

گسترش سلول‌های پیش‌ساز خونساز بند ناف انسانی بر روی داربست ۳ بعدی پوشیده شده با نانوالیاف کلاژنی

سید هادی موسوی^۱، سعید آبرون^۲، مسعود سلیمانی^۳، سید جواد مولا^۴، غلامحسین تمدن^{۱،۵}

چکیده

سابقه و هدف

برای درمان برخی از بیماری‌های خونی و غیر خونی، از پیوند آلوژنیک سلول‌های بنیادی مغز استخوان استفاده می‌گردد، اما به علت عدم وجود اهداکنندگان مناسب برای بسیاری از بیماران، استفاده از این روش درمانی محدود شده است. خون بند ناف (UCB) یکی از منابع جایگزین جهت پیوند سلول‌های بنیادی خونساز (HSC) می‌باشد. علی‌رغم مزایای این منبع، کم بودن میزان سلول‌های خون بند ناف، عامل محدودکننده استفاده از آن در پیوند خون بند ناف است. گسترش سلول‌های بنیادی خونساز در محیط آزمایشگاه، یکی از راه‌کارهای غلبه بر این مشکل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از داربست پلی‌کاپرولاکتونی (PCL) پوشیده شده با نانو الیاف کلاژن در مقایسه با محیط معمول کشت، جهت کشت سلولی استفاده شد. شمارش تام سلولی و سلول‌های $CD34^+$ ، سنجش کلونی و بیان CXCR-4 نیز انجام گرفت.

یافته‌ها

یافته‌های این مطالعه نشان داد که میزان تام سلولی و سلول‌های $CD34^+$ در داربست ۳ بعدی پوشیده شده با نانوالیاف کلاژنی در مقایسه با سیستم معمول کشت سلولی (۲ بعدی) بیشتر می‌باشد ($p < 0/05$). هم‌چنین میزان تام کلنی در داربست ۳ بعدی بالاتر از کشت سلولی ۲ بعدی بوده و به لحاظ آماری معنادار است ($p < 0/05$). بیان بالاتر CXCR-4 در محیط ۳ بعدی در مقایسه با ۲ بعدی دیده شد که بیانگر قابلیت لانه‌گزینی بهتر سلول‌های کشت شده در محیط ۳ بعدی است ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری

داربست PCL پوشیده شده با نانوالیاف کلاژنی نسبت به محیط معمولی کشت سلولی، محیطی مناسب با حفظ خصوصیات سلول‌های بنیادی برای کشت سلول‌های بنیادی خون بند ناف می‌باشد.

کلمات کلیدی: پیوند سلول بنیادی خون بند ناف، سلول‌های بنیادی خونساز، مهندسی بافت

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۸

تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۰

- ۱- دانشجوی PhD خونسناسی و بانک خون - دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران
- ۲- مؤلف مسؤول: PhD خونسناسی - دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱
- ۳- PhD خونسناسی - دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران
- ۴- PhD ژنتیک - دانشیار دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران
- ۵- دانشجوی PhD خونسناسی و بانک خون - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز - شیراز - ایران

مقدمه

جهت درمان برخی از بیماری‌های خونی (بدخیم و غیر بدخیم) و هم چنین بیماری‌های نقص سیستم ایمنی، از پیوند آلوژنیک سلول‌های بنیادی خونساز (HSC) استفاده می‌گردد، اما به دلیل عدم وجود دهندگان مناسب برای بسیاری از بیماران، استفاده از این روش درمانی محدود شده است (۱). خون بند ناف، منبعی جایگزین برای سلول‌های بنیادی خونساز می‌باشد که می‌تواند برای پیوند سلول‌های بنیادی خونساز (HSCT)، مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از این منبع جایگزین، علی‌رغم تمام مزایا (احتمال GVHD کمتر، کم بودن و یا عدم وجود خطر برای اهداکنندگان، پایین‌تر بودن میزان آلودگی، محدودیت کمتر در تجانس HLA و دسترسی آسان آن)، به دلیل تأخیر در پیوند که به دنبال آن تأخیر در بازسازی سیستم ایمنی و سپس افزایش میزان مرگ و میر به وجود می‌آید، محدود شده است (۲-۵). جهت غلبه بر این محدودیت، چندین روش کارآمد مانند گسترش سلول‌ها بر روی داربست ۳ بعدی، هم کشتی با سلول‌های مزانشیمی و کشت در بیوراکتور، در حال مطالعه و گسترش است (۶-۸). جایگاه سلول‌های بنیادی خونساز در مغزاستخوان را اصطلاحاً نیچ می‌نامند و این جایگاه باعث تعادل بین خودنوسازی و تمایز سلول‌های بنیادی خونساز می‌شود (۹). به نظر می‌رسد، بازسازی چنین سیستمی در محیط آزمایشگاه، روش مناسبی جهت افزایش سلول‌های بنیادی خونساز با حفظ ویژگی‌های اولیه آنان، باشد (۱۰). سرنوشت HSCs تحت تاثیر فاکتورهای مختلفی از جمله هورمون‌ها، سایتوکاین‌ها، ماتریکس خارج سلولی (ECM) و برهمکنش سلولی با سایر سلول‌ها و بافت‌ها است (۱۱).

اجزاء ماتریکس خارج سلولی نقش بسیار مهمی در نیچ HSC دارند. چسبندگی یا برهمکنش بین HSCs و مولکول‌های چسبندگی و لانه‌گزینی یا نگهداری HSCs در نیچ مغز استخوان، توسط این عناصر فراهم می‌گردد (۱۲)، (۱۱).

