیادی خونساز خون بند ناف نوزادان نارس در مقایسه با نوزادان بالغ، دارای پتانسیل بالای بازسازی مجدد مغز استخوان می‌باشند، این سؤال مطرح است که در آن صورت خصوصیت ایمونولوژیک خون بند ناف پره ترم در مقایسه با خون بند ناف ترم به خصوص از نقطه نظر نقشی که در پاتوژنز GVHD دارد، چگونه خواهد بود و این که آیا استفاده از این منبع، مناسب‌ترین و بی‌خطرترین منبع سلولی جهت بازسازی مجدد سلول‌های خونساز نخواهد بود؟ (۳۲، ۳۱).

لذا در این مطالعه، ضمن بررسی فنوتیپ سلول‌های CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>، CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup> و میزان فعال شونده‌گی اولیه، فراوانی سلول‌های تولید کننده سایتوکاینی و میزان دانسیته بیان سایتوکاین‌ها (MFI = Mean Fluorescent Intensity) با روش فلوسایتومتری و در حد تک سلول جهت بررسی عملکرد سلولی مقایسه شدند.

**مواد و روش‌ها****آنتی‌بادی:**

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در رنگ‌آمیزی آنتی‌ژن سطح سلولی شامل منوکلونال آنتی‌بادی‌های موشی ضد CD4، CD8، CD45RA، CD45RO انسانی کونژوگه با فلورئوسانس ایزوتیوسیانات (FITC) نشان‌دار، بودند.

جهت رنگ‌آمیزی داخل سلول آنتی‌ژن فعال شونده‌گی اولیه، از منوکلونال آنتی‌بادی ضد CD69 نشان‌دار با فایکواریترین (RPE) استفاده شد. بررسی میزان فراوانی سلول‌های تولید کننده سایتوکاین با استفاده از منوکلونال آنتی‌بادی‌های ضد IL-2، IL-4، IFN- $\gamma$ ، IL-10 انسانی کونژوگه با RPE که همگی از شرکت فارمین ژن تهیه شده بود، صورت گرفت.

راژین:

راژین‌های مورد استفاده شامل موارد زیر بودند: فوربول ۱۲ میرستات ۱۳ استات (PMA)، یونومایسین، مون‌زین، پارافرمالدئید، ساپونین و فایکول - هایپک که همگی از شرکت سیگما تهیه شده بود. محیط کشت RPMI-1640، سرم جنین گاو (Fetal Calf Serum FCS)، Hanks، Blanced (Salt solution HBSS)، بافر HEPES، گلوتامین، پنی سیلین/استرپتومایسین که همگی از جیبکو تهیه شده بود.

جداسازی و کشت سلول‌ها:

خون بند ناف پس از دریافت موافقت‌نامه، از ۱۵ نوزاد پره ترم (کمتر از ۳۷ هفتگی) و ۱۵ نوزاد ترم (بیشتر از ۳۷ هفتگی) پس از زایمان جمع‌آوری و به لوله‌های استریل هپارینه انتقال یافت.

سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف ترم و پره ترم با استفاده از سانتریفوژ گرادیان غلظت بر روی فایکول - هایپک جدا شد. سلول‌ها پس از جداسازی با هنکس شستشو و به میزان  $5 \times 10^5$  cells/ml در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FCS، ال گلوتامین (۲۰ mM)، پنی سیلین/استرپتومایسین (۵۰ µg/ml)، هیپس (۲۰ mµl)، HEPES کشت داده شد. سلول در پلیت ۲۴ خانه‌ای در حضور مون‌زین  $(1/7 \mu\text{g/ml})$  به مدت ۴ ساعت در حضور PMA (۱۰ mg/ml) به علاوه یونومایسین (۱۰ µg/ml) تحریک و به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با میزان ۵ درصد  $\text{CO}_2$  انتقال یافت.

