

اثر داربست «آلوگرافت استخوانی معدنی شده» با پوششی از سلول های استرومال خون بند ناف، بر تکثیر برون تن سلول های بنیادی خونساز $CD34^+$

زهرالسادات هاشمی^۱، مهدی فروزنده مقدم^۲، مسعود سلیمانی^۳، غلامرضا خمیسی پور^۴، مجید مصاحبی محمدی^۵

چکیده

سابقه و هدف

خون بند ناف (UCB) در پیوند مغز استخوان، به علت دوز پایین سلول های $CD34^+$ دارای محدودیت هایی است که می بایست این سلول ها تکثیر شوند. بنابراین هدف از این تحقیق، تکثیر سلول های $CD34^+$ با کمترین دست ورزی می باشد.

مواد و روش ها

در یک مطالعه تجربی، سلول های بنیادی سوماتیک غیر محدود شده (USSC) جفت انسانی جداسازی و از نظر مورفولوژیکی و ایمونولوژیکی شناسایی و تایید شدند. سپس روی داربست آلوگرافت استخوانی معدنی شده (MBA) و نیز کف پلیت، به عنوان لایه مغذی (Feeder) پوشانده شدند. سلول های $CD34^+$ (با روش MACS) از جفت انسانی تخلیص و به مدت سه هفته در شرایط دو و سه بعدی تکثیر شدند. در آخر شمارش سلولی، فلوسیتومتری، سنجش کلنی و نیز آزمایش LTC-IC انجام شد.

یافته ها

پس از سه هفته تکثیر، تعداد سلول های $CD34^+$ UCB در محیط سه بعدی، به $13/2 \pm 250$ رسید. بیشترین کاهش درصد فلوسیتومتری در کشت سه بعدی مشاهده شد و بیشترین تعداد کلنی و LTC-IC در روز ۱۴ حاصل شد.

نتیجه گیری

سلول های USSC به همراه ساختار سه بعدی MBA، با تولید بیشتر سیتوکاین های خونی، ماتریکس خارج سلولی، مولکول های اتصال و نیز با ایجاد برهمکنش های بین سلولی می توانند به عنوان لایه مغذی مناسب به کار روند. این ساختار با افزایش نسبت سطح به حجم، تقلیدی از نیچ مغز استخوان در محیط خارج بدن را فراهم می سازد. این مدل می تواند محیط مناسب و جایگزینی برای تکثیر HSC باشد.

کلمات کلیدی: داربست آلوگرافت استخوانی معدنی شده، سلول های بنیادی خونساز، خون بند ناف، آلوگرافت

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۸

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی - دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

۲- مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی - دانشیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵

۳- PhD هماتولوژی - دانشیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

۴- PhD هماتولوژی - استادیار دانشگاه علوم پزشکی بوشهر - ایران

۵- کارشناس ارشد خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون - دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

مقدمه

در حال حاضر پیوند مغز استخوان (Bone Marrow Transplantation=BMT) یک روش درمانی انتخابی مهم برای بسیاری از بیماری‌های مادرزادی و اکتسابی خونی به حساب می‌آید (۱). این پیوند به دوصورت اتولوگ و آلوژن انجام می‌شود: در پیوند آلوژنیک به صد تا هزار برابر بیش از پیوند اتولوگ، سلول‌های بنیادی خونساز نیاز است (۲). برای انجام BMT، سلول‌های بنیادی یا سلول‌های پیش‌ساز خونی مورد نیاز است. از بین سه منبع مغز استخوان، خون محیطی و خون بند ناف (Umbilical Cord Blood=UCB)، نمونه خون بند ناف منبعی سالم و ایمن از سلول‌های پیش‌ساز خونی (Hematopoietic Progenitor Cells=HPC) می‌باشد. ولی از سویی دیگر تعداد کل سلول‌هایی که از خون بند ناف به دست می‌آید کم بوده و این یک مانع مهم است (۳-۵). برای غلبه بر این مشکل، تکثیر برون تن (ex vivo) سلول‌های UCB-CD34⁺ و سپس تزریق سلول‌های تکثیر شده به بیمار پیشنهاد می‌گردد (۶). برای فراهم ساختن محیطی مشابه در شرایط ex vivo و افزایش نسبت سطح به حجم محیط کشت، داربست‌ها مطرح می‌شوند. در این جا موضوع مورد بحث، کشت سه بعدی سلول‌های بنیادی خونساز است که سعی در تقلید آن‌ها از ریزمحیط (Microenvironment) یا همان نیچ اطراف سلول‌های بنیادی شده است (۷). زیرا سلول‌ها در بدن حالت سه بعدی را تجربه می‌کنند و در اطراف آن‌ها سلول‌های دیگری نیز وجود دارند. این کشت دارای مزایای دیگری می‌باشد: در این نوع کشت مورفولوژی شبیه *in vivo* است. برهمکنش بین سلولی بهتر انجام می‌شود. از لحاظ بیولوژی و عملکرد بسیار شبیه به حالت واقعی است که می‌توان رفتار سلول‌ها را در این نوع کشت ارزیابی و بررسی کرده و آن را به حالت *in vivo* تعمیم داد. به طوری که قدرت خود تکثیری این سلول‌ها برای مدت طولانی در خارج از نیچ نمی‌تواند باقی بماند. نیچ‌ها توانایی کنترل تعداد سلول‌های بنیادی را در بدن دارند و از تکثیر بیش از حد آن‌ها جلوگیری می‌کنند (۸). برهمکنش و موقعیت فضایی بین نیچ و سلول بنیادی منجر به برقراری حالت تعادل خود تکثیری و تمایز و یا حالت سکون و عدم تمایز

می‌شود (۹). در این بین، محیط نیچ برای سلول‌های بنیادی خونی دارای سلول‌های کمکی همراه و مواد زمینه می‌باشد. باید گفت عمل تقسیم و تمایز سلول‌های بنیادی بر روی داربست، وابسته به خواص فیزیکی داربست است. ویژگی‌های داربست‌ها شبیه به ماتریکس خارج سلولی (Extra Cellular Matrix=ECM) می‌باشد که نقش مهمی در سیگنال‌های فیزیکی و شیمیایی تکثیر دارند. داربست‌ها دارای ویژگی‌های برجسته‌ای می‌باشند به طوری که قابل تجزیه و تخریب هستند (Biodegradable). در بحث سلول‌های بنیادی، داربست‌ها روی قدرت چسبندگی، تکثیر و تمایز اثر می‌گذارند و حتی قادر به افزایش سلول‌ها در زیر شرایط ایده‌آل می‌باشند (۱۰). استخوان دارای ماتریکسی پروتئینی است که حضور مواد معدنی در داخل این ماتریکس، برای سختی و استحکام آن ضروری می‌باشد. داربست (Scaffold) پیشنهادی برای سلول‌های خونی و مغز استخوان در حالتی که حاوی مواد معدنی باشد، داربست MBA (Mineralized Bone Allograft) یا داربست "آلوگرافت استخوانی معدنی شده" است به طوری که دارای پایداری مکانیکی و توانایی انتقال سیگنال‌های اختصاصی برای تحریک و تقسیم سلول‌های استخوانی و تولید سلول‌های بنیادی است (۱۱-۱۳). پودرهای منشا گرفته از مغز استخوان، برای پیوند استخوان به کار می‌روند به طوری که خود دارای قدرت تحریک‌کنندگی برای بافت استخوان بوده و دارای پروتئین‌های زمینه‌ای کلاژن و نیز فاکتورهای رشد مثل خانواده TGF می‌باشند (۱۴، ۱۵). ویژگی‌های این داربست شبیه خود بافت استخوان است. ساختار هندسی و توپوگرافی سه بعدی داربست‌های استخوانی در صورت پوشیده شدن با سلول‌های چسبنده پروژنیاتور مزانشیمی یا سلول‌های بنیادی سوماتیک غیر محدود شده (Unrestricted Somatic Stem Cells = USSC) به عنوان لایه مغذی، می‌تواند تا حدودی میکرو محیط سه بعدی مغز استخوان را تقلید کرده و منجر به تزیاد سلول‌های UCB-CD34⁺ از طریق هم‌کشتی با سلول‌های فیدر USSC جفت شود (۱۶، ۱۷). سلول‌های استرومال برای سلول‌های بنیادی خونی به عنوان هم‌کشتی (کوکالچر) مطرح هستند و با افزایش چگالی این سلول‌ها، منطقه

خونی و نیز ناحیه‌ای کوچک برای تولید فاکتورهای رشد (غلظت کانونی از فاکتورهای رشد اتوکراین، پاراکراین و آگزوکراین) به وجود می‌آید (۱۸، ۱۹). زمانی که سلول‌های فیدر مانند کشت دو بعدی از یک طرف به کف پلیت و از طرف دیگر با سلول‌های هدف در تماس باشند، تنها قادر به ترشح فاکتورها در یک سطح هستند. اما زمانی که سلول‌های فیدر به صورت سه بعدی با محیط در تماس باشند، افزایش ترشح فاکتورها را داشته و منجر به افزایش کارایی فیدر می‌شوند. بنابراین داربست متخلخل MBA با ساختار هندسی و توپوگرافی سه بعدی که دارد، در صورت پوشیده شدن با سلول‌های چسبنده استرومال USSC، می‌تواند تا حدودی میکرو محیط سه بعدی مغز استخوان را تقلید کند.

