www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 60, No. 2 P: 450-460
May-Jun 2017

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۰، شماره ۲
خرداد-تیر ۹۶، صفحه ۴۶۰-۴۵۰

مقاله اصلی

بررسی اثر پیوند اتولوگ سلول‌های بنیادی مغز استخوان بر پانل رِاکتیو آنتی بادی در بیماران با نارسایی مزمن و پیشرفته کلیه کارآزمایی بالینی آزمایشی

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۱۰- تاریخ پذیرش:۹۶/۰٤/۱۰

رویا صادق نیا[۱]
مسیح نقیبی[۱]
فرزانه شریفی پور[۱*]
حسن راوری[۲]
داریوش حمیدی علمداری[۳]
حبیب الله اسماعیلی[۴]
فرشته ممدوحی[۱]
حمید رضا رحیمی[۵،۶]

۱-گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۲-گروه جراحی عروق، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۳- مرکز تحقیقات جراحی سرطان، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۴- گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۵- مرکز تحقیقات التهاب نوروژنیک، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۶- گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پزشکی، دانشگاه دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

* گروه داخلی، بخش نفرولوژی، بیمارستان امام رضا(ع)، مشهد، ایران.
تلفن: ۹۸۵۱۳۸۴۵۳۰۳۱+
Email: sharifipourf@mums.ac.ir

خلاصه

مقدمه

در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به نقش تعدیل کننده سیستم ایمنی سلول‌های بنیادی شده است. هدف این مطالعه بررسی اثر پیوند اتولوگ سلول‌های بنیادی مغز استخوان بر پانل راکتیو آنتی بادی در بیماران با نارسایی مزمن و پیشرفته کلیه است.

روش کار

مطالعه حاضر به‌صورت پایلوت بر ۱۷ بیمار که در دو گروه مداخله ۹ نفره و گروه شاهد ۸ نفره تقسیم‌بندی شدند صورت پذیرفت. پانل راکتیو آنتی بادی قبل از مطالعه و پس از تزریق سلول‌های بنیادی مغز استخوان که حاوی درصد قابل قبولی سلول‌های بنیادی مزانژیال بودند، در گروه مداخله در مقایسه با گروه شاهد بررسی شده است. در اتاق عمل و تحت آنستزی اپی دورال و شرایط استریل ۲۰۰ سی‌سی تا ۴۰۰ سی سی مغز استخوان آسپیره شده و طی مراحلی سلول‌های هسته دار از گلبولهای قرمز جدا میشود و مجددا به افراد از راه ورید محیطی پیوند زده شد.

نتایج

میانگین سنی ۴۱/۸±۱۲/۳۷ در گروه مداخله و گروه شاهد به ترتیب ۴۰/۳۷ ± ۱۲/۶۵ بود، تفاوت معنی-داری بین آن‌ها مشاهده نشد(p=۰/۸۰۷). متوسط پانل واکنش آنتی بادی به ترتیب ۶/۲۴ ± ۶۹/۸۶ و۱۳/۴۶ ± ۷۰/۲۵ و به ترتیب در گروه مداخله و شاهد اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت(p=۰/۹۵۶). بعد از مداخله، با توجه به آزمون Tزوجی اختلاف معنی‌داری بین قبل و بعد از مداخله(۲۶/۴۴ ± ۵۱/۵۵) در پانل واکنش آنتی بادی وجود داشت(p=۰/۰۴۳).

نتیجه‌گیری

تزریق سلول‌های بنیادی هسته دار اتولوگ مغز استخوان که حاوی درصد بالایی سلول بنیادی مزانژیمال می باشد، ممکن است یک درمان موثر برای بیماران مبتلا به پانل بالا آنتی بادی های واکنشی باشد.

کلیدواژه ها

سلول‌های بنیادی مزانژیال، پانل واکنش آنتی بادی، تعدیل پاسخ‌های ایمنی

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

مقدمه

بیماران با نارسایی پیشرفته کلیه که تحت دیالیز (همودیالیز یا دیالیز صفاقی) قرار می‌گیرند، علیرغم بهبود توسط روش‌های تکنیکی و درمان آنمی با اریتروپویتین و کنترل وضعیت الکترولیتی بدن، همچنان در معرض بیماری‌های کاردیوواسکولر، نوروپاتی اتونوم و محیطی، بیماری‌های استخوان، اختلال در فعالیت‌های جنسی، و ناتوانی در انجام فعالیت‌های روزانه خود هستند و برای بیشتر بیماران با نارسایی کلیه، پیوند کلیه بهترین و بزرگ‌ترین اقدام درمانی برای برگشت به زندگی عادی تلقی می‌شود(۱).

اما باید این نکته را مد نظر داشت که استفاده از بافت یا ارگان پیوندی از یک شخص به فرد دیگری که از نظر ژنتیکی با هم متفاوت هستند، منجر به رد حاد پیوند خواهد شد، مگر آنکه داروهای تضعیف کننده ایمنی داده شوند. پاسخ سیستم ایمنی به بافت پیوندی را می‌توان به ۳ مرحله تقسیم‌بندی کرد:

شناخت آنتی ژن‌های خارجی، فعال شدن لنفوسیت‌های مخصوص آنتی ژن، و در نهایت مرحله رد حاد پیوند.

