خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۳ مکرر پاییز ۹۱
ویژه‌نامه سلول‌های بنیادی (۱۸۵-۱۷۷)

مقاله پژوهشی

# اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی استرومال کشت داده شده در داربست بر روی تکثیر سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف

رضا رنجبران[۱]، حسن ابوالقاسمی[۲]، ناهید نصیری[۳]، آرزو اودی[۴]، مهین نیکوگفتار[۵]، مریم امانی[۱]، اکبر هاشمی طیر[۱]، ناصر امیری‌زاده[۶]

## چکیده

### سابقه و هدف

پیوند سلول‌های بنیادی طی دهه‌های اخیر، به موفقیت‌های درمانی بالایی رسیده اما از محدودیت‌های استفاده از این منبع در بزرگسالان، تعداد کم سلول‌های $CD34^+$ می‌باشد. هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر سلول‌های مزانشیمی بر میزان تکثیر سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف بود.

### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های چسبنده مزانشیمی از سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان جدا شدند. سلول‌های $CD34^+$ موجود در خون بند ناف، با استفاده از آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با Microbead جدا شده و بر روی سلول‌های مزانشیمی کشت داده شدند. تاثیر سلول‌های مزانشیمی در شرایط دو بعدی، سه بعدی و شرایط بدون استفاده از سلول‌های مزانشیمی در تکثیر و حفظ پتانسیل ابتدایی سلول‌ها با شمارش سلولی، تعیین درصد سلول‌های $CD34^+$ به روش فلوسیتومتری و روش سنجش کلونی مورد مقایسه قرار گرفت.

### یافته‌ها

تکثیر سلول‌ها در سه محیط و در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در محیط فاقد سلول‌های مزانشیمی، میانگین میزان چند برابر شدن TNCها، CFCها و سلول‌های $CD34^+$ در روز دهم به ترتیب ۶ ± ۸۷، ۸ ± ۸۴ و ۳ ± ۱۱، در محیط دارای سلول‌های استرومال مزانشیمی در شرایط دو بعدی به ترتیب، ۸ ± ۱۰۳، ۹ ± ۱۱۱ و ۳ ± ۱۴ و در محیط دارای مزانشیم در شرایط سه بعدی به ترتیب، ۱۰ ± ۱۲۷، ۱۴ ±۱۷۰ و ۴± ۲۰ بود.

### نتیجه گیری

نتایج نشان می‌دهد که می‌توان از سلول‌های مزانشیمی به خصوص در شرایط ۳ بعدی، جهت افزایش تعداد سلول‌های بنیادی خونساز و حفظ پتانسیل کلونی‌زایی آن‌ها به طور طولانی مدت در محیط کشت استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی، خون بند ناف، آنتی‌ژن CD34 ، سلول‌های بنیادی

*تاریخ دریافت : ۸۹/۹/۲۱*
*تاریخ پذیرش : ۹۰/۸/۹*

۱ـ کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲ـ فوق تخصص خون و انکولوژی اطفال ـ استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و بقیه‌اله‌ـ تهران ـ ایران
۳ـ دانشجوی PhD هماتولوژی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ ایران
۴ـ دانشجوی PhD هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- PhD هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۶ـ مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

## مقدمه

پیوند سلول‌های بنیادی طی دهه اخیر به موفقیت‌های درمانی بالایی رسیده است و یک راه‌کار درمانی مناسب و عملی برای بسیاری از سرطان‌ها، بدخیمی‌های خونی و اختلالات سیستم ایمنی می‌باشد(۱).

منابع مختلفی جهت دست‌یابی به سلول‌های بنیادی وجود دارد که معمول‌ترین آن‌ها جهت استفاده شامل؛ مغز استخوان، خون محیطی تحریک شده با G-CSF و خون بند ناف می‌باشد(۲). استفاده از خون بند ناف نسبت به سایر منابع، دارای مزایایی از قبیل، پایین بودن خطر GVHD ، ابتدایی بودن سلول‌های بنیادی، پایین بودن احتمال انتقال عفونت‌ها به ویژه CMV ، بالا بودن توانایی کلونی‌زایی و عدم نیاز به سازگاری بالا از نظر HLA بین دهنده و گیرنده است.

عوامل فوق، باعث جلب توجه پژوهشگران به سمت استفاده از این منبع سلولی شده است(۳).

اما محدودیت مهم در استفاده از خون بند ناف، پایین بودن تعداد سلول‌های بنیادی خونساز و پروژنیتورهای موجود در این منبع می‌باشد. راه‌کاری که امروزه برای حل این مشکل بسیار مورد توجه قرار گرفته است، تکثیر سلول‌های خونساز اولیه و استم‌سل‌ها در محیط‌های *ex vivo* به منظور افزایش تعداد سلول‌های مورد نظر است(۴).