هدف از این تحقیق، افزایش تعداد سلول‌های بنیادی خونساز با کمترین دست‌ورزی ژنتیکی و در شرایط کشت سه بعدی بود. به طوری که افزایش نسبت سطح به حجم لایه مغذی سلول‌های استرومال، افزایش تاثیر سلول‌های استرومال در واحد حجم و تقلید شرایط فیزیکی، سلولی و میکرو محیط بدن برقرار شود و این سلول‌های تزیاید یافته قدرت و پتانسیل تمایزی خود را حفظ کرده باشند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی سلول‌های USSC:

در یک مطالعه تجربی، واحدهای خون بند ناف بر اساس راه کارهای مصوب کمیته اخلاق پزشکی در دانشگاه تربیت مدرس جمع‌آوری شدند. از این افراد برای گرفتن نمونه به منظور تهیه نمونه آماری، رضایت‌نامه گرفته شد. به طور متوسط از ۱۵ واحد خون بند ناف طی ۵ هفته متوالی استفاده شد و در ابتدا با روش معمول فایکول، سلول‌های تک هسته‌ای (Mono Nuclear Cells = MNCs) این واحدهای خون بند ناف جدا شدند. سپس سلول‌های USSC بر اساس دستورالعمل کوگلر و همکارانش تخلیص شدند و بر اساس دستورالعمل موجود نگهداری و پاساژ داده شدند (۲۰-۲۲). به این صورت که سلول‌های تک هسته‌ای حاصل، دو بار با بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) شسته شده و سپس به کمک لام نئوبار و رنگ

تریپان‌بلو شمارش سلولی انجام شد به طوری که از هر نمونه به طور متوسط ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلیون سلول تک هسته‌ای جدا گردید. در این جا درصد زنده بودن (viability) سلول‌ها با شمارش سلول‌های زنده به کل سلول‌ها به دست آمد که بیش از ۹۰ درصد بود. سپس این سلول‌ها به مدت ۲ تا ۴ هفته جهت جداسازی و استخراج سلول‌های USSC در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose) به همراه ۳۰٪ FBS (سرم گاوی جنینی Fetal Bovine Serum) ۷ تا ۱۰ مول دگزامتازون و ۲ میلی‌مول اولتراگلوتامین و در فلاسک‌های T25 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO₂ و رطوبت بالا کشت داده شدند تا رشد کلنی سلول‌های چسبنده USSC آغاز شود. تعویض محیط کشت و بررسی فلاسک از جهت تشکیل کلنی سلول‌های USSC هر هفته یک تا دو بار بسته به رنگ محیط کشت صورت می‌گرفت. بعد از رشد کلنی‌ها و یک بار پاساژ با محیط مشابه، برای پاساژهای بعدی سلول‌ها، از فلاسک‌های بزرگ T75 با همان محیط کشت اختصاصی ولی بدون دگزامتازون استفاده گردید. برای شناسایی و تایید سلول‌های جداسازی شده به عنوان سلول‌های USSC، از ایمونوفنوتایپ تاییدی با روش فلوسیتومتری استفاده شد. مارکرهای سطحی سلول‌های USSC جداسازی شده، بررسی شدند، این سلول‌ها مارکرهای CD166، CD73، CD105، CD90، CD44 و CD133 را بیان می‌کنند (برای این مارکرها مثبت هستند) و برای مارکرهای CD45، CD117، CD34 و V Cadherin منفی می‌باشند. این سلول‌ها مارکر (FLK-1) را نیز کمی بیان می‌کنند (مثبت ضعیف). در این تحقیق آزمایش تشخیصی برای مارکرهای سطحی سلولی براساس مارکرهای پیشنهادی وارنت (Warnet) انجام شد (۲۳).

کشت سلول‌های USSC روی چاهک و داربست MBA:

سلول‌های USSC جدا شده از خون بند ناف پس از انجام آزمایش‌های تاییدی و تشخیصی، روی چاهک‌های ۴۸ تایی به عنوان لایه مغذی و پوشاننده سطح دو بعدی کشت داده شدند. پس از رسیدن به تراکم ۸۰ درصد، این

داد.

هم‌کشتی سلول‌های CD34⁺ با USSC:

در نهایت سلول‌های CD34⁺ با روش معمول فایکول و سپس با استفاده از آنتی‌بادی نشاندار شده با مگنت (آلمان، بیوتک) و ستون‌های LS Separation به روش MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) متعلق به شرکت میلتنی بیوتک، طبق دستورالعمل شرکت سازنده، از خون بند ناف جداسازی شدند. پس از تعیین میزان زنده بودن سلول‌ها، برای تایید از فلوسیتومتری (FACS Fluorescence Activated Cell Sorting) (دستگاه پارتک آلمان)، استفاده شد به طوری که تعداد ۱۰^۵ سلول شمارش و با بافر PBS حاوی ۵ درصد FBS شستشو داده شد. با استفاده از آنتی‌بادی‌های کوئزوگه شده با فلورسین ایزوتیوسیانیات (Fluorescein Isothiocyanate Conjugated = FITC) (cAntibodies) رنگ‌آمیزی ضد CD34⁺ انجام شد.

از آنتی‌بادی FITC-mouse IgG₁ به عنوان ایزوتیپ کنترل برای تضمین اختصاصی بودن واکنش استفاده شد. سلول‌ها در ناحیه‌ای که دارای پراکنش نوری پایین بودند به عنوان Low Side Scatter-Gate تعیین شدند و برای ارزیابی از نرم‌افزار فلومکس استفاده شد.

پس از تایید و تعیین درصد سلول‌های CD34⁺ جداسازی شده، این سلول‌ها به سه حالت کشت داده شدند:

حالت اول: کشت ساده سلول‌های CD34⁺ در ۹ چاهک پلیت ۴۸ تایی بدون فیدر و بدون داربست.

حالت دوم: هم‌کشتی سلول‌های خونساز با فیدر در ۹ چاهک پلیت ۴۸ تایی.

حالت سوم: هم‌کشتی سلول‌های خونساز با فیدر و به همراه داربست در ۹ چاهک پلیت ۴۸ تایی.

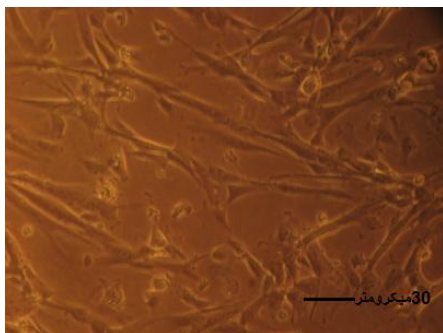
در کلیه این سه حالت از محیط کشت اختصاصی سلول‌های بنیادی خونساز یعنی محیط Stem Span (فرم تجاری آن از شرکت Stem Cell Technologies به نام StemSpan SFEM تهیه شد) به همراه فاکتور رشد سلول بنیادی (Stem Cell Factor = SCF)، ترومبوپویتین (thrombopoietin = TPO)، Flt-3 لیگاند (FMS-like