رنگ‌آمیزی آنتی‌ژنی جهت بررسی سایتوکاین‌های داخل سلولی:

سلول‌های کشت داده شده در محلول شستشوی سلولی (PBS حاوی FCS، ۲ درصد) شسته شدند. تعداد  $2/5 \times 10^5$  سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محلول شستشو، سوسپانسیون و با تیترا مناسبی از منوکلونال آنتی‌بادی‌های CD45RO، CD45RA، CD8، CD4 جهت شناسایی فنوتیپ سطحی در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. سلول‌ها سپس با استفاده از محلول فیکس

کننده پارافرمالدئید (۴ درصد) و محلول نفوذپذیر کننده ساپونین (۰/۱ درصد) فیکس و نفوذپذیر شدند. پس از ۲ بار شستشو با محلول شستشوی سلولی، سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با فرمالدئید ۱/۵ درصد فیکس شدند. مجدداً پس از شستشو، در حضور ساپونین ۰/۱ درصد با آنتی‌بادی‌های اختصاصی سایتوکاینی IL-2، IL-4، IFN- $\gamma$ ، IL-10 به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد رنگ‌آمیزی شدند. پس از دوبار شستشو، سوسپانسیون سلولی با دستگاه فلوسایتومتری کوکتر Epics-XL آنالیز شد. برای هر نمونه سلولی از کنترل ایزوتیپ مناسب جهت حذف رنگ زمینه استفاده گردید. جهت ارزیابی بیان داخل سیتوپلاسمی CD69، سلول‌ها تحت همان شرایط تحریک و به مدت ۴ ساعت در حضور مون‌زین کشت داده شدند.

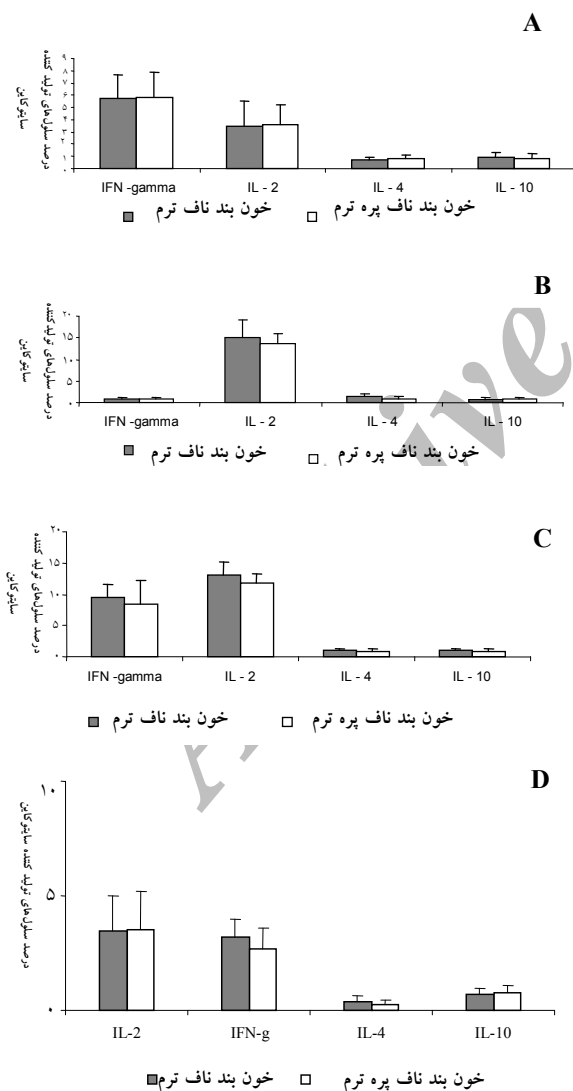
تحلیل داده‌ها:

داده‌های ذخیره شده با نرم افزار (LYSIS II) دستگاه فلوسایتومتری تحلیل شدند. سلول‌های مرده و مونوسیت‌ها با انجام gating مناسب و تنظیم FCS/SSC از مطالعه حذف گردید. در تحلیل نمونه، حداقل ۱۰،۰۰۰ سلول مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از نمودارهای مورد آزمایش با نمودارهای کنترل ایزوتیپ مقایسه و آنالیز گردید. فراوانی سلول‌های تولید کننده سایتوکاین به صورت میانگین درصد ( $\pm$  SD) آورده شده است. جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف و جهت مقایسه فراوانی سلول‌های تولید کننده و میزان بیان سایتوکاین‌ها در سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف ترم و پره ترم از آزمون آماری t استیودنت با  $p < 0/05$  استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج بررسی فنوتیپ سطحی سلول‌های ایمنی خون بند ناف ترم و پره ترم در جدول ۱ آمده است. همان طور که جدول نشان می‌دهد، میانگین درصد سلول‌های  $\text{CD}4^+$ ،  $\text{HLA-DR}^+$ ،  $\text{CD}8^+$ ،  $\text{CD}3^+$ ،  $\text{CD}25^+$  در خون بند ناف ترم افزایش معنی‌دار را در مقایسه با خون بند ناف پره ترم نشان می‌دهد. در حالی که سلول‌های  $\text{CD}4^+$  و  $\text{CD}8^+$  تفاوت معنی‌داری را نشان