اکثر سیستم‌های کشت سلول‌های بنیادی خونساز از مدل گسترش دو بعدی (2D) استفاده می‌نمایند که در مقایسه با محیط‌های سه بعدی (3D)، باعث تغییرات

بسیاری در خصوصیات سلول‌های بنیادی خونساز می‌شوند (۱۳). داربست ۳ بعدی باید دارای خصوصیتی از جمله تولید سلول‌های کافی، توانایی حفظ خودنوسازی و هم چنین تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز را داشته باشد. داربست ۳ بعدی باعث افزایش سطح منطقه رشد سلولی، حمایت ساختاری، بهبودی تماس سلول - سلول و بنابراین فراهم کردن تمام نیازهای مهم نیچ می‌شود (۱۴).

امروزه، داربست‌های مختلف ۳ بعدی، جهت گسترش آزمایشگاهی HSCs استفاده می‌شود، که شامل شبکه‌های نانوالیاف، ماتریکس‌های دارای منافذ میکرونی، الیاف هم تنیده شده و چندین مدل دیگر می‌باشند. این الیاف دارای جنس‌های مختلفی از جمله، پلی‌الاکتیک اسید (PLGA)، پلی‌لاکتیک کو-گلیکولیک اسید (PLGA)، پلی‌اتیلن ترفتالات (PET)، پلی‌دی‌متیل سیلوگسان (PDMS) و پلی‌کاپرولاکتون (PCL) می‌باشند (۱۵).

هدف از این مطالعه، استفاده از یک نانو فیبر خاص (پلی‌کاپرولاکتون، PCL) پوشیده شده با کلاژن (یکی از اجزاء ECM) جهت گسترش سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

جداسازی سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف انسانی:

خون بند ناف انسانی بعد از دریافت رضایت‌نامه آگاهانه، از اهداکنندگان (۳ نمونه) دریافت شد. جهت جداسازی سلول‌های $CD34^+$ ابتدا، سلول‌های تک هسته‌ای (MNC) با استفاده از فایکول (چگالی 1.077 گرم/میلی لیتر، سیگما) توسط سانتریفیوژ جدا و سپس با استفاده از ستون MACS (میلتنی‌بایوتک، آمریکا) سلول‌های $CD34^+$ جدا گردیدند. به طور خلاصه، بعد از سانتریفیوژ و شمارش سلولی، به ازاء هر 10^8 سلول حدود 300 میکرولیتر بافر، 100 میکرولیتر آنتی‌بادی بلوکه کننده و 100 میکرولیتر آنتی‌بادی $CD34$ اضافه و خوب مخلوط شده و به مدت 30 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه گردید. سلول‌ها با بافر شستشو و سپس در

اضافه شد. پلیت را به مدت ۱۰ روز در درمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO₂ ۵٪ انکوبه کردیم. هر ۴۸ ساعت یک بار، نیمی از محیط تعویض گردید. هر نمونه ۲ بار تکرار شد.

آنالیز فلوسیتومتری:

جهت ارزیابی توانایی گسترش و تمایز HSCs، آزمایش فلوسیتومتری انجام شد. بدین منظور، در روز ۱۰ سلول‌ها از روی داریست‌ها و کنترل برداشته و با آنتی‌بادی CD34-PE و CD45-FITC بر ضد اپی‌توپ انسانی مجاور گشتند. بعد از اضافه نمودن آنتی‌بادی، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. جهت تنظیمات جبرانی و تأیید اختصاصیت از کنترل ایزوتیپ استفاده شد. با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر Partec-PAS، ۱۰۰۰۰ سلول شمارش شدند. از نرم‌افزار FlowJo جهت آنالیز استفاده گردید.

آزمون سنجش کلونی:

جهت بررسی قدرت کلنی‌زایی، قبل و بعد از ۱۰ روز کشت، ۱۰۰۰۰ سلول برداشت شد و به ۲ میلی‌لیتر از محیط نیمه جامد متیل سلولز (Methocult H4435)، استم سل تکنولوژی، آمریکا) اضافه گردید و سپس در پلیت ۳۵ mm² قرار داده شد. بعد از ۱۴ روز انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵٪ با استفاده از میکروسکوپ معکوس، کلنی‌های CFU-GM، BFU-E/CFU-E و CFU-GEMM شمارش شدند. نمونه‌ها به صورت تکرار دوتایی انجام شدند.

بیان ژن:

جهت بررسی لانه‌گزینی سلول‌های قبل و بعد از کشت، بیان CXCR-4 با استفاده از qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، RNA با استفاده از تری‌ازول (سیگما، آلمان) استخراج شد. به طور خلاصه، به ازاء هر ۱۰^۶ سلول، ۱ میلی‌لیتر تری‌ازول به سلول‌ها اضافه، به خوبی مخلوط و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۲۰۰۰ دور در

دور ۳۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیده، مایع رویی به طور کامل خارج و باقی‌مانده با ۵۰۰ میکرولیتر بافر مخلوط شدند. ستون MS را در میدان مغناطیسی خاص خود قرار داده، با بافر شستشو شد و سپس سلول‌های مورد نظر از ستون عبور داده شدند. جهت اطمینان از خروج کامل سلول‌ها، مجدداً ستون با بافر شستشو شد، بعد از این، ستون جدا و در یک لوله ۱۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. ۵ میلی‌لیتر بافر به ستون اضافه شد و با فشار توسط پیستون تمام محتویات ستون به داخل لوله منتقل گردید. سلول‌های داخل لوله، سلول‌های نشاندار شده با آنتی‌بادی CD34⁺ بودند.

آماده‌سازی محیط:

جهت کشت سلول‌ها، از محیط Stemline II (سیگما، آلمان) با حمایت سایتوکاین‌های SCF (۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، پپروتک، انگلستان)، TPO (۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، گیبکو، آمریکا) و Flt-3 (۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، گیبکو، آمریکا) استفاده گردید.