از میان عواملی که می‌تواند در تکثیر سلول‌های بنیادی و حفظ خصوصیت ابتدایی آن‌ها در شرایط *in vitro* نقش مؤثری داشته باشد، می‌توان به استفاده از سایتوکاین‌ها و لایه سلول‌های استرومایی در محیط کشت این سلول‌ها اشاره کرد(۵). لایه سلول‌های استرومایی، به طور فیزیولوژیکی قادر به تولید مقادیر زیادی از فاکتورهایی هستند که در خودسازی و حفظ خصوصیت ابتدایی سلول‌ها در محیط کشت نقش دارند. هم چنین اتصال سلولی بین سلول‌های استرومایی و سلول‌های بنیادی نیز در این امر مؤثر است(۶).

مطالعه‌های انجام شده در سال‌های اخیر نشان داده است که سیستم‌های کشت سه بعدی به دلیل ایجاد سطح بسیار اختصاصی نسبت به محیط کشت دو بعدی می‌توانند تاثیر بهتری در تکثیر سلول‌های کشت داده شده داشته باشند و نیز می‌توانند طول عمر HSC (Human Stem Cells) و HPC (Human Progenitor Cells) را در طی دوره کشت افزایش دهند(۷). بدین منظور در این مطالعه جهت بررسی تاثیر سلول‌های مزانشیمی در محیط‌های دو بعدی و سه بعدی بر میزان تکثیر استم‌سل‌های به دست آمده از خون بند ناف، سلول‌های $CD34^+$ به دست آمده را در شرایط کشت مختلف تکثیر داده و به بررسی و مقایسه نتایج حاصله پرداختیم.

## مواد و روش‌ها

*جداسازی سلول‌های مزانشیمی:*

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. سلول‌های تک هسته‌ای به وسیله فایکول (بیوسایِنس و آمرشام، سوئد) از نمونه آسپیره مغز استخوان جدا شدند و پس از شستشو، تعداد $۲ \times ۱۰^۵$ سلول به همراه ۵ mL از محیط DMEM Low glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (آمریکا، سیگما) حاوی ۱۰٪ FBS (آمریکا، بیومدیکال) به درون فلاسک $۲۵\ cm^2$ ریخته شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، سلول‌های غیر چسبنده با شستشو خارج گردید و محیط کشت DMEM Low glucose حاوی ۱۰٪ FBS به سلول‌ها اضافه شد، پس از ۳ پاساژ، سلول‌های چسبنده مزانشیمی از محیط قابل برداشت بود.

*آنالیز فلوسیتومتری:*

سلول‌های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان با استفاده از روش فلوسیتومتری تایید شدند. بدین منظور سلول‌ها تریپسینه شده و به مدت۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفوژ شدند. پلیت سلولی در ۱ میلی‌لیتر محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) سوسپانسیون گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها با ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های CD40 ، CD166 ، CD90، CD105 ، CD45 و CD34 مخلوط گردید و در نهایت برای آنالیز به دستگاه داده شد.

*تمایز به استئوبلاست:*

به منظور تسریع روند استئوژنزیس، کف چاهک‌های



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

یک پلیت ۲۴ خانه با کلاژن و ویترونکتین پوشیده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، مخلوط کلاژن و ویترونکتین هر چاهک را خالی کرده و سلول‌های مزانشیمی به همراه ۱ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حاوی سرم به چاهک‌ها افزوده شد و پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ ºC و فشار $CO_2$ ۵٪ قرار داده شد. هنگامی که میزان رشد در ظرف کشت سلول‌ها به ۱۰۰٪ رسید، محیط کشت خالی شد و ۱ میلی‌لیتر محیط تمایز حاوی ۱۰٪ FBS (Fetal Bovine Serum) به آن افزوده شد. در چاهک‌های کنترل، تنها محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS اضافه شد. پس از ۱۷-۱۴ روز به منظور بررسی تمایز سلول‌ها، دو رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد و آلکالن فسفاتاز انجام گرفت.

*جداسازی سلول‌های $CD34^+$:*

ابتدا گلبول‌های قرمز در نمونه بند ناف توسط هیدروکسی اتیل استارچ Heta sep (Stem cell technology) رسوب داده شد و سلول‌های تک هسته‌ای موجود در مایع‌رویی به کمک فایکول جدا شد. سلول‌های $CD34^+$ موجود در بین MNC (Mononuclear Cells) به کمک آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه آنتی‌ژن CD34 (آلمان، میلتنی بیوتک) متصل به ذرات microbead و دو بار عبور از ستون LS و MACS (Magnetic Cell Sorting)(آلمان، میلتنی بیوتک) از سایر سلول‌ها جدا شد.

*سایتوکاین‌های مورد استفاده:*

در این مطالعه از سایتوکاین‌های نوترکیب انسانی به صورت ترکیبی از (Stem cell technology ، ونکور) SCF (Stem Cell Factor)، FL (Flt3 Ligand) و TPO (Thrombopoietin) با غلظت نهایی ۱۰۰ ng/mL در محیط استفاده شد.

