

اثر سلول های بنیادی مزانشیمی استرومال کشت داده شده در داربست بر روی تکثیر سلول های CD34⁺ خون بند ناف

رضا رنجبران^۱، حسن ابوالقاسمی^۲، ناهید نصیری^۳، آرزو اودی^۴، مهین نیکوگفتار^۵، مریم امانی^۶،
اکبر هاشمی طبر^۱، ناصر امیری زاده^۶

چکیده

سابقه و هدف

پیوند سلول های بنیادی طی دهه های اخیر، به موفقیت های درمانی بالایی رسیده اما از محدودیت های استفاده از این منبع در بزرگسالان، تعداد کم سلول های CD34⁺ می باشد. هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر سلول های مزانشیمی بر میزان تکثیر سلول های CD34⁺ خون بند ناف بود.

مواد و روش ها

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

یافته ها

تکثیر سلول ها در سه محیط و در زمان های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در محیط فاقد سلول های مزانشیمی، میانگین میزان چند برابر شدن TNC ها، CFC ها و سلول های CD34⁺ در روز دهم به ترتیب 87 ± 6 ، 84 ± 8 و 11 ± 3 ، در محیط دارای سلول های استرومال مزانشیمی در شرایط دو بعدی به ترتیب 103 ± 9 ، 111 ± 3 و 14 ± 3 و در محیط دارای مزانشیم در شرایط سه بعدی به ترتیب 127 ± 10 ، 170 ± 14 و 20 ± 4 بود.

نتیجه گیری

نتایج نشان می دهد که می توان از سلول های مزانشیمی به خصوص در شرایط ۳ بعدی، جهت افزایش تعداد سلول های بنیادی خونساز و حفظ پتانسیل کلونی زایی آن ها به طور طولانی مدت در محیط کشت استفاده کرد.

کلمات کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمی، خون بند ناف، آنتی ژن CD34، سلول های بنیادی

تاریخ دریافت: ۱۹/۹/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹/۸/۹۰

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- فوق تخصص خون و انکولوژی اطفال - استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و بقیه اله - تهران - ایران

۳- دانشجوی PhD هماتولوژی - دانشگاه علوم پزشکی تهران - ایران

۴- دانشجوی PhD هماتولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۵- PhD هماتولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۶- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق

پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

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 پروژنیاتورهای موجود در این منبع می‌باشد. راه‌کاری که امروزه برای حل این مشکل بسیار مورد توجه قرار گرفته است، تکثیر سلول‌های خونساز اولیه و اِستِم‌سل‌ها 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 فاکتورهای هستند که در خودسازی و حفظ خصوصیت ابتدایی سلول‌ها در محیط کشت نقش دارند. هم‌چنین 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 می‌تواند 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 اِستِم‌سل‌های 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**جدا سازی سلول‌های مزانشیمی:**

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. سلول‌های تک هسته‌ای به وسیله فایکول (بیوساینس و آمرشام، سوئد) از نمونه آسپیره مغز استخوان جدا شدند و پس از شستشو، تعداد 2×10^5 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 25 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 ترپسینه شده و به مدت ۱۰ 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 استئوزنزیس، کف چاهک‌های

technology) و در حضور سایتوکاین های ذکر شده کشت داده شد.

هم کشتی با سلول های مزانشیمی در شرایط دو بعدی (محیط دوم): تعداد 2×10^4 سلول مزانشیمی درون چاهک پلیت ۲۴ تایی پاساژ داده شدند، پس از رسیدن به میزان رشد در ظرف کشت معادل ۸۰٪، محیط تخلیه و سلول ها شستشو داده شد. برای جلوگیری از تکثیر بیشتر سلول های مزانشیمی از میتومایسین C (آمریکا، سیگما) با غلظت $2 \mu\text{g/mL}$ استفاده شد. برای حذف میتومایسین از محیط کشت، سلول ها سه بار با PBS شستشو داده شدند. در نهایت 10^3 سلول $\text{CD}34^+$ به همراه ۱ میلی لیتر از محیط stemspan و سایتوکاین های ذکر شده به چاهک اضافه شد.