آنتی ژن‌های لکوسیت انسانی که روی سطح عضو پیوندی قرار دارند؛ یکی از شدیدترین پاسخ‌های ایمنی را ایجاد می‌کنند این آنتی ژن‌ها توسط خانواده ژنی به نام Major histocompatibility complex ساخته می‌شوند(۱).

در رد حاد پیوند هم ایمنی سلولار (به واسطه سلول‌های لنفوسیتیT) و هم ایمنی هومرال (به واسطه لنفوسیت‌های B)و یا در بیشتر موارد ترکیبی از این دو با هم شرکت دارند.

اهمیت سلو ل‌های B و تولید آنتی بادی به واسطه آن‌ها می‌تواند منجر به نوعی از ردحاد پیوند به نام فوق حاد[1]شود این فرآیند در طی ۲۴ ساعت اول پیوند رخ می‌دهد و در آن دسته از بیماران کاندید پیوند ایجاد می‌شود که قبلا حساس شده‌اند و عمدتا به واسطه آنتی بادی بر علیه آنتی ژن‌های گروه خونی ABO و یا آنتی بادی بر علیه آلوآنتی ژن‌های مولکول MHC از طریق پیوند قبلی عضو، ترانسفوزیون خون و یا حاملگی ایجاد می‌شود. در حال حاضر رد پیوند فوق حاد[2] به علت تطابق گروه‌های خونی فرد گیرنده و دهنده عضو و تست کراس مچ[3] جهت تعیین این آنتی بادی‌های از قبل تشکیل شده در فرد گیرنده عضو پیوندی نادر است.

با این حال بعضی از اپیزودهای رد حاد پیوند به واسطه آنتی بادی به علت پایین بودن سطح آنتی بادی‌ها که می‌تواند در طی تست کراس مچ شناسایی نشوند و یا به واسطه فعال شدن مجدد سلول-های لنفوسیتی B خاطره‌ای[4] در افراد با نارسایی پیشرفته و مزمن کلیه،که کاندید پیوند کلیه می‌باشند، بعد از ۲۴ ساعت اول پیوند نیز می‌تواند رخ دهد. آنتی بادی بر علیه آنتی ژن‌های MHC عضو پیوندی (کلاس IوII) ممکن است قبل از پیوند در نتیجه حاملگی قبلی، تراسفوزیون محصولات خونی و یا پیوند قبلی ایجاد شده باشد و منجر به رد پیوند فوق حاد به‌دنبال پیوند شود(۱).

بنابراین حضور این آنتی بادی‌های از قبل تشکیل شده در سرم فرد گیرنده، باعث محدود شدن دهنده‌های سازگار برای بیمار حساس می‌شود. بیماران با میزان بالای این آنتی بادی‌ها، اغلب باید به مدت طولانی، برای یافتن یک کلیه پیوندی سازگار منتظر بمانند.

در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به نقش تعدیل کننده سیستم ایمنی[5] سلول‌های بنیادی بافت‌های مختلف مانند مغز استخوان شده است(۳-۲). سلول‌های بنیادی مزانژیال سلول‌های چند ظرفیتی هستند که می‌توانند به انواع مختلفی از سلول‌ها مانند استخوان، بافت چربی، استروما تبدیل شوند و نیز باعث تعدیل پاسخ‌های ایمنی می‌شوند(۳-۲). سلول‌های بنیادی مزانژیمال می-توانند بلوغ فعال‌سازی و پرولیفراسیون لنفوسیت‌های T و B و , سلول های کشنده طبیعی[6]، سلول های دندرتیک[7]را در شرایط آزمایشگاهی[8] سرکوب کنند و پاسخ ایمنی را در محیط داخلی بدن[9] نیز کاهش دهند. سلول‌های بنیادی مزانژیمال دارای یک

[1] hyperacute rejection
[2] hyper acute rejection

[3] cross match
[4] memory B cell
[5] Immunomodulatory
[6] (natural killer) NK cell

[7] Dendritic cell
[8] invitro
[9] invivo

اثر مهاری بر تولید آنتی بادی توسط B-cell (لنفوسیت‌ها B) در طی فرآیند تحریک آلو آنتی ژنی می‌باشند(۴).

هدف این مطالعه بررسی اثر پیوند اتولوگ سلول‌های بنیادی مغز استخوان که حاوی درصد بالایی سلول مزانژیمال می باشد بر پانل راکتیو آنتی بادی در بیماران با نارسایی مزمن و پیشرفته کلیه است.

روش کار

جمعیت مورد مطالعه و انتخاب نمونه ها

۲۰ بیمار با نارسایی مزمن و پیشرفته کلیه (با GFR کمتر از ۱۵ میلی بیتر در دقیقه که نیازمند دیالیز و یا روش ه ای جایگزین کردن کلیه باشند) مراجعه کننده به مراکز دیالیز وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مشهد طی سال های ۹۳-۹۱ که دارای پانل بالا بودند(بالای ۵۰٪) به طور تصادفی به ۲ گروه A و B تقسیم شدند. هر دو گروه از تمام جهات مشابه بودند. گروه A پیوند اتولوگ مغز استخوان را دریافت کردند و گروه B هیچ درمانی دریافت نکردند. با توجه به این که در این زمینه تا کنون پژوهشی صورت نگرفته است،۲۰ بیمار در دو گروه A و B در هر گروه ۱۰ نفر، و مطالعه به صورت آزمایشی در مقطع زمانی ۶ ماهه از زمان تصویب در نظر گرفته شد.