*کشت سلول‌های $CD34^+$:*

کشت در محیط فاقد استروما(محیط اول) : $10^3$ سلول $CD34^+$ جدا شده در چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای (آمریکا، کوستار) حاوی ۱ میلی‌لیتر از محیط stemspan ( Stem cell technology) و در حضور سایتوکاین‌های ذکر شده کشت داده شد.

هم کشتی با سلول‌های مزانشیمی در شرایط دو بعدی (محیط دوم): تعداد $2\times10^4$ سلول مزانشیمی درون چاهک پلیت ۲۴ تایی پاساژ داده شدند، پس از رسیدن به میزان رشد در ظرف کشت معادل ۸۰٪ ، محیط تخلیه و سلول‌ها شستشو داده شد. برای جلوگیری از تکثیر بیشتر سلول‌های مزانشیمی از میتومایسین C (آمریکا، سیگما) با غلظت ۲ µg/mL استفاده شد. برای حذف میتومایسین از محیط کشت، سلول‌ها سه بار با PBS شستشو داده شدند. در نهایت $10^3$ سلول $CD34^+$ به همراه ۱ میلی‌لیتر از محیط stemspan و سایتوکاین‌های ذکر شده به چاهک اضافه شد.

هم کشتی با سلول‌های مزانشیمی در شرایط سه بعدی(محیط سوم): داربست‌های سه بعدی از جنس کلسیم فسفات(آمریکا، بیوساینس BD) درون چاهک پلیت ۲۴ تایی قرار داده شد و به وسیله $2\times10^4$ سلول مزانشیمی، سطوح آن‌ها پوشانده شد و پس از تکثیر سلول‌ها، میتومایسین C به روش قبل اضافه شد، در نهایت $10^3$ سلول $CD34^+$ به همراه ۱ میلی‌لیتر از محیط stemspan و سایتوکاین‌های ذکر شده روی داربست‌ها ریخته شد.

تمام کشت‌ها به صورت سه تایی انجام شد. در نهایت ۲۷ محیط کشت حاصل در انکوباتور ۳۷ ºC و ۵٪ $CO_2$ نگهداری شدند. سایتوکاین‌ها و محیط کشت تازه در روزهای ۳ و۷ پس از کشت به محیط اضافه شد.

*شمارش سلولی و درصد زنده ماندن سلول‌ها :*

سلول‌های تکثیر داده شده در روزهای ۳ ، ۷ و ۱۰ از محیط جدا شد و پس از رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو(آلمان، مارک) به کمک لام هماسیتومتر، تعداد سلول‌ها و درصد زنده ماندن آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

*تعیین درصد سلول‌های $CD34^+$:*

سلول‌ها قبل(روز صفر) و بعد از تکثیر در محیط‌های مختلف در روزهای ۳ ، ۷ و ۱۰ از محیط برداشته شدند و پس از شستشو، آنتی‌بادی مونوکلونال بر ضد CD34 نشاندار شده با PE (Phyco Erythrin)(دانمارک، داکو) به



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

سلول‌ها اضافه شد و به مدت 15 min در 4 ºC انکوبه شدند. از آنتی‌بادی IgG موشی(دانمارک، داکو) به عنوان ایزوتایپ کنترل استفاده شد. در نهایت به وسیله دستگاه فلوسیتومتری(آلمان، پارتک)، درصد سلول‌های $CD34^+$ ارزیابی شد.

*سنجش کلونی:*

$10^3$ سلول از سلول‌های $CD34^+$ قبل از تکثیر و سلول‌های تکثیر یافته در محیط‌های مختلف در روزهای ۳، ۷ و ۱۰ طبق دستورالعمل پس از مخلوط کردن با ۱ میلی‌لیتر از محیط(methocult (Stem cell technology H4435 در دمای اتاق به درون پلیت‌های $35\ mm^2$ (دانمارک، نانس) ریخته شدند. این مرحله به صورت دوتایی انجام شد و به مدت ۱۴ روز انکوباسیون در دمای ۳۷ ºC و ۵٪ $CO_2$ صورت گرفت و پس از این مدت، کلونی‌ها به وسیله میکروسکوپ لوپ(ژاپن، نیکون) شمارش و بررسی شدند.