CD4<sup>+</sup> در خون بند ناف ترم در مقایسه با پره ترم تفاوت معنی دار نشان می‌دهد (p < ۰/۰۰۱). مقایسه میانگین درصد سلول‌های تولیدکننده سایتوکاین‌های IL-2، IFN- $\gamma$ ، IL-4، IL-10 از سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف ترم و پره ترم در سنجش تولید سایتوکاین داخل سلولی با روش فلوسایتومتري تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (نمودارهای ۱ و ۲). در این مطالعه، میزان بیان سایتوکاین‌های مختلف (Mean Fluorescent Intensity) نیز اندازه‌گیری شد (نمودار ۳).



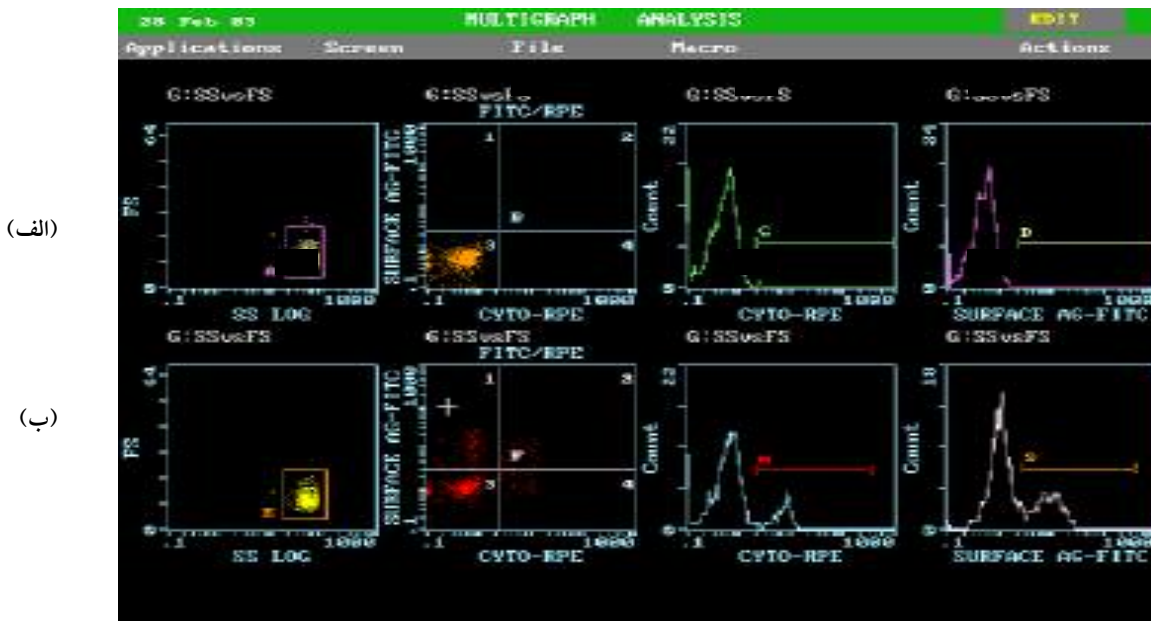
نمودار ۱: میانگین درصد فراوانی سلول‌های تولیدکننده سایتوکاین در نمونه‌های سلولی تک‌هسته‌ای خون بند ناف ترم و پره ترم در فنوتیپ‌های: A:CD4 , B:CD8 , C:CD45RA , D:CD45RO