لایه سلول‌های USSC با میتومایسین C (Mitomycin) به میزان ۱۰ µg/mL جهت هم‌کشتی با سلول‌های خونساز CD34⁺ غیر فعال شدند. به طوری که فعالیت میتوزی لایه پشتیبان متوقف شد. میتومایسین فعالیت آنتی‌بیوتیکی و ضد توموری دارد و با اتصال متقاطع به DNA، از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند (۲۴). برای پوشش دادن این سلول‌های استرومال روی اسلایس‌های داربست MBA به عنوان لایه مغذی و پوشاننده سطح سه بعدی، نیاز به ۳ فلاسک T75 با تراکم ۸۰ درصد است (در مجموع ۳ × ۱۰^۶ سلول به طوری که از هر فلاسک T75 سلول‌های USSC با این تراکم، در حدود یک میلیون سلول به دست می‌آید که برای عمل کوت (پوشاندن سطح با لایه‌ای از سلول‌ها) روی داربست نیاز به سه میلیون سلول می‌باشد). قبل از عمل کاشت سلولی، داربست‌ها باید برای اتصال سلول‌ها مستعد شده و منافذ آن‌ها باز شوند. بدین منظور به مدت ۲۴ ساعت اسلایس‌های داربست در ژلاتین ۰/۱ درصد در بافر PBS غوطه‌ور گشته و انکوبه شدند. پس از این مدت اسلایس‌های داربست به مکعب‌هایی با قطر ۶ تا ۸ میلی‌متر برش داده شدند. این مکعب‌ها در پلیت ۶ خانه و به صورت یک ردیف و تا حد امکان فشرده، چیده شدند. سپس به روی این قطعات، سوسپانسیون غلیظ سلولی اضافه شد و به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شدند. این سوسپانسیون سلولی در محیط DMEM و با سرم ۳۰ درصد بود. سپس هر قطعه داربست به آرامی به یک چاهک پلیت ۴۸ تایی منتقل شده و به مدت سه روز انکوبه شدند تا تراکم ۸۰ درصد به دست آید. در این مدت سلول‌های چسبنده دوکی شکل USSC اتصالات خود را با یکدیگر و با داربست محکم کرده و روی محلی که جایگیری کرده‌اند پهن و باز می‌شوند. بعد از رسیدن به این مرحله، برش‌هایی از داربست برای انجام عکس برداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscope) برداشته (در دانشکده الکترونیک دانشگاه تهران آزمایشگاه لایه نازک) و بقیه با میتومایسین C غیر فعال شدند. غیر فعال‌سازی با کمک اشعه گاما نیز انجام می‌شود ولی در این جا اسلایس‌های داربست MBA دارای تخلخل هستند و نمی‌توان به طور کامل تمام نقاط را تحت پوشش اشعه قرار

میانگین $\pm$ انحراف معیار ارایه شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از عکسبرداری SEM از سطح داربست MBA: پس از ۲ هفته کشت در محیط اختصاصی، کلنی‌های اولیه USSC جدا شده از خون بند ناف تشکیل گردید (شکل ۱). این سلول‌ها در ابتدا کشیده و پهن بودند و در پاساژهای بعدی، دوکی شکل و کشیده‌تر شدند. آزمایش ایمونوفنوتایپ تاییدی با روش فلوسیتومتری بر روی سلول‌های جداسازی شده انجام شد که نشان داد سلول‌ها برای مارکرهای CD73، CD105 و CD44 مثبت بوده و برای KDR بیان کمی دارند (نمودار ۱).

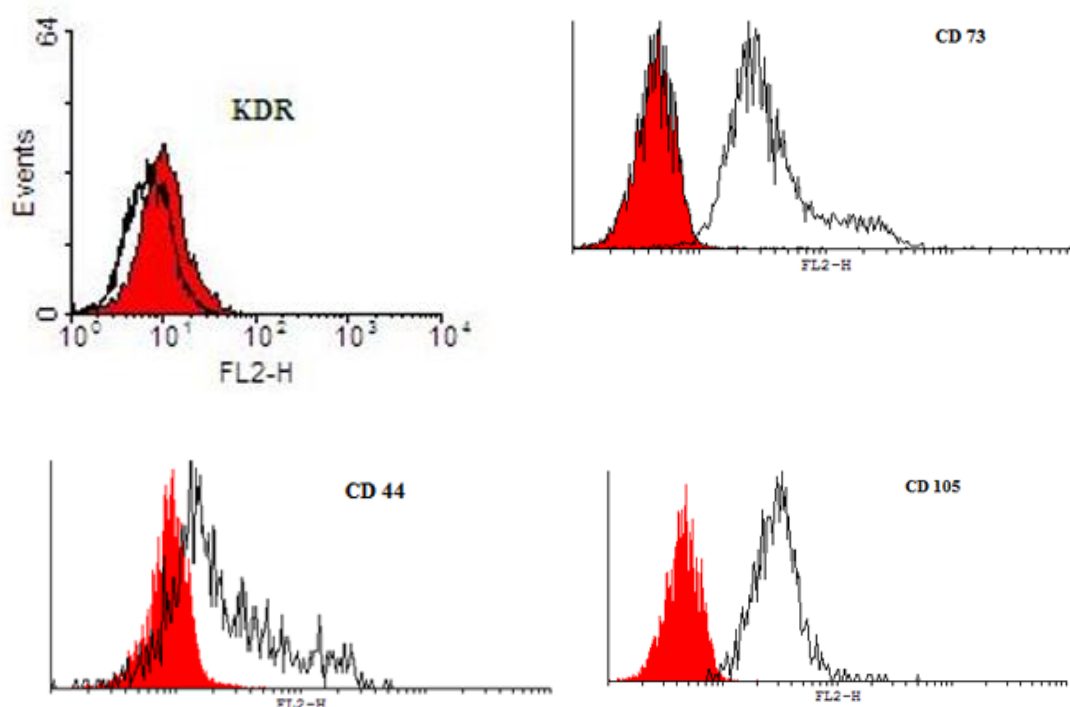


شکل ۱: کلنی‌های اولیه USSC پس از دو هفته کشت در محیط اختصاصی. این سلول‌ها در ابتدا کشیده و پهن می‌باشند و در پاساژهای بعدی، دوکی شکل و کشیده‌تر می‌شوند.

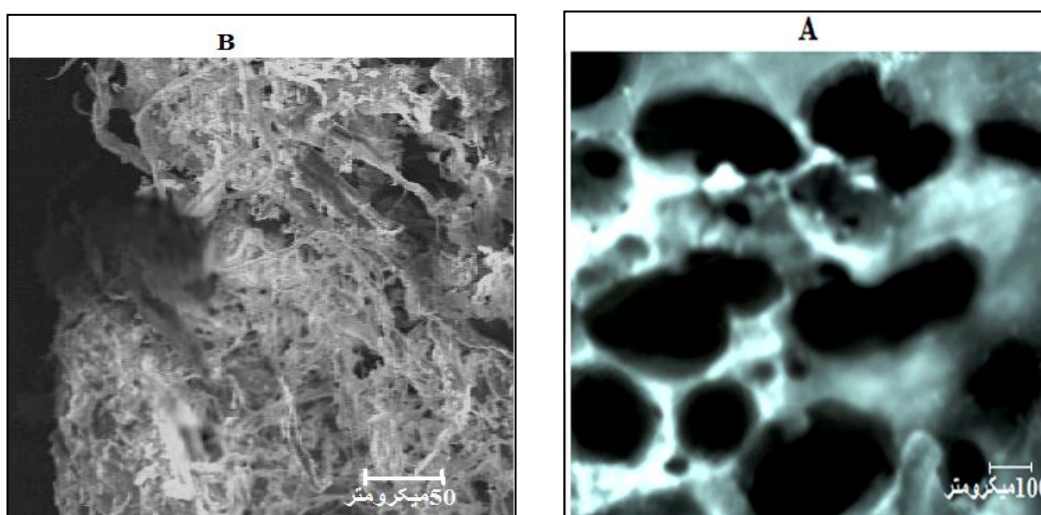
تصویر سطح داربست MBA با کمک میکروسکوپ SEM، نشان از تخلخلی در حدود ۴۰٪ برای این داربست دارد (شکل ۲).