هم کشتی با سلول های مزانشیمی در شرایط سه بعدی (محیط سوم): داربست های سه بعدی از جنس کلسیم فسفات (آمریکا، بیوساینس BD) درون چاهک پلیت ۲۴ تایی قرار داده شد و به وسیله 2×10^4 سلول مزانشیمی، سطوح آن ها پوشانده شد و پس از تکثیر سلول ها، میتومایسین C به روش قبل اضافه شد، در نهایت 10^3 سلول $\text{CD}34^+$ به همراه ۱ میلی لیتر از محیط stemspan و سایتوکاین های ذکر شده روی داربست ها ریخته شد.

تمام کشت ها به صورت سه تایی انجام شد. در نهایت ۲۷ محیط کشت حاصل در انکوباتور 37°C و ۵٪ CO_2 نگهداری شدند. سایتوکاین ها و محیط کشت تازه در روزهای ۳ و ۷ پس از کشت به محیط اضافه شد.

شمارش سلولی و درصد زنده ماندن سلول ها :

سلول های تکثیر داده شده در روزهای ۳، ۷ و ۱۰ از محیط جدا شد و پس از رنگ آمیزی با تریپان بلو (آلمان، مارک) به کمک لام هماسیتومتر، تعداد سلول ها و درصد زنده ماندن آن ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین درصد سلول های $\text{CD}34^+$:

سلول ها قبل (روز صفر) و بعد از تکثیر در محیط های مختلف در روزهای ۳، ۷ و ۱۰ از محیط برداشته شدند و پس از شستشو، آنتی بادی مونوکلونال بر ضد $\text{CD}34$ نشاندار شده با PE (Phyco Erythrin) (دانمارک، داکو) به

یک پلیت ۲۴ خانه با کلاژن و ویترونتکین پوشیده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، مخلوط کلاژن و ویترونتکین هر چاهک را خالی کرده و سلول های مزانشیمی به همراه ۱ میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی سرم به چاهک ها افزوده شد و پلیت در انکوباتور با دمای 37°C و فشار CO_2 ۵٪ قرار داده شد. هنگامی که میزان رشد در ظرف کشت سلول ها به ۱۰۰٪ رسید، محیط کشت خالی شد و ۱ میلی لیتر محیط تمایز حاوی ۱۰٪ FBS (Fetal Bovine Serum) به آن افزوده شد. در چاهک های کنترل، تنها محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS اضافه شد. پس از ۱۷-۱۴ روز به منظور بررسی تمایز سلول ها، دو رنگ آمیزی اختصاصی آلزارین رد و آلکالین فسفاتاز انجام گرفت.

جدا سازی سلول های $\text{CD}34^+$:

ابتدا گلبول های قرمز در نمونه بند ناف توسط هیدروکسی اتیل استارچ Heta sep (Stem cell technology) رسوب داده شد و سلول های تک هسته ای موجود در مایع رویی به کمک فایکول جدا شد. سلول های $\text{CD}34^+$ موجود در بین MNC (Mononuclear Cells) به کمک آنتی بادی مونوکلونال بر علیه آنتی ژن $\text{CD}34$ (آلمان، میلتنی بیوتک) متصل به ذرات microbead و دو بار عبور از ستون LS و MACS (Magnetic Cell Sorting) (آلمان، میلتنی بیوتک) از سایر سلول ها جدا شد.

سایتوکاین های مورد استفاده :

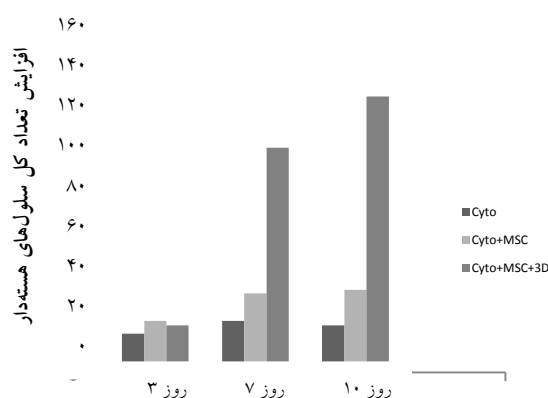
در این مطالعه از سایتوکاین های نو ترکیب انسانی به صورت ترکیبی از (Stem cell technology، ونکور) SCF (Stem Cell Factor)، FL (Flt3 Ligand) و TPO (Thrombopoietin) با غلظت نهایی 100 ng/mL در محیط استفاده شد.