کشت سلول‌ها در محیط ۲ بعدی:

حدود ۱۰ تا ۱۵ هزار سلول CD34 مخلوط در ۲۵۰ میکرولیتر محیط را به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه پلی‌استیرنی اضافه و سپس پلیت را به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO₂ ۵٪ انکوبه کردیم. هر ۴۸ ساعت یک بار، نیمی از محیط تعویض گردید.

کشت سلول‌ها در داریست سه بعدی:

ابتدا داریست PCL با غوطه‌وری در اتانول ۷۰٪ و سپس شستشو با PBS، اشعه UV و سپس خشک شدن به مدت یک شبانه روز استریل شد. داریست‌های استریل در پلیت ۲۴ خانه پلی‌استیرن قرار داده شد و سپس با کلاژن با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پوشانده شد. بعد از این مدت، کلاژن را از روی داریست‌ها برداشته و سلول‌ها را به همراه محیط به آن‌ها اضافه نمودیم. حدود ۱۰ تا ۱۵ هزار سلول CD34 مخلوط در ۲۵۰ میکرولیتر محیط، به هر چاهک

۶۰ ثانیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد (۴۰ چرخه) در دستگاه Real-time PCR (ABI، آمریکا) قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱: توالی ژن‌های مورد استفاده

ژن	توالی
CXCR-4 F	TGAACCCCATCCTCTATGCTT
CXCR-4 R	GATGAATGTCCACCTCGCTTT
GAPDH-F	TGCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH-R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

آنالیز آماری:

آنالیز آماری توسط آزمون t با استفاده از نرم‌افزار ۶ GraphPad Prism صورت گرفت. هم‌چنین داده‌های qPCR توسط نرم‌افزار REST.2009 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

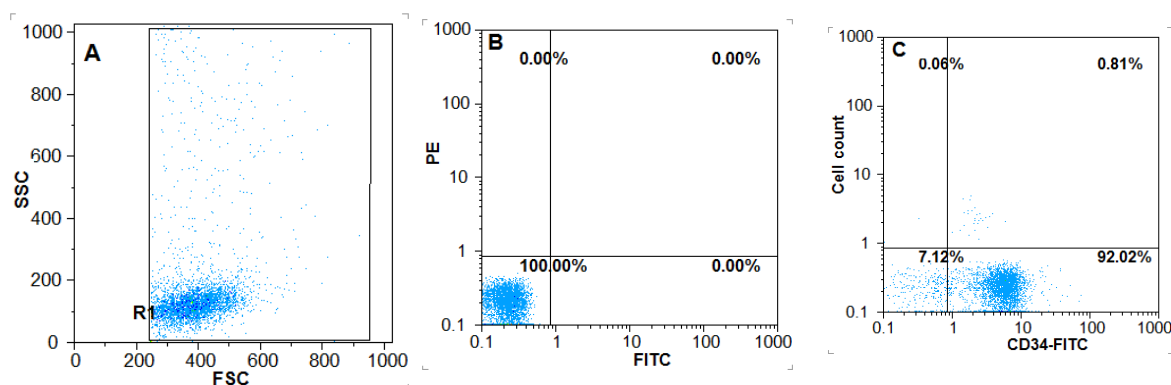
یافته‌ها

آنالیز فلوسیتومتری:

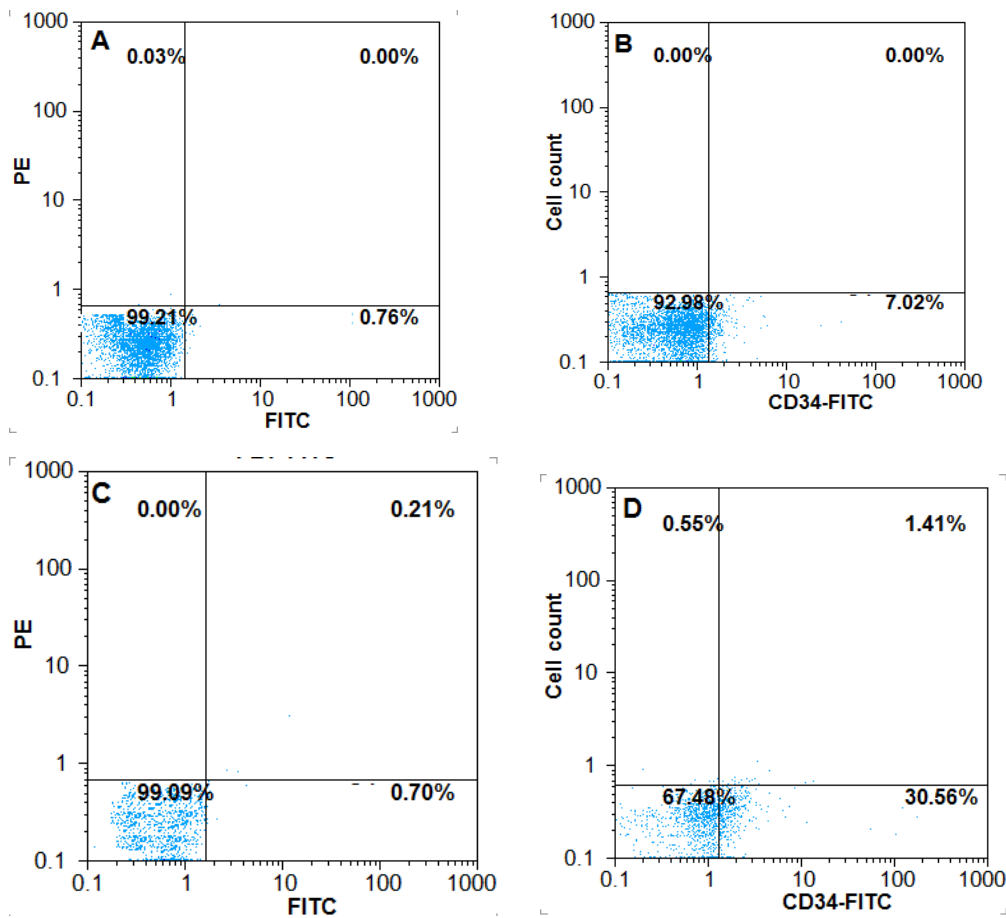
درصد خلوص سلول‌های $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف قبل و بعد از کشت، توسط فلوسیتومتری بررسی شد. درصد خلوص قبل از کشت ۹۳٪ و بعد از گسترش بر روی داربست ۳ بعدی و ۲ بعدی، به ترتیب $1/33 \pm 32$ و $7 \pm 0/86$ درصد بودند. این تفاوت از لحاظ آماری معنادار بود ($p < 0/05$) (شکل‌های ۱ و ۲).

دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز آبی به یک لوله جداگانه منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به آن اضافه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی برداشت شد و باقی‌مانده ته لوله با اتانول ۷۵٪ در دور ۷۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی دور ریخته شد و ۲۰ میکرولیتر آب به RNA اضافه گشت. جهت ارزیابی RNA، چگالی نوری ۲۶۰/۲۸۰ (OD260/280) و غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ مورد سنجش قرار گرفت. سپس ساخت cDNA با استفاده از کیت (ترموساینتیفیک، آلمان) صورت گرفت. به این منظور ۲۰۰ ng از RNA در مخلوطی از ۱ میکرولیتر آغازگر ۱۸ oligodt، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم AMV، ۴ میکرولیتر بافر ۴x، ۰/۵ میکرولیتر مهارکننده RNase، ۱ میکرولیتر dNTP mix، اضافه شده و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس با برنامه ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در ۷۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسیکلر قرار گرفت.

سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن CXCR-4 و ژن کنترل GAPDH، با برنامه ۱۵ دقیقه ۹۵ درجه سانتی‌گراد (یک چرخه)، ۲۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد و



شکل ۱: درصد خلوص سلول‌های $CD34^+$ قبل از گسترش - سلول‌های به دست آمده بعد از جداسازی خون بند ناف، بلافاصله از نظر مارکر سطحی $CD34$ مورد ارزیابی قرار گرفت. (A: جمعیت بررسی شده، (B: کنترل منفی، (C: درصد سلول‌های $CD34^+$. SCC: پراکنش کناری؛ FSC: پراکنش جلویی؛ PE: فیکواریترین؛ FITC: ایزوتیوسیانات فلورسنت.



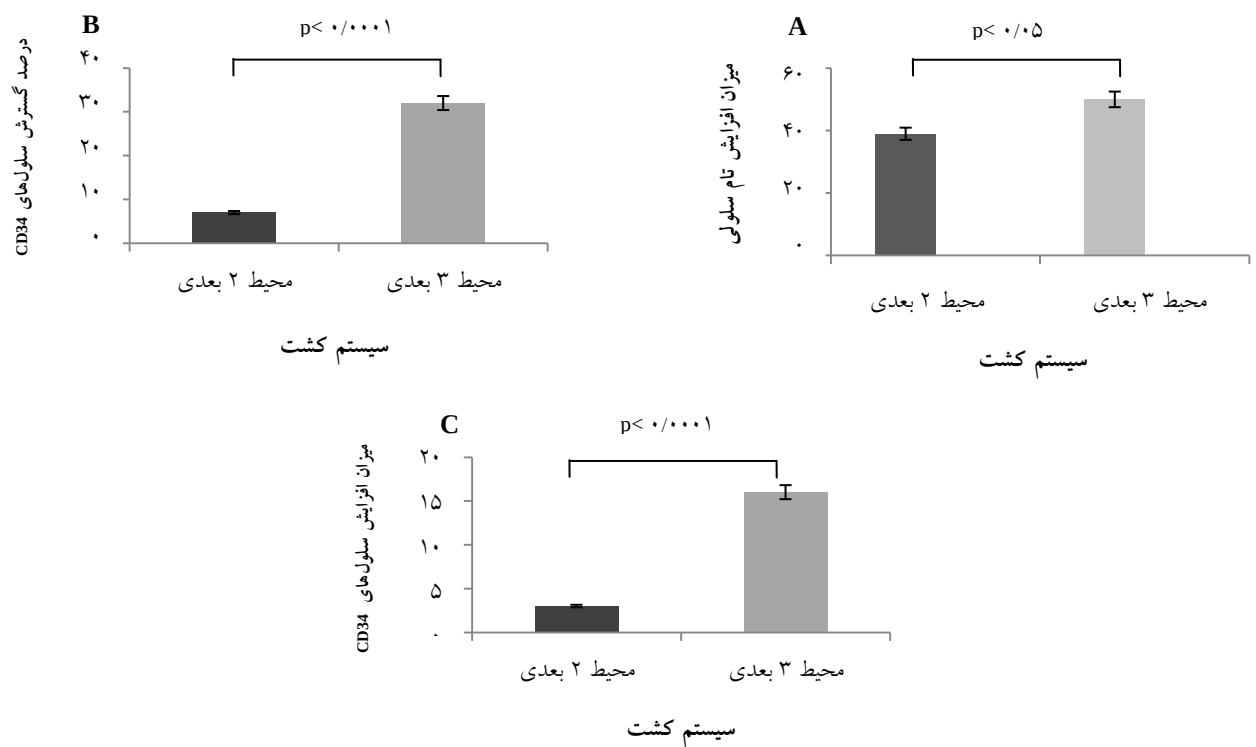
شکل ۲: درصد سلول‌های $CD34^+$ بعد از ۱۰ روز گسترش بر روی داربست PCL پوشیده شده با نانوالیاف فیبرونکتینی و محیط ۲ بعدی. (A): کنترل منفی نمونه در محیط ۲ بعدی، (B): درصد سلول‌های $CD34^+$ نمونه در محیط ۲ بعدی، (C): کنترل منفی نمونه در محیط ۳ بعدی، (D): درصد سلول‌های $CD34^+$ نمونه در محیط ۳ بعدی. SCC: پراکنش کناری؛ FSC: پراکنش جلویی؛ PE: فیکواریترین؛ FITC: ایزوتیوسیانات فلورسنت.