در این مطالعه در اتاق عمل و تحت آنستزی اپی دورال و شرایط استریل با سوزن مخصوص آسپیراسیون مغز استخوان از طریق ۲ یا حداکثر ۴ سوراخ در پوست روی کرست ایلیاک خلفی وارد شده و به روش مرحله‌ای که بعد از ورود به مغز استخوان در هر مرحله سوزن ۲ میلی متر بیشتر وارد شده و مغز استخوان مجددا اسپیره شد تا تمام مغز استخوان را طی نمایند. نهایتا ۲۰۰ سی‌سی تا ۴۰۰ سی سی مغز استخوان آسپیره شده در داخل کیسه‌های خون سه تایی حاوی CPD-A ۶۳ ml ریخته می‌شد و خون جهت جداسازی سلول‌های مورد نظر در دمای ۴ درجه به آزمایشگاه تخصصی سلول‌های بنیادی[1] واقع در دانشکده پزشکی که دارای اتاق استریل[2] است فرستاده شد. شایان ذکر است که این آزمایشگاه از نظر آلودگی میکروبی و تعداد ذرات آلاینده[3] دقیقا چک شده است و شرایط، کاملا استریل است. در آزمایشگاه، سلول‌ها بر اساس متد هیدروکسی اتیل استارچ که یک روش کارآزمایی آزمایشگاهی می‌باشد جدا شده و کل پروسه حدودا ۴ ساعت به طول انجامید(۵).۲۰ سی‌سی هیدروکسی اتیل استارچ به آن اضافه شد و در دور ۱۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه جهت ته نشین شدن گلبول‌های قرمز خون سانتریفوژ شد. سپس پلاسمای روی گلبول‌های قرمز خون که حاوی کل سلول‌های مغز استخوان می‌باشد سانتریفوژ شده و پلاسمای روی آن به کیسه سوم منتقل می‌شد و در کیسه دوم سلول‌ها مجددا به حالت معلق[4] در ۲۰ سی‌سی سوسپانسیون بدست آمد و آماده تزریق شد و در درمای ۴ درجه به بیمارستان امام رضا منتقل شد.

حجم خون مغز استخوان به‌دست آمده۷۸/۵ mL ± ۲۰۷/۷۸ (۳۲۵ ml range-۱۱۹) بوده که تعدادکل سلول‌های جدا شده (۱۰۸×۱۷/۷۶)بود. در مطالعه حاضر سعی شد بالاترین میزان احیای کل سلول‌های هسته دار مغز استخوان[5] را بر اساس تجربه مطالعه قبلی داشته و با روش فلوسایتومتری میزان دقیق سلول-های بنیادی هماتوپوئیتیک و سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشخص شد. جهت شمارش دقیق سلولهای بنیادی هماتوپوئیتیک از مارکرهای CD45, CD34 وجهت شمارش دقیق سلولها ی بنیادی مزانشیمال از مارکرهای سطحی CD90 و CD29 استفاده شد.

محتویات کیسه دوم (۲۰ سی سی سوسپانسیون) به ۲۵۰ سی‌سی نرمال سالین تزریقی اضافه می‌گردید و به صورت وریدی با استفاده از فیلتر خون تزریق می‌گردید.

سطح پانل در ۲ گروه به طور سریال در فواصل زمانی معین هر یک ماه برای یک دوره کلی شش ماه اندازه گیری شد و مورد مقایسه قرار گرفت. معیارهای خروج از مطالعه شامل: بیماری کبدی پیشرفته، عفونت HIV، عفونت HCV، عفونت HBV، سابقه هر نوع بدخیمی، سابقه بیماری قلبی یا ریوی پیشرفته، هر نوع اعتیاد مواد مخدر یا دارویی، عدم همکاری و عدم تمایل به

[1] Stem cell
[2] clean room
[3] particles
[4] Resuspend
[5] total nucleated cells

شرکت در طرح، مواردی که امکان آسپیراسیون مغز استخوان نباشد، آنمی (Hb< 10gr/dl) بود.

روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آمار

بعد از جمع‌آوری اطلاعات پرسشنامه و وارد کردن به کامپیوتر تجزیه و تحلیل داده‌ها به وسیله نرم افزار SPSS (نسخه۱۶) صورت گرفت. توصیف داده‌ها با استفاده از جدول فراوانی و نمودار شاخص‌های میانگین و انحراف معیار بود. و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون‌هایt-student و روش‌های چند متغیره[1] می‌باشد. در صورت نرمال نبودن متغیر وابسته از روش‌های ناپارامتری استفاده می‌شد. سطح معنادار ۰/۰۵ در نظر گرفته شد(P=۰/۰۵).

نتایج

در مطالعه حاضر ۹ نفر درگروه مداخله و ۸ نفر در گروه شاهد قرار داشتند بین دو گروه از نظر تعداد اختلاف آماری وجود نداشت(p=۰/۶۲۵) میانگین سنی در گروه مداخله(۱۲/۳۷ ± ۴۱/۸) سال و در گروه شاهد(۴۰/۳۷ ± ۱۲/۶۵) بوده است که بین دو گروه از این نظر اختلاف آماری واضح وجود ندارد(p=۰/۸۰۷) بر اساس نتایج بدست آمده از ۱۷ نفر مورد مطالعه۴۴٪ گروه مداخله و ۲۵٪ گروه شاهد سابقه پیوند کلیه داشته‌اند از این نظر اختلاف آماری وجود ندارد(p=۰/۵۴۱).