کشت سلول های $\text{CD}34^+$:

کشت در محیط فاقد استروما (محیط اول) : 10^3 سلول $\text{CD}34^+$ جدا شده در چاهک پلیت ۲۴ خانه ای (آمریکا، کوستار) حاوی ۱ میلی لیتر از محیط stemspan (Stem cell

استئوبلاست با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی آلزارین 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 $6 \pm$ ۸۷ برابر، در محیط دوم 8 ± 103 برابر و در محیط سوم 10 ± 127 برابر نسبت به تعداد سلول‌های اولیه کشت داده شده بود (نمودار ۱). میانگین این تعداد در محیط سوم بیشتر از محیط اول و دوم و در محیط دوم بیشتر از محیط اول بود ($p < 0.05$).



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 3 ± 11 برابر، در محیط دوم 3 ± 14 برابر و در محیط سوم 4 ± 20 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 ($p < 0.05$) (نمودار ۲).

میانگین میزان چند برابر شدن سلول‌های کلونی‌زا در

سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۱۵ min در ۴ °C 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:

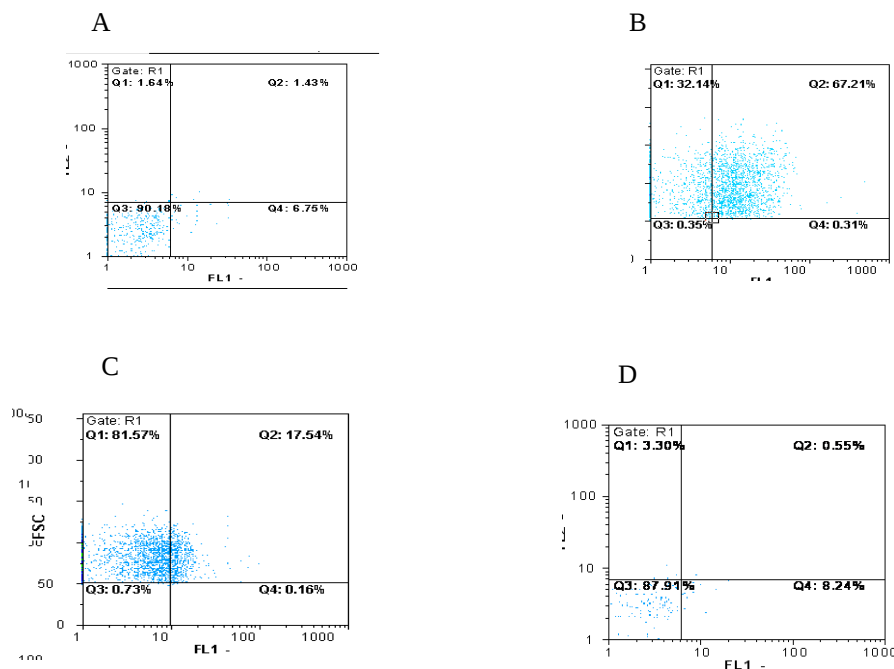
۱۰^۳ سلول از سلول‌های CD34⁺ قبل از تکثیر و سلول‌های تکثیر یافته در محیط‌های مختلف در روزهای ۳، ۷ و ۱۰ طبق دستورالعمل پس از مخلوط کردن با ۱ میلی‌لیتر از محیط (Stem cell technology) methocult H4435 در دمای اتاق به درون پلیت‌های ۳۵ mm² (دانمارک، نانس) ریخته شدند. این مرحله به صورت دوتایی انجام شد و به مدت ۱۴ روز انکوباسیون در دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO₂ صورت گرفت و پس از این مدت، کلونی‌ها به وسیله میکروسکوپ لوپ (ژاپن، نیکون) شمارش و بررسی شدند.

آنالیز آماری:

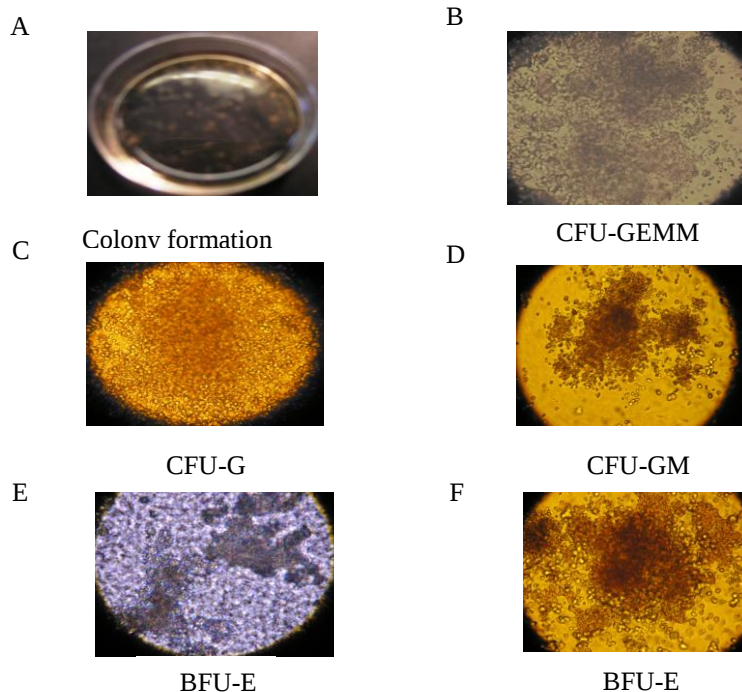
تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۶ انجام شد. به منظور مقایسه تعداد و میزان چند برابر شدن کل سلول‌های هسته‌دار، تعداد، درصد و میزان چند برابر شدن سلول‌های CD34⁺ و هم‌چنین تعداد و میزان چند برابر شدن کل سلول‌های کلونی‌زا در ۲۷ محیط کشت (سه گروه مورد مطالعه)، از آزمایش پارامتریک Anova استفاده شد و اختلاف $p < 0.05$ 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 هماتوپوئیک از جمله CD45 و CD34 در سلول‌های جدا شده از مغز استخوان تایید شد. جهت حذف واکنش‌های غیر اختصاصی، از آنتی‌بادی‌های ایزوتایپ کنترل استفاده شد. به منظور بررسی توانایی تمایز سلول‌های مزانشیمی، از تمایز آن‌ها به سلول‌های استئوبلاست استفاده شد. در نهایت این سلول‌های



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



شکل ۲: کلونی های مختلف تشکیل شده در محیط Methocult H4435.

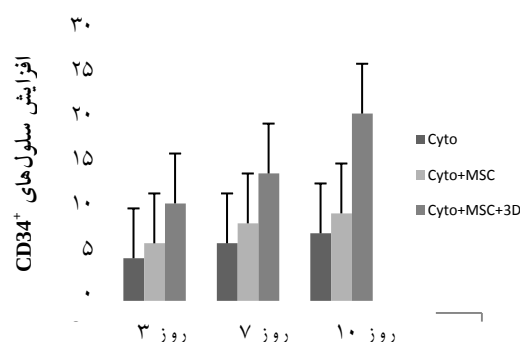
(A) تشکیل کلونی، (B) کلونی های مخلوط دارای سلول های میلوئید، اریتروئید و مگاکاریوسیت (Colony Forming Unite-Granulocyte)، (C) کلونی های دارای سلول های گرانولوسیت (Colony Forming Unite-Granulocyte)، (D) کلونی های دارای سلول های گرانولوسیت و مونوسیت (Colony Forming Unite-Granulocyte Monocyte)، (E) و (F) Burst Forming Unite-Erythroid

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 (۸، ۹). 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 داریست‌های 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، 37 ± 158 سلول 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 11 ± 66 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

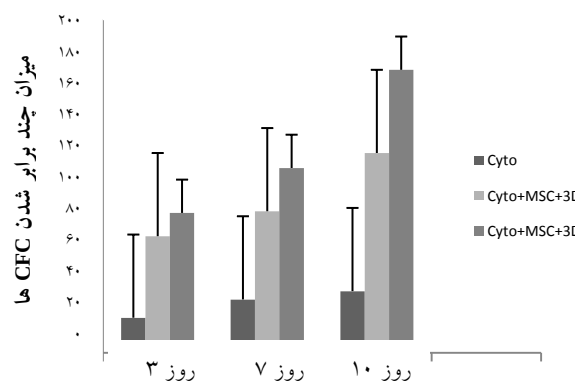


نمودار ۲: تکثیر سلول‌های CD34⁺ در هم‌کشتی با یا بدون

سلول‌های بنیادی مزانشیمی

روز پایانی کشت در محیط اول 8 ± 84 ، در محیط دوم 9 ± 111 و در محیط سوم 14 ± 170 بود.

تعداد کل سلول‌های کلونی‌زا، از حاصل ضرب 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) (نمودار ۳ و شکل ۲).