نمی‌دهد. آنالیز بیان مارکرهای سطحی بی‌تجربگی (Naivete) و حافظه‌ای بر سطح سلول‌های CD4<sup>+</sup> و CD8<sup>+</sup> در خون بند ناف ترم و پره ترم در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که جدول نشان می‌دهد، مقایسه ایزوفرم‌های CD45 بر سطح سلول‌های CD4<sup>+</sup> ، CD8<sup>+</sup> در خون بند ناف ترم در مقایسه با پره ترم تفاوت معنی‌دار را نشان نمی‌دهد، اما بیان CD45RO بر سطح سلول‌های جدول ۱: تحلیل فنوتیپی زیر جمعیت‌های لنفوسیتی خون بند ناف ترم و پره ترم (تعداد نمونه‌ها = ۱۵)

زیر جمعیت لنفوسیتی	خون بند ناف ترم	خون بند ناف پره ترم	مقدار p
	میانگین $\pm$ SD درصد	میانگین $\pm$ SD درصد	
CD3 <sup>+</sup>	۶۷/۰۸ $\pm$ ۵/۱۶	۵۷/۸۲ $\pm$ ۴/۱۷	<۰/۰۰۰۰۱
CD4 <sup>+</sup>	۴۹/۱۱ $\pm$ ۸/۱۲	۴۱/۲۷ $\pm$ ۲/۴۷	<۰/۰۰۰۰۱
CD8 <sup>+</sup>	۲۱/۱۵ $\pm$ ۴/۴۵	۱۹/۹۱ $\pm$ ۰/۹۳	<۰/۰۰۵
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	۲/۵۳ $\pm$ ۰/۷۶	۲/۵۶ $\pm$ ۰/۶۳	معنی دار نیست
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	۱/۹۸ $\pm$ ۰/۹۳	۱/۴۷ $\pm$ ۰/۴۵	<۰/۰۰۵
CD4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	۴/۴۰ $\pm$ ۲/۳۵	۲/۷۷ $\pm$ ۱/۶۸	<۰/۰۰۵
CD8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	۲/۴۵ $\pm$ ۱/۳۶	۲/۴۸ $\pm$ ۱/۱۷	معنی دار نیست
CD25 <sup>+</sup>	۳/۳۶ $\pm$ ۱/۹۶	۱/۸۴ $\pm$ ۰/۸۵	<۰/۰۰۱

جدول ۲: تحلیل بیان مارکرهای بی‌تجربگی (Naivety) و حافظه‌ای بر سطح سلول‌های T ، CD4<sup>+</sup> و CD8<sup>+</sup> خون بند ناف ترم و پره ترم در gate لنفوسیتی (تعداد نمونه‌ها = ۱۵)

زیر جمعیت لنفوسیتی	خون بند ناف ترم	خون بند ناف پره ترم	مقدار p
	میانگین $\pm$ SD درصد	میانگین $\pm$ SD درصد	
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>	۸۲/۹۴ $\pm$ ۳/۲۶	۸۳/۸۹ $\pm$ ۳/۰۶	معنی دار نیست
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	۱۵/۲۰ $\pm$ ۲/۴۳	۱۲/۳۷ $\pm$ ۲/۶۸	<۰/۰۰
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	۵/۸۸ $\pm$ ۲/۴۲	۵/۲۲ $\pm$ ۲/۹۲	معنی دار نیست



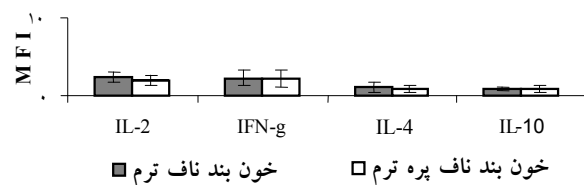
نمودار ۲: بررسی فراوانی سلول‌های تولیدکننده سایتوکاین در خون بند ناف ترم با استفاده از فلوسایتومتری در gate لنفوسیتی.