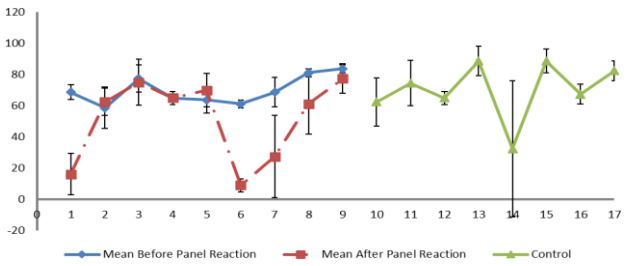
مقادیر پانل راکتیو در گروه مداخله (۶/۲۴ ± ۶۹/۸۶٪) و در گروه شاهد (۱۳/۶۴ ±۷۰/۲۵) بین دو گروه قبل از مداخله اختلاف آماری وجود نداشت(p=۰/۹۶۵) درحالی که بعد از مداخله در گروه مورد آزمایش (۲۶/۴۴ ±۵۱/۵۵٪) و در گروه شاهد (۱۳/۴۶ ± ۷۰/۲۵) بر بین دو گروه قبل از مداخله اختلاف آماری وجود نداشت(p=۰/۱۱۴) (جدول ۱).

بر اساس آزمون T جفتی بین مقادیر میانگین پانل راکتیو آنتی بادی قبل و بعد از مداخله در هر نفر در گروه مداخله اختلاف آماری واضح در مقادیر پانل راکتیو آنتی بادی دیده می‌شود(p=۰/۰۴۳) (نمودار ۱).

بر اساس فلوسیتومتری به عمل آمده از سه نمونه از نمونه‌ها به صورت تصادفی انتخاب و آسپیراسیون مغز استخوان در گروه مداخله به طور متوسط (۴۹/۲۸ ± ۶۲/۱٪) سلول‌های $CD45^+$ و برای مارکر $CD34^+$ ۳,۱±۴,۴ بوده‌اند(مارکرهای هماتوپوئتیک بودن) به عبارت دیگر حدود ۷۰٪ سلول‌های بنیادی هماتوپوتیک است و حدود (۴۵/۵۲ ±۳۳/۴۳٪)سلول-های تزریق شده $CD29^+$ که نشانه مزانشیمال بودن سلول‌ها هستند.

جدول ۱. مشخصات افراد مورد مطالعه در دو گروه مداخله و شاهد

متغیر	گروه مداخله	گروه شاهد	P value
جنس	۹(۸۸/۹٪)مونث	۸(۷۵/۰٪) مونث	۰/۶۲۵
سن	۱۲/۳۷± ۴۱/۸	۱۲/۶۵± ۴۰/۳۷	۰/۸۰۷
طول مدت دیالیز	۳/۰۸± ۶/۴۴	۲/۹۷± ۴/۵	۰/۲۰۷



نمودار ۱. میانگین و انحراف معیارpanel Reactive در ۱۷ بیمار مورد مطالعه در گروه قبل و بعد مداخله

بحث

در بیماران، پانل راکتیو آنتی بادی ها[2] معمولاً بعد از تماس با HLA[1] های مختلف از سایر افراد ایجاد می‌شود. تقریباً در ۱۵ ٪ از مردان این آنتی بادی‌ها از طریق ترانسفوزیون محصولات

[1] repeated measurement

[2] Panel reactive antibodies

خونی و در ۴۰ ٪ زنان از طریق ترانسفوزیون و یا حاملگی قبلی ایجاد می‌شود.

چندین پروتکل جهت کاهش سطح این آنتی بادی‌ها استفاده می‌شود که تا به امروز نشان داده نشده که روشی موثرتر از تزریق دوزهای بالای ایمونوگلوبولین در کاهش سطح این آنتی بادی‌ها باشد.

با این حال ایمونوگلوبولین گران است و در دوزهای بالا با روش‌های بررسی پانل تداخل می‌کند و اندازه‌گیری سطح این آنتی بادی‌ها بعد از استفاده از ایمونوگلوبولین مشکل می‌شود.

سایر تکنیک‌ها، شامل استفاده از آلمتوزوماب[۲] ، ریتوکسیماب [۳]یک کاهش دهنده B-Cell] ، ستون بازجذبی پروتئین A[۴] ، پلاسمافرز و استفاده از مایکوفنولات موفتیل می‌باشد.

در یک بررسی که توسط کاواز[۵] و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شددر بیماران با پانل بالای ۹۰٪ بعد از حساسیت زدایی توسط مایکو فنولات موفیتیل وپلاسمافرز، در ۸۴ ٪ موارد سطح پانل کمتر از ۲۰٪ رسید و در ۱۳ مورد بیماران تحت پیوند کلیه موفق قرار گرفتند(۶).