به طوری که در سطح داربست منافذ بسیار کوچکی مشاهده می‌شود که در زیر میکروسکوپ این منافذ تیره رنگ می‌باشند. زمانی که داربست MBA با سلول‌های USSC پوشش داده شده است، این سطوح با سلول‌های کشیده و دوکی شکل USSC پوشیده شده و سطح خالی داربست کمتر مشخص می‌شود. البته این سلول‌ها کمتر به داخل حفرات وارد شده و بیشتر روی قسمت‌های خارجی این منافذ قرار گرفته‌اند. اندازه این سلول‌ها در حدود ۱۰۰ میکرومتر می‌باشد و با بزرگ‌نمایی بیشتر می‌توان

(tyrosine kinase 3-ligand)، هر یک به میزان ۵۰ ng/mL استفاده شد. به هر چاهک از این سه حالت، 10^3 سلول خونساز $CD34^+$ (روز صفر) اضافه شد. برای هر حالت، سلول‌های این ۹ چاهک طی سه هفته و هر هفته به صورت سه بار تکرار شمارش شدند تا میزان تکثیر در این حالات مقایسه شود. در حالت اول که سلول‌ها بدون فیدر بودند، به آرامی سلول‌های $CD34^+$ معلق از خانه‌های مربوطه جمع‌آوری و در حجم ۱ mL و با کمک رنگ تریپان بلو و لام نئوبار شمارش شدند. برای حالت دوم و سوم که فیدری از سلول‌های USSC موجود بود، احتمال ادغام سلول‌های فیدر با سلول‌های خونساز وجود دارد به طوری که در شمارش سلولی خطا ایجاد می‌کنند. برای جلوگیری از این خطا ابتدا با کمک پیتاژ سلول‌های خونساز متصل به فیدر به آرامی جدا شده و در فالتون mL ۱۵ جمع‌آوری شدند و سپس برای مابقی سلول‌هایی که کمی محکم‌تر به فیدر متصل شده بودند، آسپیراسیون شدیدتری اعمال شد. در نهایت کلیه سلول‌های $CD34^+$ جمع‌آوری شد. سپس این مخلوط سلولی (سلول‌های $CD34^+$ و فیدر) که اکنون به صورت معلق در فالتون قرار دارند، به یک پلیت ژلاتینه شده (پوشیده شده با ژلاتین ۰/۲ درصد) منتقل شده و پس از ۶ ساعت انکوبه شدن، سلول‌های معلق $CD34^+$ از محیط جمع‌آوری و شمارش شدند. این انکوباسیون ۶ ساعت منجر به چسبیدن مجدد سلول‌های فیدر و معلق باقی ماندن سلول‌های $CD34^+$ می‌شود. گروهی از این سلول‌های تزیاید یافته برای بررسی مارکر سطحی $CD34^+$ (انجام فلوسیتومتری) استفاده شدند و گروهی دیگر برای بررسی کلنی‌زایی با استفاده از محیط Methocult (فرم تجاری آن Methocult Enriched Stem Cell H4435) و دستورالعمل شرکت سازنده (Stem Cell Technologies) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در نهایت گروه آخر با کمک محیط Myelocult (فرم تجاری H ۵۱۰۰) و دستورالعمل شرکت سازنده (Stem Cell Technologies) برای انجام آزمایش LTC-IC به کار برده شدند (۲۷-۲۵). در این تحقیق از آزمون آماری Student's T-Test و با کمک نرم‌افزار SPSS برای محاسبه p-value استفاده شد و $p < 0/05$ معنادار تلقی گردید. در نهایت داده‌ها به صورت



نمودار ۱: ایمونوفنوتیپ سلول‌های USSC، نمودار کنترل منفی و نمودار آزمون مورد بررسی از طریق نرم‌افزار در کنار یکدیگر آمده است. این سلول‌ها نسبت به CD73، CD44 و CD105 مثبت و نسبت به KDR (FLK-1) بیان مثبت ضعیف دارند.



شکل ۲: عکسبرداری SEM از سطح داربست MBA. A: تصویر سطح داربست MBA با کمک میکروسکوپ SEM بدون سلول‌های فیدر به عنوان کنترل. B: تصویر سطح داربست MBA زمانی که با سلول‌های USSC پوشش داده شده است. با اندازه اشاره شده در زیر شکل می‌توان سلول‌های USSC را به طور مجزا مشاهده کرد حال آن که در تصویر A سلولی مشاهده نمی‌شود و سطح داربست تیره می‌باشد.

۲۵۰ برابر روز صفر است که نسبت به حالت کشت دو بعدی که ۱۳۷ برابر روز صفر شده است، تقریباً $1/82$ برابر است. این حالت در کشت دو بعدی ولی با فیدر به ۲۰۳ برابر رسیده است که در مقایسه با حالت دو بعدی ساده، تقریباً $1/4$ برابر می‌باشد (شکل ۳). برای هر هفته تزاید، p -value در حالات کشت روی فیدر و کشت در شرایط سه بعدی نسبت به کشت دو بعدی ساده، محاسبه شده و معنادار بودن آن به دست آمد (نمودار ۲).

نتایج فلوسیتومتری:

درصد بیان مارکر CD34، در روز اول ۹۱ درصد بود و درصد زنده بودن سلول‌ها در حدود ۹۵ درصد تعیین شد (نمودار ۳).

هر سلول را به طور مجزا مشاهده کرد حال آن که سطح داربست با همان بزرگ‌نمایی تیره بوده و این نوارهای روشن سلولی مشاهده نمی‌شوند.

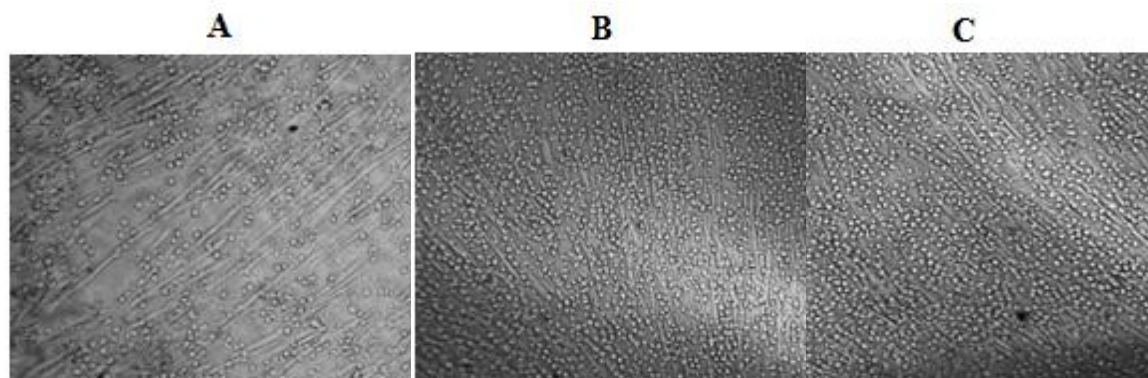
نتایج حاصل از شمارش سلول‌های $CD34^+$:

سلول‌های $CD34^+$ معلق و کروی هستند و در محیط کشت به صورت شناور می‌باشند. این سلول‌ها طی سه هفته و با سه بار تکرار شمارش شده و میزان تزاید سلول‌ها نسبت به روز صفر بیان شده است (جدول ۱).

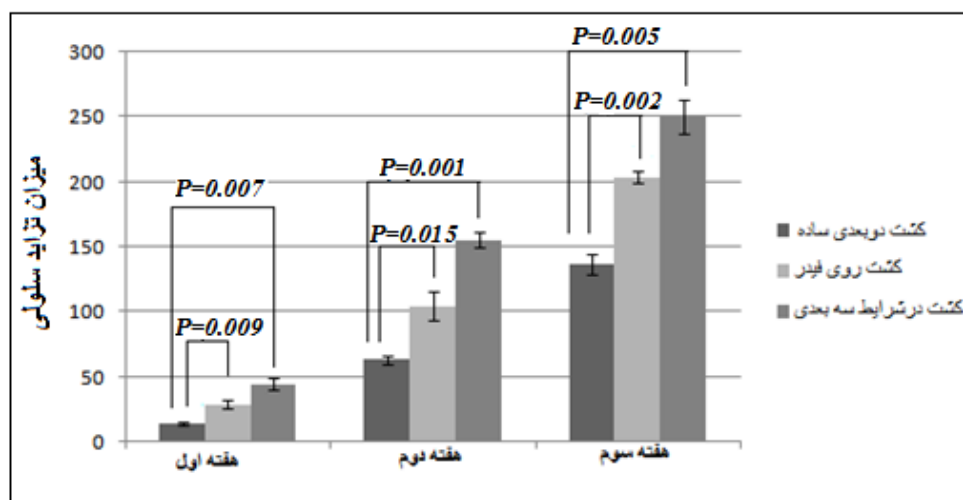
در هم کشتی سلول‌های $CD34^+$ و سلول‌های فیدر USSC، تکثیر بیش از حد سلول‌های $CD34^+$ قابل مشاهده است که نشان از تاثیر سلول‌های فیدر بر روی تزاید سلولی دارد. در حالت سه بعدی، افزایش تعداد این سلول‌ها تا