الف - لنفوسیت‌های تحریک شده با PMA و یونومایسین پس از رنگ‌آمیزی با کنترل ایزوتیپ‌های منطبق بر منوکلونال آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه مارکرهای سطحی و سایتوکاین‌ها جهت تعیین حدود واکنش‌های اختصاصی (ب) لنفوسیت‌های تحریک شده با PMA و یونومایسین پس از رنگ‌آمیزی با منوکلونال آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه مارکر سطحی CD8 و سایتوکاین IFN- $\gamma$  - سلول‌های تولیدکننده سایتوکاین در gate لنفوسیتی ۲- پلات نقطه‌ای سلول‌های دو مثبت CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$  (F2) ۳- درصد سلول‌های تولیدکننده سایتوکاین ۴- درصد سلول‌های بیان‌کننده مارکر سطحی CD8

رنگ‌آمیزی سلول‌های کنترل (بدون تحریک) با مارکرهای CD8، CD4، CD45RA/CD45RO جهت بررسی سایتوکاین‌های تولید شده، تفاوت معنی‌داری را در منابع سلولی نشان نمی‌دهند و تقریباً همگی میزان فراوانی کمتر از ۱ درصد را نشان می‌دهند (نتایج داده نشده است).

جدول ۳: میزان بیان داخل سلولی آنتی‌ژن فعال شونده اولیه، CD69 در سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف ترم و پره‌ترم پس از تحریک سلول‌ها با PMA یونومایسین (تعداد نمونه‌ها = ۱۵)

میانگین درصد بیان آنتی‌ژن فعال شونده CD69 (SD $\pm$ میانگین درصد)		وضعیت سلول در تحریک با PMA یونومایسین
خون بند ناف ترم	خون بند ناف پره‌ترم	
۰/۳۱ $\pm$ ۰/۱۷	۰/۳۱ $\pm$ ۰/۱۶	سلول کنترل (بدون تحریک)
۸۰/۸۱ $\pm$ ۵/۲۹	۷۹/۲۷ $\pm$ ۳/۳۴	سلول تحریک شده



نمودار ۳: میزان بیان سایتوکاین‌های داخل سلولی، در سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف ترم و پره‌ترم

مقایسه میانگین بیان سایتوکاین‌های IL-4، IL-10، IL-2، IFN- $\gamma$  در سلول‌های تک هسته‌ای تولیدکننده سایتوکاین در خون بند ناف ترم و پره‌ترم در gate لنفوسیتی تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. این در حالی است که، سلول‌های خون بند ناف ترم و پره‌ترم می‌توانند تحت تاثیر PMA و یونومایسین به خوبی تحریک شوند و میزان یکسان و بدون اختلاف معنی‌داری از بیان CD69 را به عنوان یک آنتی‌ژن اولیه فعال شونده نشان دهند (جدول ۳).

**بحث**

لنفوسیت‌ها در جنین انسان در حدود ۳/۵ هفتگی بارداری قابل شناسایی‌اند. زیر مجموعه‌های  $CD4^+$ ،  $CD8^+$  در گردش خون جنین پس از هفته چهاردهم بارداری که نشانگر عملکرد و بلوغ داخل تیموسی است، ظاهر می‌شوند. گزارش‌ها نشان می‌دهد که تعداد لنفوسیت‌های  $CD4^+$  و  $CD8^+$  خون بند ناف به طور معنی‌داری با افزایش سن بارداری افزایش می‌یابد (۳۳، ۳۴). در این مطالعه نمونه‌های خونی از بند ناف نوزادان سالم، پس از زایمان طبیعی مادران باردار سالم در محدوده سنی ۲۳-۳۶ هفتگی (پره ترم) و ۳۷-۴۲ هفتگی (ترم) مطالعه شدند. مطالعه فنوتیپ سطحی سلول‌ها اختلاف معنی‌داری را در دو منبع سلول نشان نمی‌دهد. علاوه بر این، بین درصد سلول‌های تولید کننده سایتوکاین و میزان MFI تحت شرایط تحریکی که در این مطالعه انجام شد، اختلافی مشاهده نگردید. اگر چه در بعضی موارد افزایش نیز مشاهده می‌شد، اما این مقادیر معنی‌دار نبود. کلیه مقادیر به دست آمده در مقایسه با سلول‌های مشابه در خون محیطی بالغین کاهش نشان می‌دهند (داده‌ها نشان داده نشده است) و این موضوع، یعنی عدم صلاحیت ایمونولوژیک سلول‌های سیستم ایمنی جنین، بخشی از مکانیسم سازشی است که برای حیات و بقای جنین به عنوان آلوگرافت در طول یک بارداری طبیعی، مهم و ضروری است.