آنچه مسلم است این است که قبل از پیوند، هدف اصلی استفاده از پروتکل‌های حساسیت‌زدایی کاهش آنتی بادی‌ها به منظور پیشگیری از رد فوق حاد پیوند [۶] و بعد از پیوند هدف اصلی این است که به منظور جلوگیری از رد حاد پیوند [۷] سطح پانل پایین باقی بماند.

در مطالعه کاواز و همکاران، کاهش پانل به تنهایی با پلاسمافرز گذرا بود و موثر نبود بنابراین پلاسمافرز قبل از پیوند همراه با استفاده از مایکوفنولات موفتیل بعد از آن منجر به کاهش سطح پانل به کمتر از ۲۰ ٪ شد.

در مطالعه دیگری که توسط یانگ[۸] و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد (۷) استفاده از آنتی تیموسیت گلوبولین [۹] و بازیلکسیماب[۱۰] به عنوان ایندکشن تراپی در بیماران با پانل بالا، دارای اثرات مشابه در بقای [۱۱] یکساله گرافت و بیمار بوده با این حال استفاده از آنتی تیموسیت گلوبولین با موارد کمتری از رد حاد پیوند در مقایسه با بازیلکسیماب همراه بود.

در سال ۲۰۱۵ یک مطالعه توسط شانگ[۱۲] و همکاران انجام شد که در این مطالعه استفاده از یک پروتکل جدید مورد بررسی قرار گرفت. که شامل استفاده از مایکوفنولات موفتیل همراه با آنتی تیموسیت گلوبولین با یا بدون پلاسمافرز بود این روش منجر به یک کاهش قابل ملاحظه در سطح پانل راکتیو آنتی بادی ها در بیماران شد.

در این روش بیمارانی که پانل های بالای پانل های بالای ۳۰٪ داشتند تحت پلاسمافرز همراه با استفاده از مایکوفنولات موفتیل قرار گرفتند. در همه بیماران ایندکشن تراپی با آنتی تیموسیت گلوبولین انجام شد.

در ۸۴/۴ ٪ سطح پانل به کمتر از ۲۰ ٪ رسید. و هیچ عارضه کوتاه مدت درمانی در این مطالعه گزارش شد در مقایسه با نتایج تحقیقات با دوزهای بالای ایمونوگولوبولین وریدی[۱۳] که میزان حساسیت زدایی را ۳۸ ٪ ذکر کرده بودند (۸) و یا در سایر تحقیقات انجام شده با پلاسمافرز، دوز پایین ایمونوگولوبولین وریدی و استفاده از آنتی بادی ضد لنفوسیت های CD20[۱۴] که میزان حساسیت زدایی ۸۴ ٪ گزارش شده بود (۸) نتایج حاصل از این تحقیقات به مراتب بهتر بود.

در روش حساسیت زدایی که ما در این پژوهش مورد بررسی قرار دادیم که در نوع خود، روشی جدید محسوب می شود بیماران با پانل های بالای ۵۰ ٪ تحت انفوزیون سلول های بنیادی اتولوگ مغز استخوان که حاوی درصد بالایی سلول مزانژیمال می باشد، قرار میگیرند و در گروه کنترل بدون استفاده از هیچ داروی سرکوبگر ایمنی و در فواصل یکماهه به مدت شش ماه تحت بررسی قرار گرفتند. بررسی ها نشان داد که در ۳۳/۳ ٪ در گروه مورد آزمایش میزان پانل ها به کمتر از ۲۰ ٪

[1] - Human Leukocyte antigen
[2] alemtuzumab
[3] - Rituximab
[4] Protein A absorption
[5] Kawase
[6] - hyper acute rejection
[7] - acute rejection
[8] yang
[9] - Anti – Thymocyte Globulin
[10] basiLiXimab
[11] - Survival
[12] Shang
[13] IVIG
[14] anti-CD20

رسید و پایدار باقی ماند و در گروه کنترل تغییری در میزان پانل ها ایجاد نشد این روش به خوبی توسط بیماران تحمل شد و هیچگونه عفونتی در آن‌ها گزارش نشد ضمن اینکه هزینه بالایی نیز برای بیماران به همراه نداشت.

در پایان این نکته را می بایست متذکر شویم که شاید استفاده از چندین نوبت انفوزیون سلول های بنیادی به جای یک نوبت در فواصل زمانی یکسان (به طور مثال هر ۲ هفته) و هم چنین استفاده از روش کشت سلول های بنیادی که به ما این اجازه را می دهد که حجم و تعداد بیشتری از این سلول ها را به بیمار تزریق کنیم، باعث بهبود نتایج فوق شود.

شناخت آنتی ژنهای خارجی، فعال شدن لنفوسیت های مخصوص آنتی ژن، و در نهایت مرحله رد حاد پیوند آنتی ژنهای لکوسیت انسانی[1] که روی سطح عضو پیوندی قرار دارند؛ یکی از شدیدترین پاسخ های ایمنی را ایجاد می کنند این آنتی ژنها توسط یک خانواده ژنی به نام Major histocompatibility complex ساخته می شوند(۱).

در رد حاد پیوند هم ایمنی سلولار (به واسطه سلولهای لنفوسیتی T) و هم ایمنی هومرال (به واسطه لنفوسیت های B)و یا در بیشتر موارد ترکیبی از این دو با هم شرکت دارند.