سنجش کلنی:

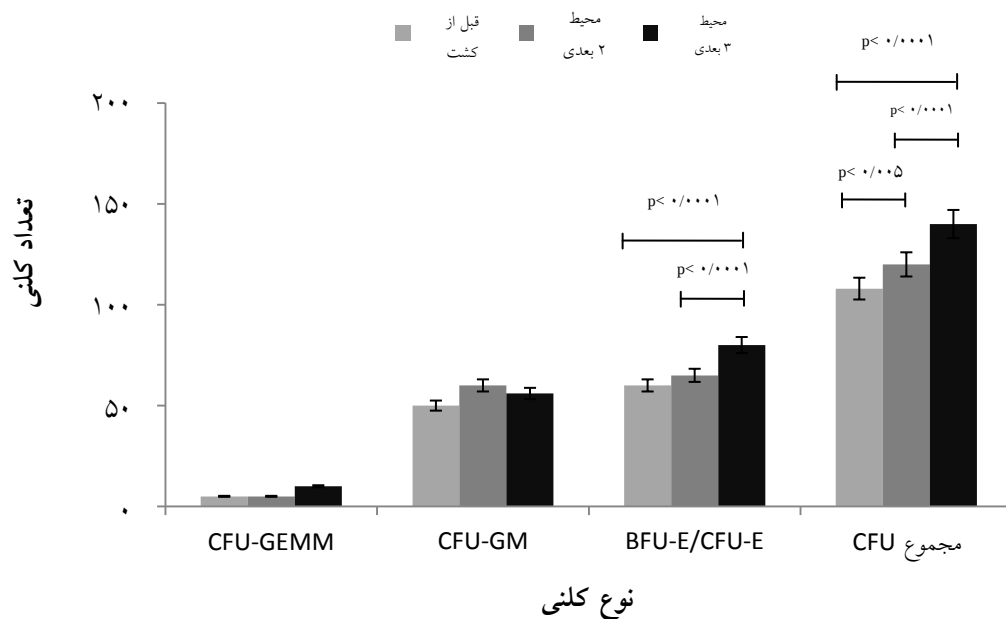
جهت تعیین قدرت کلنی زایی سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز خونساز قبل و بعد از گسترش، آزمون سنجش کلنی بر روی سلول‌های حاصل از ۱۰ روز کشت بر روی محیط ۳ بعدی و ۲ بعدی انجام گرفت. میزان کلنی‌های CFU-GEMM در داربست ۳ بعدی نسبت به محیط ۲ بعدی (8 ± 0.82 در مقابل 4.33 ± 0.94) و هم چنین قبل از کشت افزایش داشت، که این اختلاف به لحاظ آماری معنادار نبود. میزان کلنی‌های BFU-E/CFU-E در داربست ۳ بعدی نسبت به محیط ۲ بعدی (81.67 ± 5.44 در مقابل 81.67 ± 5.44) و هم چنین قبل از کشت (59 ± 3.27)

کشت سلول‌های $CD34^+$ بر روی داربست ۳ بعدی PCL پوشیده شده با نانو الیاف کلاژن:

تعداد سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف انسانی بعد از ۱۰ روز کشت در محیط ۲ بعدی، افزایش 38 ± 3.3 برابری را در میزان تام سلول‌ها و 2.6 ± 0.23 برابری را در میزان سلول‌های $CD34^+$ نشان دادند. هم چنین میزان تام سلول‌ها و سلول‌های $CD34^+$ در داربست ۳ بعدی پوشیده شده با نانو الیاف کلاژنی به ترتیب 50 ± 1.63 و 1.4 ± 0.5 برابر افزایش داشتند که این افزایش در مقایسه با محیط ۲ بعدی به لحاظ آماری معنادار بود ($P < 0.05$) (نمودار ۱).



نمودار ۱: اثرات سیستم کشت در محیط معمول و داربست PCL پوشیده شده با نانو الیاف کلاژنی (۲ بعدی در مقایسه با ۳ بعدی) بر روی گسترش سلول‌های بنیادی خونساز. ۱۰۰۰۰ سلول $CD34^{+}$ خون بند ناف (۹۳٪) بر روی محیط معمولی و داربست به مدت ۱۰ روز در محیط کشت سلولی فاقد سرم کشت شد و برای تجزیه و تحلیل از روی محیط برداشت شد. (A): میزان افزایش تام سلولی، (B): درصد گسترش سلول‌های $CD34^{+}$ ، (C): میزان افزایش سلول‌های $CD34^{+}$.