از طرفی، با در نظر گرفتن نقش سلول‌های T خون بند ناف در GVHD، کاهش بیان CD25 در سطح سلول‌های T خون بند ناف بیانگر این حقیقت است که پاسخ سلول T در GVHD و جریان سایتوکاینی، با عدم توانایی سلول‌های T در پاسخ به IL-2 به عنوان فاکتور اصلی رشد سلول T مهار می‌شود.

آن چه که توسط گروه‌های مختلف تحقیقاتی تاکید شده است و ما نیز در مطالعه خود به آن رسیدیم آن است که

خون بند ناف حاوی مقادیر فراوانی از سلول‌های T با فنوتیپ CD45RA است. بنابراین علت تغییر پروفیل سایتوکاینی در خون بند ناف، احتمالاً کاهش نسبت سلول‌های T حافظه‌ای  $CD45RO^+$  موجود در این منبع سلولی است.

داده‌های ما نشان می‌دهند، علی‌رغم این که سلول‌های خون بند ناف ترم و پره ترم می‌توانند تحت تاثیر PMA و یونوماپسین به خوبی تحریک شوند و میزان یکسان و بدون اختلاف معنی‌داری از بیان CD69 را به عنوان یک آنتی‌ژن اولیه فعال شونده نشان دهند، اما فقط درصد بسیار کمی از سلول‌ها ظرفیت تولید سایتوکاین را از خود نشان می‌دهند. این موضوع به نوبه خود وجود نقص ذاتی در سلول‌های خون بند ناف در تولید سایتوکاین‌ها، تحت شرایط تعریف شده در این مطالعه را قوت می‌بخشد.

**نتیجه‌گیری**

از آن‌جایی که سلول‌های  $CD45RA^+/RO^+$ ،  $CD4^+/CD8^+$  خون بند ناف پره ترم در مقایسه با خون بند ناف ترم از نظر عملکردی تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهند، پیوند سلول‌های بنیادی از این منبع سلولی نه تنها دارای رفتار ایمونولوژیک یکسان با خون بند ناف ترم به خصوص از نقطه نظر GVHD می‌باشد، بلکه با توجه به فراوانی بیشتر، توانایی تکثیر بالاتر سلول‌های بنیادی آن و علاوه بر این حضور پیش‌سازهای غیر بالغ‌تر از نظر آنتوژنی می‌تواند احتمالاً نسبت به خون بند ناف ترم اولویت داشته، در موارد پیوند کاربرد یابد.

**تشکر و قدردانی**

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از پرسنل محترم بخش فلوسایتومتری سازمان انتقال خون ایران به پاس همکاری بی‌دریغ در انجام این تحقیق اعلام می‌دارند.