اهمیت سلو لهای B و تولید آنتی بادی به واسطه آن‌ها می تواند منجر به نوعی از ردحاد پیوند به نام رد پیوند فوق حاد شود این فرآیند در طی ۲۴ ساعت اول پیوند رخ می دهد و در آن دسته از بیماران کاندید پیوند ایجاد می شود

در سالهای اخیر توجه ویژه ای به نقش (تعدیل کننده سیستم ایمنی[2] سلولهای بنیادی بافت های مختلف مانند مغز استخوان شده است(۲, ۳). سلولهای بنیادی مزانژیال سلولهای چند ظرفیتی هستند که می توانند به انواع مختلفی از سلولها مانند استخوان، بافت چربی، استروما تبدیل شوند و نیز باعث تعدیل پاسخ های ایمنی می شوند(۳-۲).

سلول‌های بنیادی مزانژیمال می‌توانند بلوغ فعال سازی و پرولیفراسیون لنفوسیت های T و B و Dendritic cell, (natural killer)سلول های کشنده طبیعی را در invitro سرکوب کنند و پاسخ ایمنی را در محیط داخلی بدن[3] کاهش دهند. سلولهای بنیادی مزانژیمال دارای یک اثر مهاری بر تولید آنتی بادی توسط B-cell (لنفوسیت ها B) در طی فرآیند تحریک آلو آنتی ژنی می باشند(۴).

سلولهای بنیادی مزانشیمال به طور غیر مستقیم و از طریق جلوگیری از بلوغ سلولهای دندرتیک (DC) فعال سازی سلولهای T بالغ را مهار می کنند؛ چرا که سلولهای دندرتیک یک نقش مهم و عملکردی در ارائه آنتی ژن به سلولهای T و فعال کردن آن‌ها جهت تولید سیتوکین های التهابی دارند(۹-۱۰).

تداخل بین سلولهای بنیادی مزانشیمال و سلولهای NK[4] در اثرات ایمونومدولاتوری سلولهای مزانشیمال شرکت دارد. سلولهای مزانشیمال از طریق ترشح فاکتورهای محلول، فاکتور رشد فیبروبلاستی[5] و پروستاگلندین E_2[6] باعث مهار پرولیفراسیون سلول‌های NK و همچنین سلول‌های سیتوتوکسیک می-شود(۱۲-۱۱).

همچنین وجود مولکول مهاری (PD-1)[7] بر روی سلولهای بنیادی مزانشیمال و باند شدن آن به لیگاندهای PDL_1 و PD-L_2 بر روی سلول‌های هدف NK و سلول‌های T سیتوتوکسیک می‌تواند توجیه کننده مهار پرولیفراسیون این سلولها بدنبال تماس سلول به سلول[8] با سلولهای مزانشیمال باشد(۱۳). این نتایج پیشنهاد می کند که سلولهای بنیادی مزانشیمال می توانند برای سرکوب بیماریهای وابسته به سیستم ایمنی و رد پیوند به کار روند(۱۴).

در مطالعه حاضر که یک مطالعه آزمایشی بر روی ۱۷ فرد با پانل رِاَکتیو آنتی بادی بالای ۵۰٪ بود است از سلول‌های مغز استخوان به عنوان منبع سلول‌های بنیادی استفاده شده است. در این مطالعه ۹ بیمار شامل ۸ زن و ۱ مرد ابتدا میزان پانل رِاَکتیو آن‌ها بررسی شده است و بعد نمونه آسپیراسیون مغز استخوان آن‌ها گرفته

[1] HLA
[2] Immunomodulatory
[3] invivo
[4] Natural Killer
[5] TGF-β
[6] PGE_2
[7] Programmed Death One
[8] Cell to Cell

شده است پس از فراوری و تغلیظ سلولها مجدد به افراد تزریق شده است و میزان پانل رِاَکتیو در افراد بررسی شده است که در این مطالعه ثابت شد که در ۸ نفر یعنی ۴۴٪ افراد افت محسوس ایجاد شده است که منجر به امکان پیوند کلیه در آن‌ها شده است.زمانی که افراد پانل رِاَکتیو بالا دارند امکان پیوند کلیه وجود ندارد.

از میان بررسیهای انجام شده جهت استفاده از سلول بنیادی در موارد انسانی می توان به عنوان نمونه از یک مورد ترانسفوزیون سلول بنیادی در گیرندگان پیوند کلیه از جسد در سال ۲۰۰۲ در دانشگاه واشنگتن انجام شده نام برد که در این روش تحقیق، بعد ایندا‌کشن تراپی با سیکلوسپورین و آزاتیوپرین و پردنیزولون انفوزیون سلول های بنیادی در روز اول، سوم و نیز روز دهم انجام شده است. که نتیجه آن بهبود بقا و عملکرد عضو پیوندی در طی ۵ سال در گروه مورد آزمایش نسبت به گروه کنترل بدون هیچگونه عوارض ناشی از انفوزیون و یا افزایش میزان عفونت گزارش شد. در این تحقیق نمونه مغز استخوان دهنده تحت شرایط استریل از ۲ تا ۳ مهره کمری به دست آمده و سپس چند نوبت توسط ماده RP MI 1640 (شامل چندین نوع اسید آمینه، نمک های ارگانیک، ویتامین و قند) و آلبومین انسانی ۵٪ شستشو داده می شود و سپس برای جدا شدن چربی و دبری های موجود در نمونه سانتریفوژ شده و درنهایت در کیت های حاوی Fenwal 4 R2107 و یا معادل های آن جمع آوری شده و حدود 100-200cc از آن در طی حداقل یک ساعت به بیمار انفوزیون می شود. همانطور که در این روش بیان شده بدون کشت سلولی انفوزیون سلول های هسته دار مغز استخوان انجام پذیرفته است(۱۵).