نمودار ۲: تعداد تام کلنی های سلول های پیش ساز (CFU-GM, BFU-E/CFU-E, CFU-GEMM) بر اساس کل کلنی ها برای سلول های گسترش یافته به مدت ۱۰ روز بر روی محیط ۲ بعدی و ۳ بعدی

بحث

با توجه به اولین پیوند موفقیت‌آمیز خون بند ناف و به دنبال آن ایجاد بانک‌های خون بند ناف، خون بند ناف به میزان زیادی در درمان بسیاری از بیماری‌های خونی و غیر خونی مورد استفاده قرار گرفت. به دلیل مشکل در پیدا کردن دهنده‌های مناسب مغز استخوان برای بیماران، خون بند ناف به عنوان منبع جایگزین سلول‌های بنیادی خونساز در پیوند سلول‌های بنیادی خونساز مورد توجه قرار گرفت. علی‌رغم تمام مزایای خون بند ناف، مشکل بزرگ این منبع محدود بودن تعداد سلول‌های موجود می‌باشد. یکی از راه‌های غلبه بر این مشکل، کشت این سلول‌ها است (۱۶).

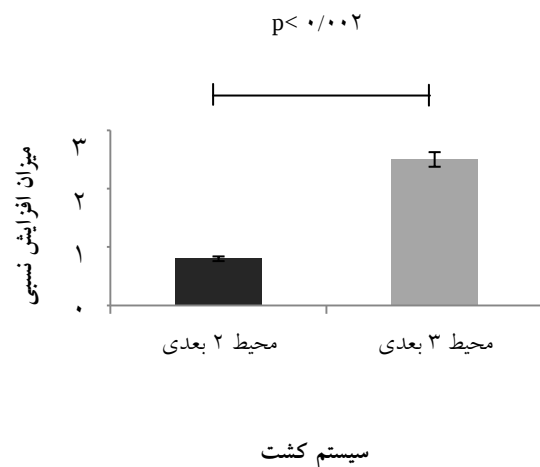
در این تحقیق، تعداد سلول‌های بنیادی کشت شده بر روی داربست ۳ بعدی پوشیده شده با نانو الیاف کلاژنی، قدرت بیشتری در گسترش سلول‌های بنیادی نسبت به گروه کنترل دارد. این تفاوت، به دلیل برهمکنش بهتر و هم چنین تقلید فیزیکی - شیمیایی، سلولی و ساختاری بهتر محیط ۳ بعدی از هیچ نسبت به محیط ۲ بعدی می‌باشد. ساختار ۳ بعدی طوری طراحی شده است که با بالابردن نسبت سطح به حجم، منجر به افزایش برهمکنش سلولی می‌شود. در حالی که این ظرفیت برهمکنش در محیط ۲ بعدی پایین می‌باشد و محدود به سلول‌های مجاور است (۱۷). هم چنین داربست ۳ بعدی نانوالیاف PCL که فضای محدودتری برای سلول‌ها ایجاد کرده‌اند، سبب اتصال بیشتر سلول - سلول و هم چنین فراهم‌سازی بستر مناسب برای تأثیر فاکتورهای اتوکرین و پاراکرین است. عامل مهم دیگر اتصال سلول، ماتریکس است که در این مطالعه سلول‌ها با کلاژن که از پروتئین‌های مهم ماتریکس خارج سلولی است، در تماس هستند. لایه خارجی سلول‌های اندوتلیال و استرومای مغز استخوان به ویژه در نیچ اندوستیل (جایگاه لانه گزینی سلول بنیادی خونساز)، پوشیده از کلاژن است. ترکیبات ماتریکس خارج سلولی، عناصر مهمی در نیچ سلول بنیادی خونساز هستند. اتصال بین سلول بنیادی خونساز و مولکول‌های چسبان (CAMs) نیچ، سبب نگه داشتن سلول‌های بنیادی خونساز در نیچ در کنار سلول‌های مستقر در آن، در نتیجه انتقال سیگنال‌های

در مقابل $7/87 \pm 53$ افزایش داشت، که این اختلاف به لحاظ آماری معنادار بود ($p < 0/001$).

هم چنین میزان کلنی‌های CFU-GM در داربست ۳ بعدی نسبت به محیط دوبعدی پایین‌تر ($3/27 \pm 53$ در مقابل $8/73 \pm 54/33$) اما نسبت به قبل از کشت افزایش داشت ($3/27 \pm 53$ در مقابل $2/94 \pm 47$)، که این اختلافات به لحاظ آماری معنادار نبود. میزان کل کلنی‌ها در داربست سه بعدی نسبت به محیط ۲ بعدی و قبل از کشت (به ترتیب $5/73 \pm 142/67$ در مقابل $4/55 \pm 121$ و $6/13 \pm 107/67$) افزایش معناداری داشت ($p < 0/001$) (نمودار ۲).

بررسی لانه گزینی سلول‌های بنیادی خونساز:

به منظور ارزیابی لانه‌گزینی و مهاجرت سلول‌های کشت داده شده، فاکتور CXCR-4 مورد بررسی قرار گرفت. بیان CXCR-4 بر روی سلول‌های کشت شده بر روی داربست ۳ بعدی نسبت به محیط ۲ بعدی بالاتر و دارای اختلاف معناداری بودند ($p < 0/002$) (نمودار ۳). بیان CXCR-4 در محیط ۲ بعدی نسبت به قبل از کشت پایین‌تر بود اما به لحاظ آماری معنادار نبودند، اما در محیط ۳ بعدی افزایش $0/53 \pm 2/5$ برابری را نسبت به محیط ۲ بعدی شاهد بودیم.



نمودار ۳. میزان تغییرات بیان CXCR-4 در محیط ۳ بعدی نسبت به ۲ بعدی بعد از ۱۰ روز کشت و هم چنین قبل از کشت

مهم در سرنوشت سلول بنیادی می‌گردد (۱۸، ۱۹).