## References :

- 1- Cohen SBA, Gluckman E, Rubinstein P, Madrigal JA editors. Cord blood characteristics role in stem cell transplantation. London: Matrin Dunitz; 2000.
- 2- Beck R, Lam-Po-Tang P. Comparison of cord blood and adult blood lymphocyte normal ranges: a possible explanation for decreased severity of graft versus host disease after cord blood transplantation. *J Immunol Cell Biol* 1994; 72: 440-4.
- 3- D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio G, Zendoli F, Carotenuto M, et al. Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. *Haematologica* 1998; 83: 197-203.
- 4- Sanders ME, Makgoba MW, Shaw S. Human naïve and memory T cells: reinterpretation of helper- inducer and suppressor – inducer subsets. *Immunol Today* 1988; 9: 195-9.
- 5- Pinto L, Covas MJ, Victorino RM. Loss of CD45RA and gain of CD45RO after *in vitro* activation of lymphocytes from HIV-infected patients. *Immunology* 1991; 73: 147-50.
- 6- Wallace DL, Beverley PC. Phenotypic changes associated with activation of CD45RA<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> T cells. *Immunology* 1990; 69: 460-7.
- 7- Yamada A, Kaneyuki T, Hara A, Rothstein DM, Yokoyama MM. CD45 isoform expression on human neonatal T cells: expression and turnover of CD45 isoforms on neonatal versus adult T cells after activation. *Cell Immunol* 1992; 142: 114-24.
- 8- Hassan J, Reen D. Cord blood CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> T cells achieve a lower magnitude of activation when compared with their adult counterparts. *Immunology* 1997; 90: 397-401.
- 9- Lucivero G, Dalla Mora L, Bresciano E, Loria MP, Pezone L, Mancino D. Functional characteristics of cord blood T lymphocytes after lectin and anti-CD3 stimulation. Differences in the way T cells express activation molecules and proliferate. *Int J Clin Lab Res* 1996; 26: 225-61.
- 10- Amlot PL, Tahami F, Chinn D, Rawlings E. Activation antigen expression on human T cells (I): analysis by two-colour flow cytometry of umbilical cord blood, adult blood and lymphoid tissue. *Clin Exp Immunol* 1996; 105: 176-82.
- 11- Pirenne-Ansart H, Paillard F, De Groote D, Eljaafari A, Le Gac S, Blot P, et al. Defective cytokine expression but adult-type T-cell receptor, CD8, and p56lck modulation in CD3<sup>+</sup> or CD2<sup>+</sup> activated T cell from neonates. *Pediatr Res* 1995; 37: 64-9.
- 12- English BK, Hammond WP, Lewis DB, Brown CB, Wilson CB. Decreased granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production by human neonatal blood mononuclear cells and T cells. *Pediatr Res* 1992; 31: 211-16.
- 13- Matsuzaki N, Saji F, Okada T, Sawao K, Kameda T, Tanaka T, et al. Demonstration of functional immaturity of signal transduction pathways in human cord T cells. *Cell Immunol* 1989; 124: 252-63.
- 14- Nonoyama S, Penix LA, Edwards CP, Lewis DB, Ito S, Aruffo A, et al. Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 66-75.
- 15- Gerli R, Bertotto A, Crupi S, Arcangeli C, Marinelli I, Spinozzi F, et al. Activation of cord T lymphocytes (I): evidence for a defective T cell mitogenesis induced through the CD2 molecule. *J Immunol* 1989; 142: 83-9.
- 16- Hassan J, O'Neill S, O'Neill LA, Pattison U, Reen DJ. Signalling via CD28 of human naive neonatal T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 192-8.
- 17- Geller RL, Gromo G, Inverardi L, Ferrero E, Bach FH. Stepwise activation of T cells: role of the calcium ionophore A23187. *J Immunol* 1987; 139: 3930-4.
- 18- Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357: 695-7.
- 19- Woodrow M, Clipstone NA, Cantrell D. P21 ras and calcineurin synergize to regulate the nuclear factor of activated T cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1517-22.
- 20- Bertotto A, Gerli R, Lanfrancone L, Crupi S, Arcangeli C, Cernetti C, et al. Activation of cord T lymphocytes (II): cellular and molecular analysis of the defective response induced by anti-CD3 monoclonal antibody. *Cell Immunol* 1990; 127: 247-59.
- 21- Gerli R, Agea E, Muscat C, Tognellini R, Spinozzi F, Cernetti C, et al. Activation of cord T lymphocytes (III): role of LFA-1/ICAM-1 and CD2/LFA-3 adhesion molecules in CD3-induced proliferative response. *Cell Immunol* 1993; 148: 32-47.
- 22- Hu-Li J, Shevach EM, Mizuguchi J, Ohara J, Mosmann T, Paul WE. B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) is a potent costimulant for normal resting T lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165: 157-72.
- 23- Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. *J Immunol* 1988; 141: 1543-9.
- 24- Morrissey PJ, Goodwin RG, Nordan RP, Anderson D, Grabstein KH, Sims J, et al. Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has co-stimulatory activity on purified mature T cells. *J Exp Med* 1989; 169: 707-16.
- 25- Risdon G, Gaddy J, Stehman FB, Broxmeyer HE. Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocytes following allogeneic stimulation. *Cell Immunol* 1994; 154: 14-24.
- 26- Harris DT, Schumacher MJ, Locascio J, Besencon FJ, Oslon GB, Deluca D, et al. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1006-10.
- 27- Keever C, Abu-Hajir M, Graf W, MC Fadden P, Prichard P, O'Brient J, et al. Characterization of the alloreactivity and antileukemia reactivity of cord blood mononuclear cells. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 407-19.
- 28- Porcu P, Gaddy J, Broxmeyer HE. Alloantigen-induced unresponsiveness in cord blood T lymphocytes is associated with defective activation of Ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4538-43.
- 29- Takahashi N, Imanishi K, Nishida H, Uchiyama T. Evidence for immunologic immaturity of cord blood T cells: cord blood T cells are susceptible to tolerance induction to *in vitro* stimulation with a superantigen. *J Immunol* 1995; 155: 5213-19.