اثرات تعدیل سیستم ایمنی سلول های بنیادی در بسیار از مطالعات اثبات شده است. سلولهای بنیادی هسته دار بدنبال تحریک شدن توسط اینترفرون گاما تولید ایندول آمین ۲ و۳ دی اکسیژناز [1] می کنند. ایندول آمین ۲ و۳ دی اکسیژناز باعث تبدیل تریتپوفان[2] به کینورنین[3] می شود(۱۶) و مشخص شده که این ماده یک مهار کننده مسیر فعال سازی T-cell می باشد(۱۷, ۱۸). تولید اکسید نیتریت[4] توسط سلولهای مزانشیمال یک مکانیسم بالقوه جهت جلوگیری از پرولیفراسیون T-cell می باشد(۱۹).

در سال ۲۰۰۷ لی بلنک اثرات ایمونومدولاتوری سلولهای مزانشیمال روی بقاء آلوگرافت های پوستی را مورد بررسی قرار داد. سلولهای بنیادی مزانشیمال پرولیفراسیون سلول های T را مهار کرده و از تولید سلولهای T سیتوتوکسیک جلوگیری می کنند. در این مطالعه از سلولهای بنیادی مزانشیمال به عنوان یک انتخاب درمانی برای موارد شدیدو مقاوم به درمان بیماری گرافت علیه میزبان [5] ، ترمیم بافت، درمان رد پیوند آلوگرافت و بیماری های اتوایمیون نامبرده شده است(۲۰).

در سال ۲۰۰۹ گو پیشنهاد کرد که سلولهای بنیادی مزانشیمال به علت خواص ایمونوساپرسیو ذاتی و ایمونوژنیستیه پایین می توانند پتانسیل درمانی در پیوند داشته باشند. او بررسی کرد که آیا سلولهای بنیادی مزانشیمال می توانند بقاء آلوگرافت را طولانی کنند؟ انفوزیون سلولهای بنیادی مزانشیمال به گیرنده ها ۲۴ ساعت پس از دریافت آلوگرافت قلب به طور قابل توجهی ریسک رد پیوند را کاهش داد و میانگین بقاء گرافت را در مقایسه با گروه کنترل دو برابر کرد. بعلاوه درمان ترکیبی سلولهای بنیادی مزانشیمال با دوز پایین را راپامایسین ، بقاء طولانی مدت گرافت قلب همراه با هسیتولوژی نرمال را به همراه داشت(۲۱).

بر اساس آنچه بدست آمده است حدود ۳۰٪ سلول های بدست آمده برخی از مارکر های سلولهای بنیادی مزانشیمال داشته اند البته باید کل پانل مارکرهای سطحی را برای سلول ها گذاشته شود اما با این وجود بر اساس پاسخ های بالینی گرفته شده ، اثرات ایمنومدولیتوری سلولهای بنیادی مزانشیمال در نمونه ای که سطح بالاتر از سلول‌های احتمالی بنیادی مزانشیمال را داشت بهتر بوده و امکان پیوند کلیه مسیر شده است. با توجه محدودیت زمانی ، در این مطالعه امکان پیگیری طولانی مدت وجود

[1] Indoleamine 2,3 dioxygenase
[2] Tryptophan
[3] kynurenine
[4] NO
[5] Graft versus host disease

نداشت لیکن در برنامه های آتی تمیم تحقیقاتی فعلی این موضوع لحاظ شده است.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر که یک مطالعه آزمایشی استفاده از سلول های بنیادی آسپیره شده از مغز استخوان افراد در لیست پیوند کلیه که پانل راکتیو آنتی بادی بالای ۵۰ ٪ داشته اند در ۴۴٪ افراد موفق بوده است و توانسته است مقدار درصد پانل راکتیو آنتی بادی را به حدی برساند که افراد آمده دریافت کلیه پیوندی شوند و احتمال رد پیوند حاد در آن‌ها به میزان افراد عادی شود.

اخلاق در پژوهش

مطالعه حاضر با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد و رعایت کلیه کدهای اخلاقی بیانیه اخلاق در پژوهش انجام شده است و رضایتنامه آگاهانه از کلیه بیماران اخذ شد، لازم به ذکر است که هیچ یک از بیماران از هیچ درمان توصیه شده درکتب مرجع محروم نشدند و درمان مذکور به درمان ایشان افزوده شده است.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت های مادی و معنوی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد در قالب پایان نامه دوره دکترای فوق تخصصی بیماری های کلیه بالغین مربوط به خانم دکتر رویا صادق نیا انجام شده است(کد طرح: ۹۰۰۵۷۱).