در مطالعه دیگری، محققین از داربست‌های مختلف با پوشش‌های متفاوتی جهت کشت سلول‌های بنیادی خون بند ناف استفاده کرده‌اند. اهرینگ و همکارانش نشان دادند که تعداد سلول‌های کشت شده در سیستم سایتوماتریکس نسبت به محیط ۲ بعدی و هم چنین هم کشتی سلول‌های خون بند ناف با سلول‌های استرومال مغز استخوان بسیار بالاتر می‌باشد. هم چنین میزان سلول‌های $CD34^+$ و $CD45^+$ در محیط سایتوماتریکس، افزایش ۳ برابری و در محیط ۲ بعدی به ترتیب افزایش ۱/۳ و ۱/۶ برابری داشتند (۲۰). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۲، نشان داده شد که داربست ۳ بعدی PCL، فیبرین و کلاژن با و بدون همکشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیم خون بند ناف در مقایسه با محیط ۲ بعدی، تعداد سلول‌های $CD34^+$ بالاتری داشتند (۱۴). کای فنگ و همکارانش در سال ۲۰۰۶، پس از ۱۰ روز کشت در محیط پوشیده با PET (پلی اتیلن ترفتالات)، PET کونژوگه با فیبرونکتین و PET کونژوگه با کلاژن، به ترتیب افزایش ۱۵۳، ۱۸۵ و ۱۷۰ برابری را در TNC و هم چنین افزایش ۱۱، ۱۰۰ و ۷۵ برابری را در سلول‌های $CD34$ گزارش نمودند (۲۱). در سال ۲۰۰۳، هان سو کیم در محیط ۳ بعدی پوشیده شده با نانو الیاف کلاژنی در طی ۱۲ روز کشت، افزایش ۶۵ برابری را در TNC و ۱۱ برابری را در سلول‌های $CD34$ گزارش نمودند (۲۲). در سال ۲۰۱۱، در محیط کشت ۳ بعدی بدون افزودن سایتوکاین‌ها، در طی ۲۸ روز، ترزا مورترا بلانکو و همکارانش، به ترتیب افزایش ۷ برابری را در محیط پوشیده شده با PLGA (پلی لاکتید کو گلیکولید)، ۲۰ برابری را در محیط PU (پلی اورتان) و ۵۷ برابری را در محیط PU - کلاژن مشاهده نمودند (۲۳). هم چنین، نتایج این تحقیق مشابه نتایج بالا می‌باشد و نشان می‌دهد که سیستم داربست ۳ بعدی، محیط بهتری برای کشت سلول‌های $CD34^+$ و کل سلول‌ها در مقایسه با محیط ۲ بعدی است. نتایج نشان داد که میزان افزایش تام سلولی و سلول $CD34$ در محیط ۳ بعدی به ترتیب ۵۰ و ۱۶ برابر بود.

قدرت تشکیل کلنی به تعداد سلول‌های بنیادی و

پیش‌ساز خونساز بستگی دارد. با توجه به تعداد بالاتر سلول‌های بنیادی بعد از کشت در محیط ۳ بعدی نسبت به محیط معمولی، تعداد کلنی در محیط ۳ بعدی بالاتر می‌باشد. در سال ۲۰۰۳، اهرینگ و همکارانش نشان دادند که CFU-GM در سیستم کشت ۳ بعدی تعداد بیشتری در مقایسه با سیستم کشت معمولی دارد. در مطالعه دیگری که از داربست کونژوگه شده با فیبرونکتین و کلاژن استفاده کرده بودند، نشان داده شد تعداد کل کلنی نسبت به محیط ۲ بعدی بالاتر است اما به لحاظ آماری معنادار نبود (۲۰). در مطالعه فنگ و همکارانش میزان کلنی‌های CFU-GEMM، BFU-E/CFU-E و تعداد کلنی‌های تام در داربست PET کونژوگه شده با فیبرونکتین در مقایسه با محیط ۲ بعدی به ترتیب افزایش ۱۰/۵، ۶/۷ و ۳/۸ برابری را داشتند (۲۱). نتایج سنجش کلنی ما نیز مشابه نتایج مطالعه‌های بالا می‌باشد. در محیط کشت ۳ بعدی، تعداد کل کلنی نسبت به ۲ بعدی بالاتر بود اما به لحاظ آماری معنادار نبود. هم چنین تعداد کلنی‌های BFU-E/CFU-E در محیط ۳ بعدی بالاتر و CFU-GM نسبت به محیط دو بعدی پایین‌تر بود.

بیان ژن‌های لانه گزینی در سلول‌های بنیادی خونساز باعث قرارگیری این سلول‌ها در جایگاه مناسب می‌شود؛ اما این خصوصیت ممکن است در سیستم کشت‌های مختلف تغییر پیدا کند. محیطی که قدرت لانه گزینی را مانند مغز استخوان حفظ نماید، نسبت به سایرین محیط بهتری است. با توجه به این موضوع، بیان CXCR-4 در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت. اهرینگ و همکارانش گزارش کردند که این اپی‌توپ بر روی درصد زیادی از سلول‌های $CD34$ در مدل کشت سایتوماتریکس نسبت به محیط معمولی بیان می‌شود (۲۰). نتایج ما نیز نشان داد که بیان CXCR-4 در داربست PCL پوشیده شده با نانو الیاف کلاژن بیان بالاتری (افزایش ۲/۵ برابری) نسبت به مدل کشت ۲ بعدی دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج فوق می‌توان این گونه نتیجه گرفت که داربست ۳ بعدی نانوالیاف PCL پوشیده شده با کلاژن به

۳ بعدی به علت شبیه سازی بهتر ریز محیط نیچ مغز استخوان می باشد. استفاده از ترکیبات طبیعی ماتریکس خارج سلولی مغز استخوان نیز نقش مهمی در چسبندگی سلولی داشته است. در نهایت، داربست ۳ بعدی باعث تماس بهتر سلول و هم چنین چسبندگی آن ها می شود.