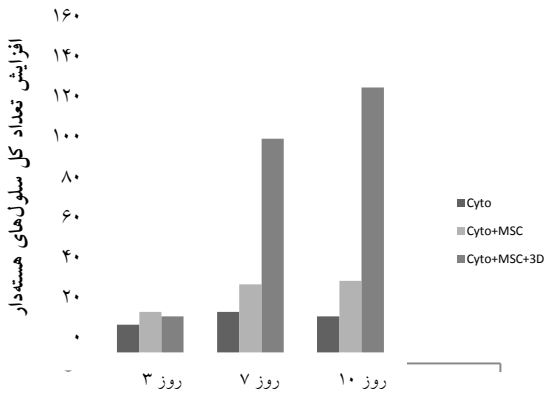
*آنالیز آماری:*

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۶ انجام شد. به منظور مقایسه تعداد و میزان چند برابر شدن کل سلول‌های هسته‌دار، تعداد، درصد و میزان چند برابر شدن سلول‌های $CD34^+$ و هم چنین تعداد و میزان چند برابر شدن کل سلول‌های کلونی‌زا در ۲۷ محیط کشت(سه گروه مورد مطالعه)، از آزمایش پارامتریک Anova استفاده شد و اختلاف $p< ۰/۰۵$ معنادار تلقی شد.

## یافته‌ها

با استفاده از آنالیز فلوسیتومتری، بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل CD90، CD166، CD105 و CD44 و عدم بیان مارکرهای ویژه سلول‌های هماتوپوئتیک از جمله CD45 و CD34 در سلول‌های جدا شده از مغز استخوان تایید شد. جهت حذف واکنش‌های غیر اختصاصی، از آنتی‌بادی‌های ایزوتیپ کنترل استفاده شد. به منظور بررسی توانایی تمایز سلول‌های مزانشیمی، از تمایز آن‌ها به سلول‌های استئوبلاست استفاده شد. در نهایت این سلول‌های استئوبلاست با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی آلیزارین رد و آلکالن فسفاتاز تایید شدند.

میانگین میزان چند برابر شدن کل سلول‌های هسته‌دار در هر سه محیط در طی دوره کشت افزایش نشان داد. میانگین این تعداد در روز پایانی کشت در محیط اول تقریباً ۶ ± ۸۷ برابر، در محیط دوم ۸ ± ۱۰۳ برابر و در محیط سوم ۱۰ ± ۱۲۷ برابر نسبت به تعداد سلول‌های اولیه کشت داده شده بود(نمودار۱). میانگین این تعداد در محیط سوم بیشتر از محیط اول و دوم و در محیط دوم بیشتر از محیط اول بود($p< ۰/۰۵$).



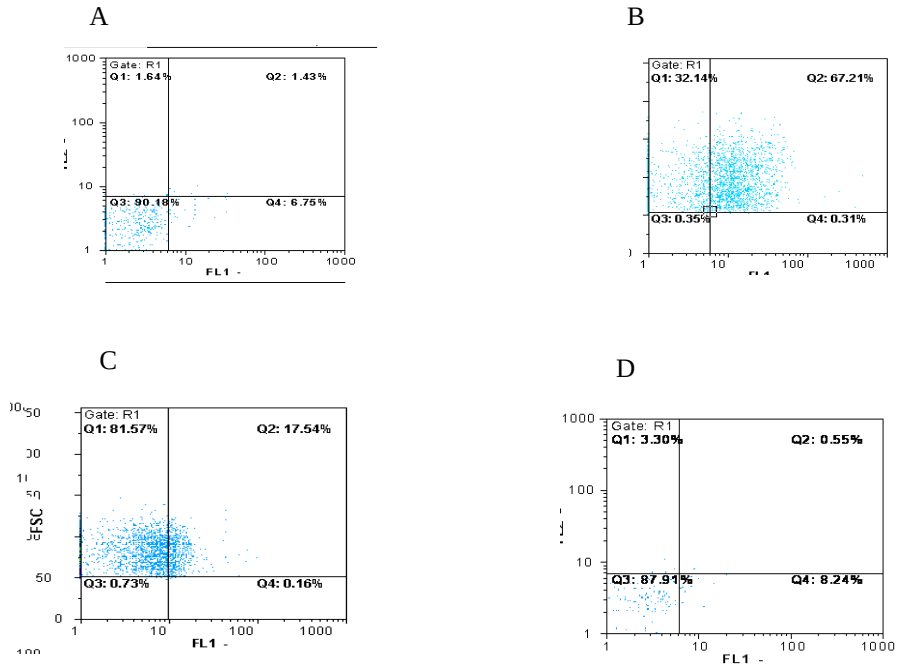

**نمودار ۱: تکثیر کل سلول‌های هسته‌دار در هم‌کشتی با یا بدون سلول‌های بنیادی مزانشیمی**

تعداد کل سلول‌های $CD34^+$ پس از تکثیر با توجه به درصد سلول‌های $CD34^+$ ، از تعداد کل سلول‌های تکثیر یافته نهایی محاسبه و میانگین میزان چند برابر شدن سلول‌های $CD34^+$ با تقسیم آن‌ها بر میانگین تعداد سلول‌های $CD34^+$ اولیه(۶۷۰) محاسبه گردید، که این مقادیر در هر سه محیط تا روز دهم افزایش داشت(شکل ۱). میانگین میزان چند برابر شدن سلول‌های $CD34^+$ در روز پایانی کشت در محیط اول تقریباً ۳ ± ۱۱برابر، در محیط دوم ۳ ± ۱۴ برابر و در محیط سوم ۴ ±۲۰ برابر نسبت به تعداد سلول‌های اولیه کشت داده شده بود. این مقادیر در محیط سوم بیشتر از محیط اول و دوم بود و در محیط دوم نسبت به محیط اول بیشتر بود($p< ۰/۰۵$)(نمودار۲).