مراجع:

1. Danovitch GM. Handbook of kidney transplantation. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2012.
2. Kiss J, Urban VS, Dudics V, Vas V, Uher F. Mesenchymal stem cells and the immune system--immunosuppression without drugs? Orv Hetil 2008; 149:339-46.
3. Sotiropoulou PA, Papamichail M. Immune properties of mesenchymal stem cells. Methods Mol Biol 2007; 407:225-43.
4. Pino CJ, Humes HD. Stem cell technology for the treatment of acute and chronic renal failure. Transl Res 2010; 156:161-8.
5. Ravari H, Hamidi-Almadari D, Salimifar M, Bonakdaran S, Parizadeh M, Koliakos G. Treatment of non-healing wounds with autologous bone marrow cells, platelets, fibrin glue and collagen matrix. Cytotherapy 2011; 13:705-11.
6. Kawase T, Tojimbara T, Niki R, Akamatsu M, Nakajima I, Fuchinoue S, et al. Successful third kidney transplantation with intensive immunosuppression in a highly sensitized recipient. Transplant Proc 2008; 40:2428-30.
7. Yang S, Wang D, Wu W, Lin W, Xu T, Cai J, et al. Comparison of single bolus ATG and Basiliximab as induction therapy in presensitized renal allograft recipients receiving tacrolimus-based immunosuppressive regimen. Transpl Immunol 2008; 18:281-5.
8. Stegall M, Gloor J, Winters J, Moore S, Degoey S. A comparison of plasmapheresis versus high-dose IVIG desensitization in renal allograft recipients with high levels of donor specific alloantibody. Am J Transplant 2006; 6:346-51.
9. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. Blood 2005; 105:4120-6.
10. Li YP, Paczesny S, Lauret E, Poirault S, Bordigoni P, Mekhloufi F, et al. Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. J Immunol 2008; 180:1598-608.
11. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. Stem Cells 2006; 24:74-85.
12. Angoulvant D, Clerc A, Benchalal S, Galambrun C, Farre A, Bertrand Y, et al. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. Biorheology 2004; 41:469-76.
13. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. Eur J Immunol 2005; 35:1482-90.
14. Mehra MR, Uber PA, Uber WE, Scott RL, Park MH. Allosensitization in heart transplantation: implications and management strategies. Curr Opin Cardiol 2003; 18:153-8.

15. Light J, Salomon DR, Diethelm AG, Alexander JW, Hunsicker L, Thistlethwaite R, et al. Bone marrow transfusions in cadaver renal allografts: pilot trials with concurrent controls. Clin Transplant 2002; 16:317-24.
16. Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. J Exp Med 2002; 196:459-68.
17. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. Stem Cells 2010; 28:585-96.
18. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. J Exp Med 1999; 189:1363-72.
19. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. Blood 2007; 109:228-34.
20. Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. J Intern Med 2007; 262:509-25.
21. Ge W, Jiang J, Baroja ML, Arp J, Zassoko R, Liu W, et al. Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. Am J Transplant 2009; 9:1760-72.

Original Article

Effect of autologous Bone marrow stem cell on panel reactive Antibodies in patients with chronic and progressive renal failure, a pilot clinical trial

Received:30/04/2017 - Accepted: 01/07/2017

Roya Sadeghnia[1]
Farzaneh Sharifipour[1*]
Masih Naghibi[1]
Hassan Ravari[2]
Dariush Hamidi Alamdari[3]
Habibollah Esmaeili[4]
Fereshte Mamduhi[1]
Hamid Reza Rahimi[5,6]

1-Department of Internal Medicine, Imam Reza Hospital, Faculty of Medicine, Mashhad university of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
2-Department of Surgery, School of Medicine, Mashhad university of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
3- Surgical Oncology Research Center, Mashhad university of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
4-Department of Statistics and Epidemiology school of Helth, Mashhad university of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
5-Neurogenic Inflammation Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
6-Departement of Modern Sciences and Technologies, *Faculty of Medicine, Mashhad university of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*

*Address: Emam Reza Hospita, EmamReza Sq, Ebnesina St, Mashhad, Iran.

Tel: +985138453031
Email: sharifipourf@mums.ac.ir

Abstract

Background: In vitro and in vivo immunosuppressive properties have been described for Mesenchymal stem cells (MSCs), as they are able to modulate the function of all major immune cell populations. They represent important candidates for tissue regeneration and manipulation of the immune response in graft rejection, graft versus host disease, and autoimmune disorders. The aim of this study was to evaluate effect of autologous bone marrow stem cell on panel reactive Antibodies in patients with chronic and progressive renal failure.

Subjects&Method: This is a pilot study on 17 patients with CFR (9 in intervention group and 8 in control group). Panel reactive Anti bodies before and after injections of stem cells from bone marrow that containing acceptable percentage of Mesenchymal stem cell in the intervention group compared with the control group. The 200 cc to 400 cc bone marrow aspirated then nucleated cells separated from red blood cells , then these cells injected to peripheral vein.

Results: Mean age was 41.8±12.37 and 40.37±12.65 in intervention and control group respectively, with no significant differences were found between them (P=0.807). Mean panel antibody reaction was 69.86±6.24 and 70.25±13.46 in the intervention and control group respectively, no significant difference between them (P=0.956). After intervention, according to the pair T test there was a significant difference between before and after (51.55±26.44) panel antibody reaction (P=0.043).

Conclusion: Infusion of allograft mesenchymal stem cells, might be an effective therapy for patients with high panel reactive Antibodies.

Keywords: Mesenchymal stem cells, panel reactive Antibodies, immunosuppressive effect

Acknowledgement: *There is no conflict of interest.*