جدول ۱: شمارش سلول‌های $CD34^+$ در طی سه هفته تکثیر

حالت	زمان	روز صفر	هفته اول (تزاید سلولی)	هفته دوم (تزاید سلولی)	هفته سوم (تزاید سلولی)
کشت دو بعدی ساده		۱۰ ^۳ سلول	13800 ± 1600 ($13/8 \pm 1/6$)	63400 ± 3200 ($63/4 \pm 3/2$)	136900 ± 8000 ($136/9 \pm 8$)
کشت روی فیدر		۱۰ ^۳ سلول	28700 ± 3400 ($28/7 \pm 3/4$)	104300 ± 11000 ($104/3 \pm 11$)	203600 ± 4600 ($203/6 \pm 4/6$)
کشت در شرایط سه بعدی		۱۰ ^۳ سلول	44800 ± 4100 ($44/8 \pm 4/1$)	155500 ± 5800 ($155/5 \pm 5/8$)	250000 ± 13200 ($250 \pm 13/2$)



شکل ۳: تصویری از پلیت هم کشتی $CD34^+$ و USSC. A: در هفته اول. B و C: در هفته دوم. در این تصاویر سلول‌های USSC به صورت دوکی شکل و کشیده، در قسمت بستر پلیت کشت قابل مشاهده‌اند این سلول‌ها چسبنده می‌باشند حال آن که سلول‌های خون ساز $CD34^+$ معلق و کروی بوده و در بین سلول‌های چسبنده USSC به دام افتاده‌اند. با گذشت زمان تاثیر مثبت سلول‌های USSC بر روی تکثیر بیش از حد سلول‌های $CD34^+$ قابل مشاهده است.



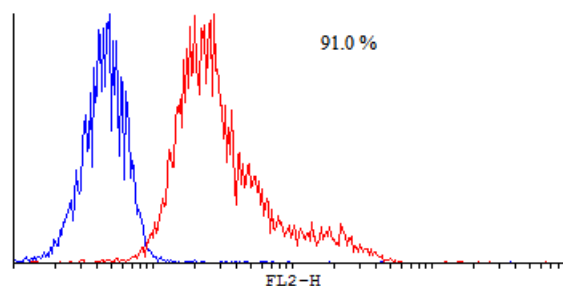
نمودار ۲: نمودار ستونی از تزايد سلول‌های CD34⁺ طی سه هفته

کلونی دارد. این کلنی‌ها تحت عناوین: BFU-E / CFU-E (Burst Forming Unit- Erythroid) کلنی‌های قرمز آجری و گرد که سلول‌ها در حاشیه قابل تشخیص نمی‌باشند، CFU-GM (Colony Forming Unit- Granulocyte/ Macrophage) کلنی‌های بازتر و غیر متراکم‌تر که ساختمان ستاره‌ای شکل دارند، CFU-M (Colony Forming Unit- Macrophage) و نیز CFU-GEMM (Colony Forming Unit- Granulocyte/ Erythroid/ CFC-C Macrophage)، طبقه‌بندی شده‌اند. در مجموع (Colony Forming Cell- Count) برای هر ۱۰۰۰ سلول به دست آمد (جدول ۲). در کشت دو بعدی ساده با گذشت زمان تعداد کلنی‌ها نیز کاهش یافتند که نشان از کاهش سلول‌های بنیادی در محیط کشت دارد. در حالت هم کشتی با سلول‌های فیدر نه تنها کاهش مشاهده نشد بلکه افزایش نیز مشاهده گشت به طوری که بیشترین تعداد کلنی در هفته دوم دیده شد، ولی در هفته سوم این تعداد کاهش یافت. P-value در هر هفته نسبت به کشت دو بعدی ساده بر حسب رابطه T Test محاسبه شد که نشان از معنادار بودن آن داشت (نمودار ۵).

نتایج حاصل از LTC-IC:

در میکرو محیط طبیعی بدن، سلول‌های پیش‌ساز خونساز قادر به تمایز نیز می‌باشند بنابراین میکرو محیط سلول

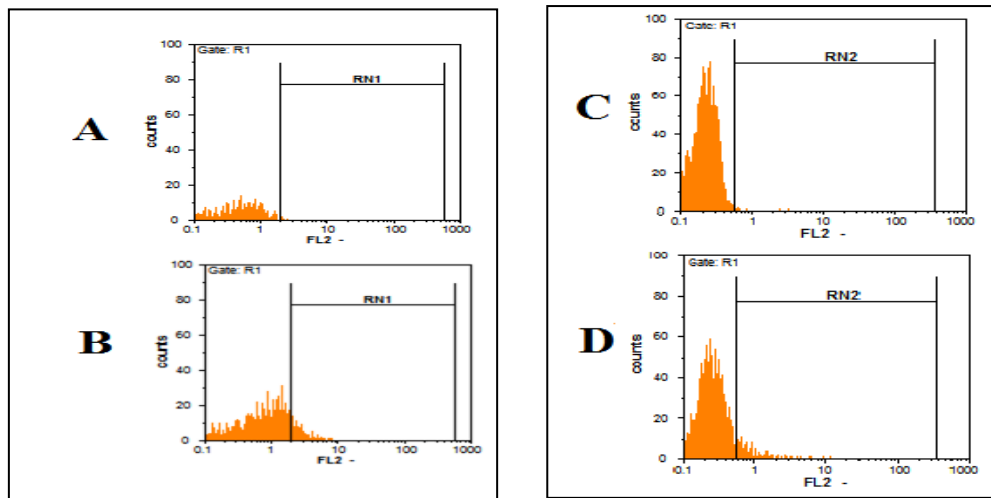
کاهش بیان CD34 پس از سه هفته دیده شد به طوری که بیان در حالت سه بعدی به میزان ۷/۶ درصد و در حالت کشت ساده به ۱۰/۵ درصد افت کرده بود (نمودار ۴).



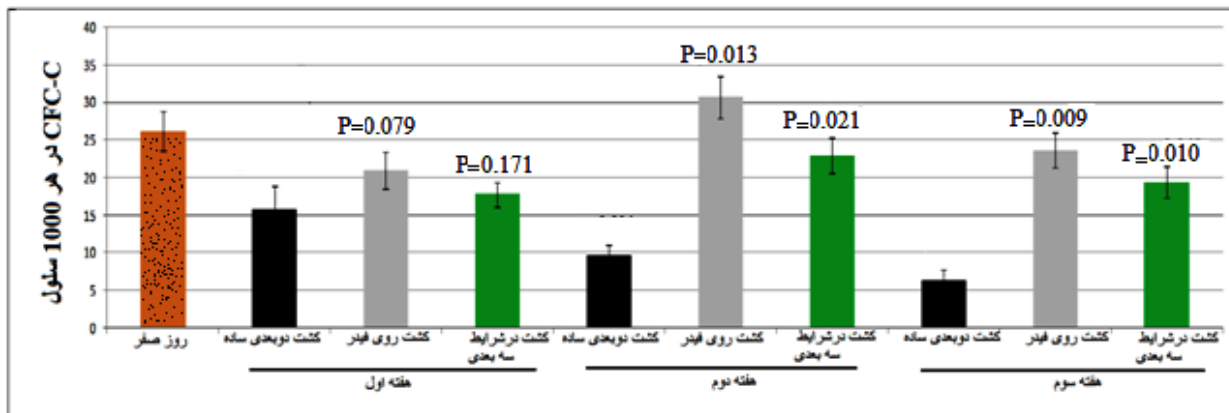
نمودار ۳: نمودار فلوسیتومتری HSCs از نظر میزان بیان مارکر CD34 در روز صفر

نتایج حاصل از Colony Assay:

سنجش کلنی برای بررسی خصوصیات عملی سلول‌های تزايد یافته انجام می‌شود به طوری که این تزايد، منجر به کاهش قدرت تمایزی نشده باشد. در این آزمایش توانایی کلونی‌زایی سلول‌های خونساز مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. تعداد کلونی بیشتر، نشان از وجود تعداد بیشتری سلول‌های تمایز نیافته و قادر به تشکیل



نمودار ۴: نمودار فلوسیتومتری HSCs از نظر میزان بیان مارکر CD34 پس از سه هفته تزیاید. A: نمودار مربوط به سلول‌های CD34⁺ تزیاید یافته در حالت کشت روی فیدر در حالی که با آنتی‌بادی مونوکلونال موشی به عنوان یک ایزوتیپ کنترل منفی کونزوگه شدند. B: نمودار فلوسیتومتری HSCs تزیاید یافته روی فیدر از نظر میزان بیان مارکر CD34 در سطح آن‌ها که ۱۰/۵ درصد می‌باشد. C: نمودار مربوط به سلول‌های CD34⁺ تزیاید یافته در حالت کشت سه بعدی در حالی که با آنتی‌بادی مونوکلونال موشی به عنوان یک ایزوتیپ کنترل منفی کونزوگه شدند. D: نمودار فلوسیتومتری HSCs تزیاید یافته در حالت کشت سه بعدی، از نظر میزان بیان مارکر CD34 در سطح آن‌ها که ۷/۶ درصد می‌باشد.