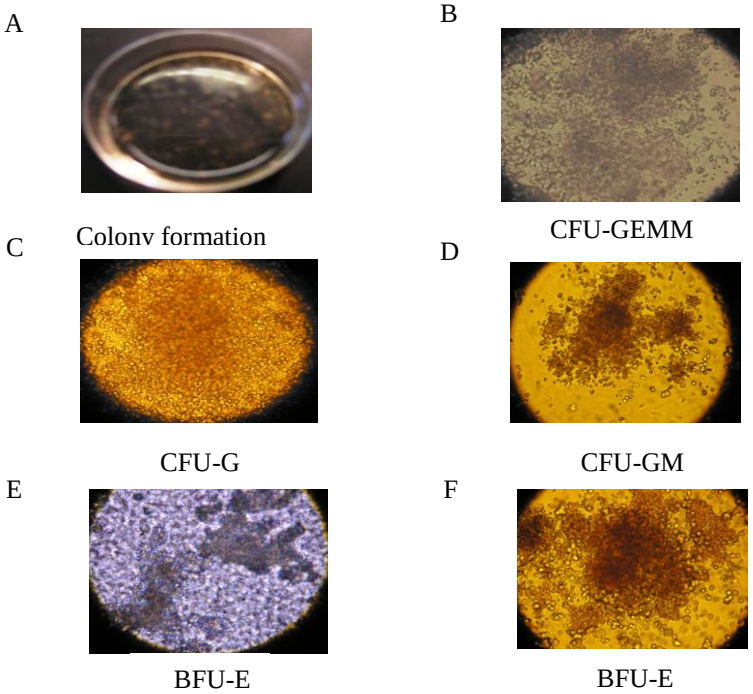
میانگین میزان چند برابر شدن سلول‌های کلونی‌زا در



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]




**شکل ۱: مقایسه درصد بیان $CD34^+$ در میان سلول‌های هماتوپویتیک قبل و بعد از تکثیر در محیط‌های مختلف. سلول‌های $CD34^+$ بند ناف در محیط‌های مختلف با استفاده از سیستم‌های کشت مختلف کشت داده شدند. A) درصد سلول‌های $CD34^+$ در محیط اول روز ۱۰ ، B) درصد سلول‌های $CD34^+$ در روز اول، C) درصد سلول‌های $CD34^+$ در محیط سوم روز ۱۰، D) درصد سلول‌های $CD34^+$ در محیط دوم روز ۱۰.**

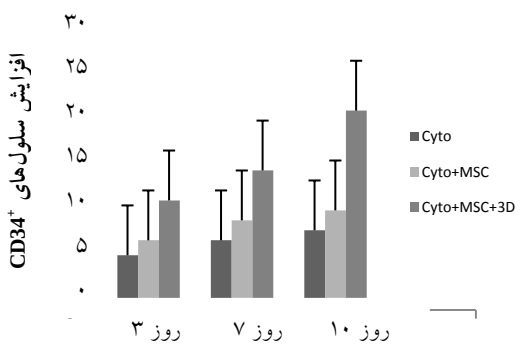



**شکل ۲ : کلونی‌های مختلف تشکیل شده در محیط Methocult H4435 .**

**A) تشکیل کلونی، B)کلونی‌های مخلوط دارای سلول‌های میلوئید، اریتروئید و مگاکاریوسیت( Colony Forming Unite-Granolocyte Erytroid Monocyte Megakaryocyte ، C) کلونی‌های دارای سلول‌های گرانولوسیت(Colony Forming Unite-Granolocyte) ، D)کلونی‌های دارای سلول‌های گرانولوسیت و مونوسیت(Colony Forming Unite-Granolocyte Monocyte ، F) و E) Burst Forming Unite-Erythroid**



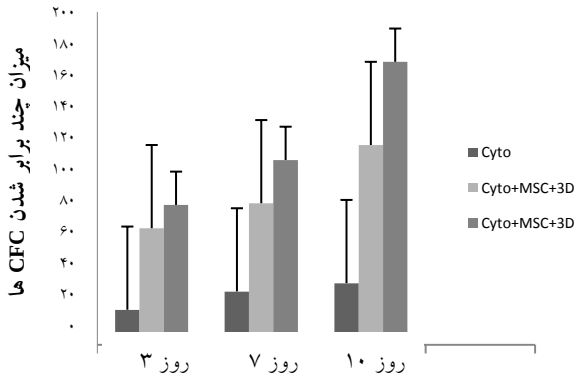
[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]




**نمودار ۲: تکثیر سلول‌های $CD34^+$ در هم‌کشتی با یا بدون سلول‌های بنیادی مزانشیمی**

روز پایانی کشت در محیط اول ۸ ± ۸۴ ، در محیط دوم ۹ ± ۱۱۱ و در محیط سوم ۱۴ ± ۱۷۰ بود.