خوبی لانه گزینی این سلول ها را حفظ نموده است که می تواند کمک بزرگی به پیوند نماید. چرا که بالاتر بودن میزان لانه گزینی باعث قرارگیری صحیح این سلول ها در جایگاه خود و در نتیجه بالاتر بردن میزان موفقیت پیوند می گردد. به نظر می رسد حفظ بهتر لانه گزینی در داربست

References :

- 1- Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, *et al.* Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *New Engl J Med* 2000; 342(25): 1846-54.
- 2- Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8(5): 257-60.
- 3- Dalle J, Duval M, Moghrabi A, Wagner E, Vachon M, Barrette S, *et al.* Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33(6): 605-11.
- 4- Davey S, Armitage S, Rocha V, Garnier F, Brown J, Brown CJ, *et al.* The London Cord Blood Bank: analysis of banking and transplantation outcome. *Br J Haematol* 2004; 125(3): 358-65.
- 5- Zarrabi M, Mousavi SH, Abroun S, Sadeghi B. Potential uses for cord blood mesenchymal stem cells. *Cell J* 2014; 15(4): 274-81.
- 6- Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater* 2003; 5: 29-39; discussion 39-40.
- 7- Robinson S, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis J, Karandish S, *et al.* Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37(4): 359-66.
- 8- Cabral J. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells in bioreactors. *Biotechnol Lett* 2001; 23(10): 741-51.
- 9- Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(2): 93-106.
- 10- Wilson A, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, *et al.* Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1106(1): 64-75.
- 11- Liu H, Lin J, Roy K. Effect of 3D scaffold and dynamic culture condition on the global gene expression profile of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials* 2006; 27(36): 5978-89.
- 12- Vazin T, Schaffer DV. Engineering strategies to emulate the stem cell niche. *Trends Biotechnol* 2010; 28(3): 117-24.
- 13- Even-Ram S, Yamada KM. Cell migration in 3D matrix. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(5): 524-32.
- 14- Ventura Ferreira MS, Jahnen-Dechent W, Labude N, Bovi M, Hieronymus T, Zenke M, *et al.* Cord blood-hematopoietic stem cell expansion in 3D fibrin scaffolds with stromal support. *Biomaterials* 2012; 33(29): 6987-97.
- 15- Hu J, Ma PX. Nano-fibrous tissue engineering scaffolds capable of growth factor delivery. *Pharm Res* 2011; 28(6): 1273-81.
- 16- Gluckman E, Rocha V. History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells. *Cytotherapy* 2005; 7(3): 219-27.
- 17- Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International Journal of Polymer Science* 2011; 2011.
- 18- Nilsson SK, Debatis ME, Dooner MS, Madri JA, Quesenberry PJ, Becker PS. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *J Histochem Cytochem* 1998; 46(3): 371-7.
- 19- Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* 2001; 97(8): 2293-9.
- 20- Ehring B, Biber K, Upton T, Plosky D, Pykett M, Rosenzweig M. Expansion of HPCs from cord blood in a novel 3D matrix. *Cytotherapy* 2003; 5(6): 490-9.
- 21- Feng Q, Chai C, Jiang XS, Leong KW, Mao HQ. Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin. *J Biomed Mater Res A* 2006; 78(4): 781-91.
- 22- Kim HS, Lim JB, Min YH, Lee ST, Lyu CJ, Kim ES, *et al.* Ex vivo expansion of human umbilical cord blood CD34+ cells in a collagen bead-containing 3-dimensional culture system. *Int J Hematol* 2003; 78(2): 126-32.
- 23- Mortera-Blanco T, Mantalaris A, Bismarck A, Aqel N, Panoskaltsis N. Long-term cytokine-free expansion of cord blood mononuclear cells in three-dimensional scaffolds. *Biomaterials* 2011; 32(35): 9263-70.

Original Article

Expansion of human cord blood hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional nano fibrous collagen coated scaffold

Mousavi S.H.¹, Abroun S.¹, Soleimani M.¹, Mowla S.J.², Tamadon Gh.^{1,3}

¹Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Department of Genetic, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³School of Allied Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Abstract

Background and Objectives

The allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is used for the treatment of some hematological and non-hematological disorders, but the lack of suitable donors for many patients limits the use of this source therapy. Umbilical cord blood (UCB) is an alternative source of hematopoietic stem cell (HSC) transplantation. Despite all advantage lower cell doses is major obstacle in cord blood transplantation. Exvivo expansion of HSC is an alternative way to overcome this problem.

Materials and Methods

In this experimental study, Polycaprolactone (PCL) scaffold coated with nano fibrous collagen compared to routine cell culture system is used for cell culture. Total cells, CD34 cell, CFC assay, and CXCR-4 expression was performed.

Results

Our findings demonstrated that the total cell expansion and CD34⁺ cells in 3 dimensional (3D) scaffold compared to routine culture system (2D) was higher ($p < 0.05$). Also total colony cells in 3D scaffold was higher than 2D cell culture system and statically significant ($p < 0.05$). Higher CXCR-4 expression in 3D compared to 2D showed better homing of cells cultured in 3D scaffold ($p < 0.05$).

Conclusions

PCL scaffold coated with nano fibrous collagen was a proper cell culture system compared to 2D for cell expansion.

Key words: Cord Blood Stem Cell Transplantation, Hematopoietic Stem Cells, Tissue Engineering

Received: 30 Aug 2014

Accepted: 11 Nov 2014

Correspondence: Abroun S., PhD of Hematology. Associate Professor of Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14155-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82883860; Fax : (+9821) 82884507
E-mail: abroun@modares.ac.ir