- 30- Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzin MA, Bonfichi M, Di Mario M, Piazzì G, *et al.* Immunophenotypic changes of fetal cord blood hematopoietic progenitor cells during gestation. *Pedia Res* 2000;47:825.
- 31- Haneline LS, Marshall KP, Clapp DW. The highest concentration of primitive hematopoietic progenitor cells in cord blood is found in extremely premature infants. *Pedia Res* 1996;39(5),820.
- 32- Berry SM, Fine N, Bichalsky JA, Cotton DB, Dombrowsk MP, Kaplan J, *et al.* Circulating lymphocyte subsets in second and third trimester fetus: comparison with newborns and adults. *AM J Obstet Gynecol* 1992;167:897-900
- 33- Kamps WA, Cooper MD. Development of lymphocyte subpopulations identified by monoclonal antibodies in human fetuses. *J Clin Immunol* 1984;4:36-39.

Archive of SID

## Do preterm cord blood CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup> cells demonstrate distinct functional properties compared with their term cord blood counterparts?

Kheirandish M.<sup>1</sup>(PhD), Ebtekar M.<sup>2</sup>(PhD), Pourfathollah A.A.<sup>2</sup>(PhD),  
Mohammad Hassan Z.<sup>3</sup>(PhD), Siadat S.D.<sup>2</sup>(PhD), Kazem Nejad A.<sup>3</sup>(PhD)

<sup>1</sup>Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center

<sup>2</sup>Tarbiat Modarres University

<sup>3</sup>Pasteur Institute of Iran

### Abstract

#### Background and Objectives

The incidence and severity of Graft Versus Host Disease following the use of umbilical cord blood as a source of stem cells for bone marrow reconstitution challenge the scientific findings of the immunocompetence of newborn immune cells. The reports show that self renewal characteristics and the proliferative capacity of primitive hematopoietic progenitors in the preterm cord blood are higher in comparison with term cord blood and bone marrow. In this study, the characteristics of preterm cord blood immune cells were analyzed from a naive point of view especially in comparison with its counterparts in term cord blood.

#### Materials and Methods

Term and preterm MNCs were isolated and cultivated in complete media containing PMA (50 ng/ml) and Ionomycin (1µg/ml) at the presence of monensin; they were then permeabilized with %0.1 saponin. After cell stimulation with PMA and Ionomycin, staining was performed with Moab anti-CD69 antibody to estimate the level of activation and was also conjugated with anti- IL-10, IFN-γ, IL-4, IL-2 antibody to evaluate the production of cytokine. Mean percentage frequency of cytokine producing cells and the level of cytokine expression in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup> cells were analyzed by Epics-XL and IMMUNO-4 software. Statistical analysis was carried out using Kolmogrov-Smirnov and Student's t-test.

#### Results

Out of 7700 samples of platelet concentrates studied, 14 (0.18%) were found positive for bacterial contamination. The contamination rate was estimated to be one in every 550 tested platelets (0.18%). Cellular phenotypic analysis showed no significant differences in CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells in term and preterm cord blood (p< 0.05). Mean percentage of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, HLA-DR+CD3<sup>+</sup>, DR -HLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD25<sup>+</sup> cells had significant increment in term cord blood. No statistically significant differences in the level of expression and the frequency of cytokine producing cells were observed in distinct gestational ages.

#### Conclusions

Considering the lack of any significant functional differences between term and preterm cord blood immune cells, hematopoietic stem cells of preterm cord blood not only have the same immunological behavior, especially with respect to GVHD, but also have the higher frequency and proliferative capacity. The presence of immature progenitor cells may have priority to term cord blood and be applied in transplantation settings.

**Key words:** Cord blood, CD4 positive T lymphocyte, CD8 positive T lymphocyte, Cytokine  
*SJIBTO* 2007; 4(3): 189-197

Received: 22 May 2007

Accepted: 7 Oct 2007

Correspondence: Kheirandish M., PhD of Immunology. IBTO – Research Center.  
P.O.Box:14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599; Fax : (+9821)88601599  
E-mail: kheira\_m2001@yahoo.co.uk