تعداد کل سلول‌های کلونی‌زا، از حاصل‌ضرب تعداد کلونی‌ها به ازای ۱۰۰۰ سلول در تعداد کل سلول‌های هسته‌دار موجود در محیط، تقسیم بر ۱۰۰۰ به دست آمد و میزان چند برابر شدن آن‌ها، از تقسیم تعداد کل سلول‌های کلونی‌زا بر ۳۵ (میانگین تعداد سلول‌های کلونی‌زا به ازای ۱۰۰۰ سلول قبل از تکثیر) به دست آمد که این مقادیر در هر سه محیط تا روز چهاردهم افزایش داشت. بنابراین در روز پایانی، این مقادیر در محیط سوم بیشتر از محیط اول و دوم بود و در محیط دوم نسبت به محیط اول بیشتر بود(۰/۰۵)(نمودار۳ و شکل۲).




**نمودار ۳: میانگین میزان چند برابر شدن سلول‌های کلونی‌زا در هم‌کشتی با یا بدون سلول‌های بنیادی مزانشیمی**

## بحث

یکی از منابع مورد استفاده برای پیوند سلول‌های بنیادی خونساز به بیماران، خون بندناف می‌باشد. با توجه به این که تعداد این سلول‌ها برای پیوند به بزرگسالان کافی نیست محققین در جستجوی راهی برای تکثیر این سلول‌ها و حفظ پتانسیل تولید رده‌های مختلف سلول‌های خونی در این سلول‌ها می‌باشند. مطالعه‌ها نشان می‌دهد که استفاده از سلول‌های استرومایی در *in vitro* ، می‌تواند در تکثیر و نگهداری سلول‌های خونساز در حالت ابتدایی نقش داشته باشد(۹، ۸). از آن جا که خونسازی در مغز استخوان خونساز، بیشتر در کنار تیغه‌های استخوانی صورت می‌گیرد و هم چنین نتایج مطالعه‌های مختلف نشان داده‌اند که ارتباطی بین خونسازی و ساختار استخوان وجود دارد، در این مطالعه سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف در حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمال در محیط دو بعدی و در داربست‌های سه بعدی از جنس کلسیم فسفات پوشانده شده توسط سلول‌های مزانشیمی کشت داده شده و نتایج بیانگر افزایش میزان تکثیر در محیط سه بعدی نسبت به محیط دو بعدی و محیط بدون سلول‌های مزانشیمال بود(۹، ۱).

برای کشت سلول‌های خونساز بند ناف، سلول‌های تک هسته‌ای موجود در خون بند ناف جدا شد و سلول‌های $CD34^+$ موجود از سایر سلول‌های تک هسته‌ای جدا گردید.

متوسط غلظت سلول‌های $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف، ۳۷ ± ۱۵۸سلول به ازای هر میلی‌متر مکعب بود. بر اساس گزارش‌های موجود، تغییرات در نسبت تعداد سلول‌های $CD34^+$ به ازای سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف بر اساس سن حاملگی، روش زایمان و موقعیت نوزاد پس از زایمان متفاوت می‌باشد(۱۰).

جهت ارزیابی میزان خلوص سلول‌های جدا شده، از فلوسیتومتری استفاده شد. درصد خلوص سلول‌ها به طور متوسط ۱۱ ± ۶۶ درصد بود. درجه خلوص به دست آمده در مطالعه‌های مختلف، متفاوت می‌باشد. بر اساس گزارش ارایه شده توسط کوک و همکاران در سال ۲۰۰۷ ، ترکیبات مختلف به کار رفته در بافری که برای جداسازی سلول‌های $CD34^+$ مورد استفاده قرار می‌گیرد، می‌تواند در میزان خلوص سلول‌های جدا شده نقش مهمی داشته باشد. در



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

مطالعه انجام شده توسط این گروه، از ۲٪ FBS ، پلاسمای مادری با غلظت ۲٪ و ۰/۵٪ HSA ( Human Serum Albumin)، جهت جداسازی سلول‌ها استفاده شد که بیشترین درصد خلوص را پس از جداسازی با ۰/۵٪ HSA با میانگین ۸۴/۹٪ خلوص و کمترین مقدار را پس از جداسازی با ۲٪ FBS با میانگین ۵۰/۶٪ خلوص داشتند(۱۱). در این مطالعه برای جداسازی از محلول حاوی PBS ، EDTA و آلبومین سرم گاوی استفاده شد.