نمودار ۵: نتایج آزمون کلنی‌زایی در حالت‌های مختلف

تفاوت معناداری با کشت دو بعدی ساده در هفته اول مشاهده نشد که نشان از حفظ و نگهداری سلول‌های اولیه در کنار سلول‌های استرومایی نسبت به کشت ساده دارد. در هفته دوم، فراوانی کلنی‌ها بسیار افزایش یافت به طوری که به ۱ کلنی در هر ۳۱۲۵ سلول رسید. این حالت نشان از اثر سلول‌های فیدر بر حفظ و تکثیر سلول‌های اولیه دارد حال آن‌که در کشت ساده به ازای هر ۱۲۸۴۰ سلول، تنها ۱ کلنی مشاهده شد. یعنی در هفته دوم در اثر هم‌کشتی با سلول‌های استرومال، سلول‌های بنیادی

بنیادی از رشد و تمایز حمایت می‌کند. در این آزمایش، با بررسی تمایز و تشکیل کلونی‌های مختلف می‌توان به وجود سلول‌های اولیه پی برد. بنابراین برای سنجش عمل و شبیه‌سازی عملکرد آن‌ها در داخل بدن، از آزمایش LTC-IC استفاده می‌شود. در ابتدا سلول‌های تازه جداسازی شده برای این سنجش بررسی شدند که به ازای هر ۶۳۷۲ سلول، ۱ کلنی مشاهده شد. پس از یک هفته کشت، تعداد کلنی کاهش یافته و به ازای هر ۹۶۳۴ سلول ۱ کلنی مشاهده شد. در کشت روی فیدر و نیز کشت سه بعدی

خونساز به ۱/۶۱ برابر رسیده‌اند. ولی نتیجه آزمایش LTC-IC در پایان هفته سوم بسیار متفاوت بود به طوری که در شرایط هم کشتی با سلول‌های USSC، تعداد کلنی‌ها به عدد ۱ در هر ۹۶۵۰ سلول رسید و در کشت ساده نیز روند کاهش ادامه داشته و به ۱ کلنی در هر ۲۰۴۷۸ سلول تقلیل یافت.

جدول ۲: تعداد کلونی‌های حاصل از هزار سلول CD34⁺ در حالات و زمان‌های مختلف

CFC در هر ۱۰۰۰ سلول	
روز صفر	۲۶/۲ ± ۲/۵
هفته اول	
کشت دو بعدی ساده	۱۵/۸ ± ۳/۱
کشت روی فیدر	۲۰/۹ ± ۲/۴
کشت در شرایط سه بعدی	۱۷/۸ ± ۱/۶
هفته دوم	
کشت دو بعدی ساده	۹/۶ ± ۱/۳
کشت روی فیدر	۳۰/۷ ± ۲/۸
کشت در شرایط سه بعدی	۲۲/۹ ± ۲/۳
هفته سوم	
کشت دو بعدی ساده	۶/۵ ± ۱/۲
کشت روی فیدر	۲۳/۶ ± ۲/۳
کشت در شرایط سه بعدی	۱۹/۴ ± ۲/۱

بحث

تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز، کاربردهای بسیاری دارد از جمله در استفاده بالینی سلول‌های خونساز نابالغ CD34⁺، نیاز به افزایش تعداد این سلول‌هاست. برای مثال در اثر شیمی درمانی یا اشعه درمانی، سلول‌ها دچار آسیب می‌شوند و نیاز به تجدید آن‌ها می‌باشد. در این شرایط کشت سلولی یک روش کمک‌کننده است. در پیوندهای چندگانه که به دلیل رد پیوند انجام می‌شوند، نیاز به تزاید سلول‌های بنیادی است. کشت و تزاید سلول‌های CD34⁺ باعث ورود این سلول‌ها به فاز تقسیم سلولی می‌شود به طوری که برای ژن درمانی و انتقال ژن ویروسی نیاز به سلولی در فاز تقسیم است.

به منظور بهتر شدن کارایی کشت سلول و بافت در مهندسی بافت، نیاز به خلق شرایط سه بعدی بدن (*in vivo*) در حالت خارج بدن (*ex vivo*) است. برای این منظور، سلول‌های بافت مورد نظر بر روی داربست‌ها کشت داده می‌شوند (۲۸-۳۲). روند پیشرفت در زمینه استفاده از داربست‌ها در پیوند عضو، به سرعت رو به افزایش است و برای بهبود آن از مواد و ساختارهایی شبیه به بافت هدف استفاده می‌کنند. به طوری که مهندسی بافت توانایی بالقوه برای ساخت عضو و بافت دارد. برای این منظور نیاز به شبیه‌سازی محیط داخل بدن است که از کشت هم زمان سلول‌های هدف و سلول‌های استرومایی استفاده شده است. داربست‌های مطرح برای پیوند و ترمیم مغز استخوان و غضروف؛ MBA و DBM (Demineralized Bone Matrix) هستند (۳۳-۳۷، ۱۵). مغز استخوان از دو بخش پروتئینی و معدنی تشکیل شده است که بخش معدنی برای استحکام، مقاومت مکانیکی و گرانشی لازم است. در داربست DBM، بخش معدنی آن با استخراج اسیدی حذف شده است ولی در MBA، کلیه مواد معدنی موجود هستند که در این حالت شبیه‌سازی به خود بافت مغز استخوان بیشتر است. حالت سه بعدی سلول‌های بنیادی در بدن منوط به شبیه‌سازی میکرو محیط یا همان نیچ اطراف سلول‌های بنیادی شده است. تکثیر *ex vivo* سلول‌های بنیادی همراه با دستکاری ژنتیکی باید به گونه‌ای باشد که موجب تکثیر افسار گسیخته آن‌ها نشده و با حفظ حالت تمایز نیافته در این سلول‌ها، تعداد آن‌ها را طی فاز تکثیر زیاد کند.

نتایج شمارش سلولی نشان داد که در حالت سه بعدی افزایش تعداد سلول‌ها نسبت به حالت کشت دو بعدی ۱/۸۲ برابر و برای کشت دو بعدی ولی با فیدر، ۱/۴ برابر می‌باشد. بنابراین این افزایش تعداد در حالت سه بعدی نشان از اثر کشت سه بعدی در تکثیر سلول‌های بنیادی دارد. نتایج فلوسیتومتری حاکی از کاهش بیشتر درصد سلول‌های CD34⁺ در کشت سه بعدی است. باید گفت در حالت سه بعدی تمایز رده‌ای در سلول‌های CD34⁺ بیشتر بوده است زیرا این حالت، به دلیل تراکم بیشتر سلول‌های USSC در محیط اطراف سلول‌های CD34⁺ است. این

کلنی به ازای هر ۱۰۰۰ سلول در حالت کشت روی فیدر بیشتر بود اما باید توجه داشت که در حالت سه بعدی، تعداد بیشتری تقسیم سلولی (تزاید ۲۵۰ برابر در مقابل ۲۰۳/۶ برابر) انجام شده است که با این تعداد سلول‌ها، تعداد بیشتری کلنی حاصل شده و این تعداد زیاد کاملاً قابل مشاهده بود. کاهش تعداد LTC-IC در هفته سوم نیز نشان می‌دهد که سلول‌های بستر تنها در دو هفته قادر به حفظ سلول‌های بنیادی اولیه هستند و پس از آن فراوانی کلنی‌ها کاهش خواهد یافت (۲۷).