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

فاکتورهای ناشناخته موجود در پلاسما یا سرم ممکن است به حفظ توانایی تکثیر HPC ها کمک کنند اما خطر احتمال انتقال عوامل پاتوژن و واکنش های آلرژیک نسبت به سرم، تمایل به استفاده از آن ها 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، سلول های UCB-HSC کشت داده شدند که به علت عدم وجود سرم و سایتوکاین، سلول ها تکثیر نگردیدند. لذا در این مطالعه از سایتوکاین ها برای تکثیر و سلول های استرومایی جهت حمایت سلول های خونساز استفاده شد (۱۳). در شرایط سه بعدی، میانگین میزان چند برابر شدن تعداد TNC ها پس از ۱۰ روز کشت، 10 ± 127 برابر شده بود که در مقایسه با دو روش قبل افزایش یافته بود. میانگین میزان چند برابر شدن سلول های $CD34^+$ و سلول های کلونی زا 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 سلول ها در محیط سه بعدی پوشانده شده با MSC نیز افزایش تعداد و درصد سلول های $CD34^+$ و تعداد کل CFC ها 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 سلول های $CD34^+$ مشاهده گردید (۱۴).

نتیجه گیری

نتایج بررسی نشان می دهد که می توان از سلول های مزانشیمی به خصوص در شرایط ۳ بعدی جهت افزایش تعداد سلول های بنیادی خونساز و حفظ پتانسیل کلونی زایی آن ها به طور طولانی مدت در محیط کشت استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون وابسته به سازمان انتقال خون ایران می باشد. بدین وسیله از زحمات پرسنل محترم بخش فلوسیتومتری سازمان انتقال خون ایران قدردانی می شود.

مطالعه انجام شده توسط این گروه، از ۲٪ FBS، پلاسمای مادری با غلظت ۲٪ و ۵٪ HSA (Human Serum Albumin)، جهت جداسازی سلول ها استفاده شد که بیشترین درصد خلوص را پس از جداسازی با 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 EDTA، PBS و آلبومین سرم گاوی استفاده شد.

در کشت سلول ها در محیط دو بعدی بر روی سلول های مزانشیمی، میانگین میزان TNC ها در روز ۱۰ پس از تکثیر، 8 ± 103 برابر شده بود و آنالیز درصد سلول های $CD34^+$ ، نشان دهنده ثبات نسبی میانگین درجه خلوص این سلول ها و ۱۴ برابر شدن تعداد آن ها در روز ۱۰ هم کشتی بود. این نتایج با نتایج به دست آمده از مطالعه زی و همکاران در سال ۲۰۰۶ هم خوانی داشت (۱۲). در این مطالعه از یک سیستم هم کشتی با سلول های مزانشیمی دست کاری ژنتیکی شده که سایتوکاین های Flt3L و TPO ترشح می کردند استفاده گردید.

هم چنین نتایج کلونی سنجی که بر روی ۱۰۰۰ سلول حاصل از تکثیر انجام شد، بیانگر افزایش میانگین تعداد کل CFC ها به اندازه ۱۱۱ برابر پس از ۱۰ روز بود. در مطالعه یو و همکاران در سال ۲۰۰۶، تعداد کل CFC ها پس از ۱۰ روز کشت بر روی مزانشیم در محیط دو بعدی 9 ± 132 برابر شده بود که با نتایج این مطالعه هم خوانی داشت (۸). نتایج به دست آمده در محیط فاقد استروما حاکی از افزایش میانگین میزان چند برابر شدن تعداد TNC ها تا پایان روز ۱۰ در سطحی پایین تر از روش هم کشتی با سلول های استرومایی با میانگین 6 ± 87 برابر شدن بود، که با نتایج مطالعه های زی در سال ۲۰۰۶ مطابقت داشت (۱۲). در این مطالعه از محیط فاقد سرم استفاده شده اما در بعضی از مطالعه ها، 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، می تواند به عنوان یک مسدودکننده تاثیر عوامل بازدارنده موجود در محیط کشت عمل کند، بنابراین می تواند به طور مؤثر ظرفیت تکثیر HPC ها را افزایش دهد (۱۱). سایر

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 Biotechnol* 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, Serrurier 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, Hendriks 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 a 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.

Original Article

Expansion of CD34⁺ umbilical cord blood in 3 dimensional 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

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Tehran 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 flowcytometry, 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 ± 6 , 84 ± 8 , 11 ± 3 , for the second 103 ± 8 , 111 ± 9 , 14 ± 3 , and for the latter 127 ± 10 , 170 ± 14 , 20 ± 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