در کشت سلول‌ها در محیط دو بعدی بر روی سلول‌های مزانشیمی، میانگین میزان TNCها در روز ۱۰ پس از تکثیر، ۸ ± ۱۰۳ برابر شده بود وآنالیز درصد سلول‌های $CD34^+$ ، نشان‌دهنده ثبات نسبی میانگین درجه خلوص این سلول‌ها و ۱۴ برابر شدن تعداد آن‌ها در روز ۱۰ هم کشتی بود. این نتایج با نتایج به دست آمده از مطالعه زی و همکاران در سال۲۰۰۶ هم‌خوانی داشت(۱۲). در این مطالعه از یک سیستم هم کشتی با سلول‌های مزانشیمی دست‌کاری ژنتیکی شده که سایتوکاین‌های Flt3L و TPO ترشح می‌کردند استفاده گردید.

هم چنین نتایج کلونی سنجی که بر روی ۱۰۰۰ سلول حاصل از تکثیر انجام شد، بیانگر افزایش میانگین تعداد کل CFCها به اندازه ۱۱۱ برابر پس از ۱۰ روز بود. در مطالعه یو و همکاران در سال۲۰۰۶، تعداد کل CFCها پس از ۱۰ روز کشت بر روی مزانشیم در محیط دو بعدی ۹ ± ۱۳۲ برابر شده بود که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی داشت(۸). نتایج به دست آمده در محیط فاقد استروما حاکی از افزایش میانگین میزان چند برابر شدن تعداد TNCها تا پایان روز ۱۰ در سطحی پایین‌تر از روش هم‌کشتی با سلول‌های استرومایی با میانگین ۶ ± ۸۷ برابر شدن بود، که با نتایج مطالعه‌های زی در سال ۲۰۰۶ مطابقت داشت(۱۲). در این مطالعه از محیط فاقد سرم استفاده شده اما در بعضی از مطالعه‌ها، از سرم در محیط کشت استفاده گردیده است به طوری که کوک و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که حضور مقدار کمی از آلبومین در محیط کشت، می‌تواند به عنوان یک مسدودکننده تاثیر عوامل بازدارنده موجود در محیط کشت عمل کند، بنابراین می‌تواند به طور مؤثر ظرفیت تکثیر HPC ها را افزایش دهد(۱۱). سایر فاکتورهای ناشناخته موجود در پلاسما یا سرم ممکن است به حفظ توانایی تکثیر HPC ها کمک کنند اما خطر احتمال انتقال عوامل پاتوژن و واکنش‌های آلرژیک نسبت به سرم، تمایل به استفاده از آن‌ها را کاهش داده است.

در سال ۲۰۰۳، ارینگ و همکاران، از کشت سه بعدی با پوششی از فیبرونکتین استفاده کردند. در محیط فاقد سرم و سایتوکاین، سلول‌های UCB-HSC کشت داده شدند که به علت عدم وجود سرم و سایتوکاین، سلول‌ها تکثیر نگردیدند. لذا در این مطالعه از سایتوکاین‌ها برای تکثیر و سلول‌های استرومایی جهت حمایت سلول‌های خونساز استفاده شد(۱۳). در شرایط سه بعدی، میانگین میزان چند برابر شدن تعداد TNC ها پس از ۱۰ روز کشت،۱۰ ± ۱۲۷ برابر شده بود که در مقایسه با دو روش قبل افزایش یافته بود. میانگین میزان چند برابر شدن سلول‌های $CD34^+$ و سلول‌های کلونی‌زا نیز در این روش تکثیر، در روز ۱۰ افزایش داشت. در تحقیقات انجام شده توسط یو و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مدت ۱۰ روز کشت سلول‌ها در محیط سه بعدی پوشانده شده با MSC نیز افزایش تعداد و درصد سلول‌های $CD34^+$ و تعداد کل CFCها در روز پایانی کشت گزارش شده است(۸). اما در مطالعه باگلی و همکاران در سال ۱۹۹۸ که از فیبرونکتین به عنوان بستر در محیط سلولی استفاده شده بود کاهش درصد سلول‌های $CD34^+$ مشاهده گردید(۱۴).

## نتیجه‌گیری

نتایج بررسی نشان می‌دهد که می‌توان از سلول‌های مزانشیمی به خصوص در شرایط ۳ بعدی جهت افزایش تعداد سلول‌های بنیادی خونساز و حفظ پتانسیل کلونی‌زایی آن‌ها به طور طولانی مدت در محیط کشت استفاده کرد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون وابسته به سازمان انتقال خون ایران می‌باشد. بدین‌وسیله از زحمات پرسنل محترم بخش فلوسیتومتری سازمان انتقال خون ایران قدردانی می‌شود.



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

## References :


1- Conrad PD, Emerson SG. *Ex vivo* expansion of hematopoietic cells from umbilical cord blood for clinical transplantation. J Leukoc Biol 1998; 64(2): 147-55.

2- Herve P. Donor-derived hematopoietic stem cells in organ transplantation: technical aspects and hurdles yet to be cleared. Transplantation 2003; 75(9 Suppl): 55S-57S.