با فاکتورهای رشد نیز می‌توان محیطی مشابه برای تکثیر فراهم ساخت (۴۰). پس از آن از هم زمانی لایه مغذی و فاکتورهای رشد با کمک سلول‌های موش SCID/NOD (Non Obese Diabetic / Severe Combined Immuno Deficiency) استفاده شد (۴۱). باز هم دیده شد که در طولانی مدت محیط مذکور نمی‌تواند جوابگوی تزاید سلولی باشد و نشان دادند که سلول‌های بنیادی حساس به میکرو محیط خود هستند (۴۲). در این جا داربست متخلخل تتالوم تنها بعد از یک هفته، تزاید ۱/۵ برابر نسبت به کشت دو بعدی را منجر شد (۴۳). در این راستا از ماتریکس‌های مهندسی شده و سایر مواد پلیمری و نانومری استفاده شد (۴۴-۴۹). بررسی نتایج فوق برای تکثیر و یا برای تمایز سلول‌های بنیادی انجام شده است (۵۰-۵۳). نتیجه این تزاید برای BMT و یا سایر پیوندهای خونی کاربرد داشت و یا حتی بدون ورود به مرحله بالینی، از ساختارهای بیولوژیکی و یا سنتزی برای تکثیر سلول‌های بنیادی استفاده شد (۵۴-۶۰). در تحقیق تان و همکاران (۲۰۱۱)، از ساختار سه بعدی منشا گرفته از بافت استخوان برای تزاید سلول‌های بنیادی استفاده شده است که به تزاید ۷/۵ برابر رسیده است (۶۱). اما در این ساختار فیدری، در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار رفته و هم چنین روی ساختار داربست توضیحی ارائه نشده است به طوری که مشخص نیست اهمیت اصلی این داربست به دلیل حضور چه موادی است و یا در تحقیقی دیگر از ماتریکس غیر معدنی شده استخوان به عنوان داربست استفاده شده است. با مقایسه کلی تحقیقات گذشته، به بررسی کاربرد و اثر هم زمان داربست معدنی شده همراه با

سلول‌های فیدر به همراه سلول‌های CD34⁺ با ترشح فاکتور IL-1b منجر به افزایش تولید و ترشح فاکتور G-CSF از سلول‌های USSC می‌شوند که این فاکتور به تمایز شدیدتر سلول‌ها کمک می‌کند. در این تراکم بالای سلولی، سطح بالایی از فاکتورهای تمایزی مربوط به رده میلویدی از جمله SCF، IL-11، IL-6، M-SCF و GM-SCF را خواهیم داشت (۳۸). باید در نظر داشت که کاهش مارکر سلولی در مقایسه با افزایش تعداد و رسیدن به این میزان تزاید سلولی در کشت سه بعدی، قابل چشم پوشی است به طوری که سلول‌ها ۲۵۰ برابر روز صفر شدند. در این تکثیر و تزاید، خواه ناخواه سلول‌ها به سمت تمایز نیز می‌روند حتی در حالت کشت دو بعدی ساده که روند طبیعی سلول‌های پروژنیاتور است ولی پس از سه هفته تزاید، در حالت کشت سه بعدی تعداد سلول‌های تمایز نیافته و پروژنیاتور CD34⁺ در جمعیت سلولی حاصل بیش از کشت دو بعدی ساده می‌باشد (۳۹). استفاده از فیدر به نگهداری سلول‌ها در فاز تکثیر نه تمایز کمک می‌کند. نتایج سنجش کلنی نشان از کاهش تعداد کلنی در هر سه حالت کشت داشت که این افت شدید از روز صفر تا هفته اول به دلیل از بین رفتن سلول‌های جوان اولیه در محیط می‌باشد که طی چند روز یا حتی چند ساعت تمایز می‌یابند و بنابراین خون تازه دارای سلول‌های جنینی و تمایز نیافته‌تر است. در روز صفر تعداد سلول‌های بنیادی بیشترین حد است که بیشترین تعداد کلنی حاصل شده است ولی بررسی اثر محیط به کار رفته در این تحقیق از هفته اول تزاید انجام می‌شود به این صورت که پس از یک هفته تزاید، کاهش در تعداد کلنی در کشت دو بعدی ساده بیشتر بوده و به ۳/۱ ± ۱۵/۸ رسیده است که نشان از کاهش سلول‌های بنیادی در محیط کشت دارد. این روند کاهش هم چنان تا هفته سوم ادامه دارد ولی در کشت روی فیدر و کشت سه بعدی، در هفته دوم بیشتر از هفته اول دیده شده است. این افزایش نشان از تکثیر و افزایش سلول‌های بنیادی دارد به طوری که خاصیت بنیادی (stemness) خود را همواره حفظ می‌کنند. در هفته سوم این تعداد باز هم کاهش یافته است و این کاهش نشان از اثر سلول‌های فیدر تا دو هفته پس از هم کشتی دارد. تعداد

بستری از سلول‌های فیدر USSC بر تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز می‌رسیم (۳۷-۳۳، ۱۵). قدرت خود تکثیری سلول‌های بنیادی برای مدت طولانی در خارج از نیچ نمی‌تواند باقی بماند. نیچ‌ها توانایی کنترل تعداد سلول‌های بنیادی را در بدن دارند و از تکثیر بیش از حد آنان جلوگیری می‌کنند. محیط نیچ برای سلول‌های بنیادی خونی دارای سلول‌های کمکی همراه و مواد زمینه می‌باشد. این ماده زمینه یا ماتریکس خارج سلولی دارای پروتئین‌هایی مثل فیبرونکتین، کلاژن و ژلاتین است. سلول‌های کمکی برای این شبیه‌سازی سلول‌های استرومایی خون بند ناف به نام سلول‌های بنیادی سوماتیک غیر محدود شده (USSC) مطرح شدند. به تازگی به ارزش این سلول‌ها برای فیدر پی برده‌اند به طوری که با ویژگی‌های برجسته آن‌ها مانند داشتن تلومراز بلند، قدرت تکثیر و تمایزی بالا و نیز توانایی بالا در تولید فاکتورها و مواد اگزوکراین و پاراکراین، راه به سمت استفاده بالینی از این سلول‌ها مطرح است. تنها منشا آن‌ها نیز خون بند ناف انسانی و سلول‌های اجدادی مزانشیمی هستند.

نتیجه‌گیری

برای کشت سلول‌های بنیادی خونی از هم‌کشتی این سلول‌ها با سلول‌های استرومال استفاده می‌شود که با افزایش چگالی سلول‌های بنیادی، منطقه خونی به وجود می‌آید. این سلول‌ها به عنوان ماتریکسی برای ساپورت رشد و تولید سلول‌های HSCs استفاده شدند. تولید

ماتریکس خارج سلولی، سیتوکاین‌های خونساز، مولکول‌های اتصال و نیز برهمکنش بین سلولی در این منطقه افزایش می‌یابد. در حالت سه بعدی ترشح فاکتورهای کانونی افزایش یافته و در این حالت اثر همورال بیش از تماس مستقیم است. این تحقیق نشان داد که تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز روی داربستی با محتوای معدنی می‌تواند تا ۲۵۰ برابر افزایش یابد و این تزیاید با کمترین دست‌ورزی ژنتیکی انجام می‌شود. راه‌های مختلفی برای این تزیاید مطرح است حال آن که برای کم کردن خطر پس زدن پیوند باید به فکر کمترین تغییر در روش‌های مهندسی ژنتیک باشیم تا برای فرد گیرنده نیز ایمن باشد. زیرا برای مثال درکشت دو بعدی دکستر با خونسازی غیرطبیعی مواجه هستیم و یا حتی تکثیر بی‌رویه می‌تواند منجر به آنیوپلوئید و سرطانی شدن شود. بنابراین نیاز به خلق شرایط بدن در خارج بدن است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل طرح تحقیقاتی مصوب در کمیته تحقیقات دانشجویی / انجمن علمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بوده و بخشی از آن با حمایت مالی این کمیته انجام شده است. نویسندگان از خانم حفیظی (مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته) و آقای دکتر توکلی (مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی ایران) به دلیل همکاری صمیمانه در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References :