3- Mallon BS, Park KY, Chen KG, Hamilton RS, McKay RD. Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. Int J Biochem Cell Biol 2006; 38(7): 1063-75.

4- Weiss MJ, Orkin SH. *In vitro* differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems. J Clin Invest 1996; 97(3): 591-5.

5- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haematopoietic stem cells *in vitro*. J Cell Physiol 1977; 91(3); 335-44.

6- Cabrita GJ, Ferreira BS, da Silva CL, Gonçalves R, Almeida-Porada G, Cabral JM. Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor. Trends Biothechnol 2003; 21(5): 233-40 .

7- Chertkov JL. Early hematopoietic and stromal precursor cells. Int Rev Cytol 1986; 102: 271-313.

8- Yue Z, Chou C, Xue S. Coculture of umbilical cord blood $CD34^+$ cells with human mesenchymal stem cells. Tissue Eng 2006; 12(8): 1261-70.

9- Li N, Feugier P, Serrurrier B, Latger-Cannard V, Lesesve JF, Stoltz JF, *et al*. Human mesenchymal stem cells improve *ex vivo* expansion of adult human $CD34^+$ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity. Exp Hematol 2007; 35(3): 507-15.

10- Pranke P, Hendrikx J, Debnath G, Alespeiti G, Rubinstein P, Nardi N, *et al.* Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental/ umbilical cord blood after culture. Braz J Biol Res 2005; 38(12): 1775-89.

11- Kwok YK, Tang MH, Law HK, Ngai CS, Lau YL, Lau ET. Maternal plasma or human serum albumin in wash buffer enhances enrichment and *ex vivo* expansion of human umbilical cord blood $CD34^+$ cells. Br J Hematol 2007; 137(5): 468-74.

12- Xie CG, Wang JF, Xiang Y, Qiu LY, Jia BB, Wang LJ, *et al*. Cocultivation of umbilical cord blood $CD34^+$ cells with retro-transduced hMSCs leads to effective amplification of long-term culture-initiating cells. World J Gastroenterol 2006; 12(3): 393-402.

13- Ehring B, Biber K, Upton TM, Plosky D, Pykett M, Rosenzweig M. Expansion of HSCs from cord blood in an novel 3D matrix. Cytotherapy 2003; 5(6): 490-9.

14- Bagley J, Rosenzweig M, Marks DF, Pykett MJ. Extended culture of multipotent hematopoietic progenitor without cytokine augmentation in a novel three-dimensional device. Exp Hematol 1999; 27(3): 496-504.


[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]

*Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; Stem Cell Suppl. 9(3): 177-185*

***Original Article***

# Expansion of $CD34^+$ umbilical cord blood in 3 dimentional culture media on mesenchymal stem cell coated scaffold

***Ranjbaran R.[1], Abolghasemi H.[2,3], Nasiri N.[4], Oodi A.[1], Nikougoftar M.[1], Amani M.[1], Hashemi A.[1], Amirizadeh N.[1]***

*[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
*[2]Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
*[3]Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
*[4]Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

## Abstract

***Background and Objectives***

Stem cell transplantation has achieved high success for treatment but the use of this source has some limitation. Cord blood transplantation is clinically limited by its low progenitor cell contents such as $CD34^+$. The aim of this study was to evaluate the effect of mesenchymal stem cells (MSCs) on replication of $CD34^+$ in cord blood.

***Materials and Methods***

In this experimental study MSCs were isolated and cultured from BM mononuclear cells. MSCs were used for co-culture in two systems of 2D and 3D cultures. After isolation, umbilical cord blood $CD34^+$ cells were cultured in two different systems. The level of expansion in these systems was evaluated by cell count, analysis of $CD34^+$ expression by flowcytometery, and CFU assay .

***Results***

Expansion of cord blood HSCs was evaluated at three different culture systems at three different times (day3, day 7 and day 10): the medium with cytokine, 2D medium with cytokine + MSCs, and 3D medium with cytokine + MSCs on scaffold. The fold increase of TNC, CFU, and $CD34^+$ cells at day 10 for the former medium was $87 \pm 6$, $84 \pm 8$, $11 \pm 3$, for the second $103 \pm 8$, $111 \pm 9$, $14 \pm 3$, and for the latter $127 \pm 10$, $170 \pm 14$, $20 \pm 4$, respectively. The highest expansion was observed in the 3D co-culture with MSCs after 10 days.

***Conclusions***

The results have demonstrated that the co-culture of CB HSCs with mesenchymal cells could increase the rate of expansion especially in the 3D system.

***Key words:*** Mesenchymal Stem Cells, Umbilical Cord Blood, CD34 Antigen, Stem Cells

*Received: 12 Dec 2010*
*Accepted:31 Oct 2011*

*Correspondence:* Amirizadeh N., PhD of Hematology and Blood Bank. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599 ; Fax : (+9821)88601599
E-mail: *n.amirizadeh@ibto.ir*



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09 ]