- 1- Bordignon C. Stem-cell therapies for blood diseases. *Nature* 2006; 441(7097): 1100-2.
- 2- Emerson SG. *Ex vivo* expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics. *Blood* 1996; 87(8): 3082-8.
- 3- Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2000; 18(6): 1360-77.
- 4- To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997; 89(7): 2233-58.
- 5- Gao L, Chen X, Zhang X, Liu Y, Kong P, Peng X, *et al.* Human umbilical cord blood-derived stromal cell, a new resource of feeder layer to expand human umbilical cord blood CD34⁺ cells *in vitro*. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36(2): 322-8.
- 6- Hai-Jiang W, Xin-Na D, Hui-Jun D. Expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *A J Hematol* 2008; 83(12): 922-6.
- 7- Kobel S, Lutolf M. High-throughput methods to define complex stem cell niches. *Biotechniques* 2010; 48(4): ix-xxii.
- 8- Terskikh VV, Vasil'ev AV, Voroteliak EA. Stem cell niches. *Izv Akad Nauk Ser Biol* 2007; (3): 261-72. [Article in Russian]
- 9- Song Y, Song G. Stem cell niche and its roles in proliferation and differentiation of stem cells. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2009; 26(1): 195-

- 8.[Article in Chinese]
- 10- Dutta RC, Dutta AK. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnol Adv* 2009; 27(4): 334-9.
- 11- Bancroft GN, Sikavitsas VI, Van den Dolder J, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, *et al.* Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(20): 12600-5.
- 12- Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ. Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res* 2004; 83(3): 204-10.
- 13- Moroni L, Hamann D, Paoluzzi L, Pieper J, de Wijn JR, van Blitterswijk CA. Regenerating articular tissue by converging technologies. *PLOS One* 2008; 3(8): e3032.
- 14- Fotek PD, Neiva RF, Wang HL. Comparison of dermal matrix and polytetrafluoroethylene membrane for socket bone augmentation: a clinical and histologic study. *J Periodontol* 2009; 80(5): 776-85.
- 15- Kasten P, Luginbühl R, van Griensven M, Barkhausen T, Krettek C, Böhner M, *et al.* Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. *Biomaterials* 2003; 24(15): 2593-603.
- 16- Langenbach F, Naujoks C, Kersten-Thiele PV, Berr K, Depprich RA, Kübler NR, *et al.* Osteogenic differentiation influences stem cell migration out of scaffold-free microspheres. *Tissue Engineering Part A*. 2009;16(2):759-66.
- 17- Thibault RA, Scott Baggett L, Mikos AG, Kasper FK. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on pregenerated extracellular matrix scaffolds in the absence of osteogenic cell culture supplements. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(2): 431-40.
- 18- Xu J, Qin H, Wang X, Zhou Q, Luo F, Hou T, *et al.* Repair of large segmental bone defects using bone marrow stromal cells with demineralized bone matrix. *Orthop Surg* 2009; 1(1): 34-41.
- 19- Mankani MH, Kuznetsov SA, Robey PG. Formation of hematopoietic territories and bone by transplanted human bone marrow stromal cells requires a critical cell density. *Exp Hematol* 2007; 35(6): 995-1004.
- 20- Kögler G, Callejas J, Hakenberg P, Enczmann J, Adams O, Däubener W, *et al.* Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: critical issues. *J Hematother* 1996; 5(2): 105-16.
- 21- Kogler G, Sensken S, Wernet P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Exp Hematol* 2006; 34(11): 1589-95.
- 22- Kögler G, Somville T, Göbel U, Hakenberg P, Knipper A, Fischer J, *et al.* Haematopoietic transplant potential of unrelated and related cord blood: the first six years of the EUROCORD/NETCORD Bank Germany. *Klin Padiatr* 1999; 211(4): 224-32.
- 23- Warnet P. Human cord blood derived unrestricted somatic stem cells (USSC) United States patent. patent No: US 7,560,280 B2. Date of Patent: Jul.14, 2009.
- 24- Tomasz M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol* 1995; 2(9): 575-9.
- 25- Petzer AL, Hogge DE, Landsdorp PM, Reid DS, Eaves CJ. Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) *in vitro* and their expansion in defined medium. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93(4): 1470-4.
- 26- Shih CC, Hu MC, Hu J, Medeiros J, Forman SJ. Long-term *ex vivo* maintenance and expansion of transplantable human hematopoietic stem cells. *Blood* 1999; 94(5):1623-36.
- 27- Sutherland HJ, Eaves CJ, Lansdorp PM, Thacker JD, Hogge DE. Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. *Blood* 1991; 78(3): 666-72.
- 28- Sullenbarger B, Bahng JH, Gruner R, Kotov N, Lasky LC. Prolonged continuous *in vitro* human platelet production using three-dimensional scaffolds. *Exp Hematol* 2009; 37(1): 101-10.
- 29- Wang H. Commercialization of Hematopoietic Stem Cell Expansion System For Clinical Transplantation.[MS Dissertation]. Case Western Reserve University. USA. Ohio. 2011. Available From: <http://etd.ohiolink.edu/view.cgi/Wang%20Hong.pdf?case1300752742>.
- 30- Nishino T, Wang C, Mochizuki-Kashio M, Osawa M, Nakauchi H, Iwama A. *Ex vivo* expansion of human hematopoietic stem cells by garcinol, a potent inhibitor of histone acetyltransferase. *PLoS One* 2011; 6(9): e24298.
- 31- Schlehta B, Wiedemann D, Kittinger C, Jandrositz A, Bonaros NE, Huber JC, *et al.* *Ex-vivo* expanded umbilical cord blood stem cells retain capacity for myocardial regeneration. *Circ J* 2010; 74(1): 188-94.
- 32- Bramono DS, Rider DA, Murali S, Nurcombe V, Cool SM. The effect of human bone marrow stroma-derived heparan sulfate on the *ex vivo* expansion of human cord blood hematopoietic stem cells. *Pharm Res* 2011; 28(6): 1385-94.
- 33- Giardino R, Nicoli Aldini N, Fini M, Tanzi M, Fare S, Draghi L, *et al.* Bioabsorbable scaffold for in situ bone regeneration. *Biomed Pharmacother* 2006; 60(8): 386-92.
- 34- Lin H, Zhao Y, Sun W, Chen B, Zhang J, Zhao W, *et al.* The effect of crosslinking heparin to demineralized bone matrix on mechanical strength and specific binding to human bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 2008; 29(9): 1189-97.
- 35- Mauney JR, Jaquière C, Volloch V, Heberer M, Martin I, Kaplan DL. *In vitro* and *in vivo* evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26(16): 3173-85.
- 36- Sundar S, Pendegrass CJ, Oddy MJ, Blunn GW. Tendon re-attachment to metal prostheses in an *in vivo* animal model using demineralised bone matrix. *J Bone Joint Surg Br* 2009; 91(9): 1257-62.
- 37- Zhao Y, Lin H, Zhang J, Chen B, Sun W, Wang X, *et al.* Crosslinked three-dimensional demineralized bone matrix for the adipose-derived stromal cell proliferation and differentiation. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(1): 13-21.

- 38- Kogler G, Radke TF, Lefort A, Sensken S, Fischer J, Sorg RV, *et al.* Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol* 2005; 33(5): 573-83.
- 39- Engelhardt M, Lubbert M, Guo Y. CD34(+) or CD34(-): which is the more primitive? *Leukemia* 2002; 16(9): 1603-8.
- 40- Miller CL, Eaves CJ. Expansion *in vitro* of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(25): 13648-53.
- 41- Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, Ebihara Y, Yagasaki H, Hisakawa H, *et al.* Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* 2000; 105(7): 1013-21.
- 42- Bhatia M, Bonnet D, Kapp U, Wang JC, Murdoch B, Dick JE. Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term *ex vivo* culture. *J Exp Med* 1997; 186(4): 619-24.
- 43- Bagley J, Rosenzweig M, Marks DF, Pykett MJ. Extended culture of multipotent hematopoietic progenitors without cytokine augmentation in a novel three-dimensional device. *Exp Hematol* 1999; 27(3): 496-504.
- 44- Franke K, Pompe T, Bornhauser M, Werner C. Engineered matrix coatings to modulate the adhesion of CD133⁺ human hematopoietic progenitor cells. *Biomaterials* 2007; 28(5): 836-43.
- 45- Sagar BM, Rentala S, Gopal PN, Sharma S, Mukhopadhyay A. Fibronectin and laminin enhance engraftability of cultured hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350(4): 1000-5.
- 46- Jiang XS, Chai C, Zhang Y, Zhuo RX, Mao HQ, Leong KW. Surface-immobilization of adhesion peptides on substrate for *ex vivo* expansion of cryopreserved umbilical cord blood CD34⁺ cells. *Biomaterials* 2006; 27(13): 2723-32.
- 47- Chua KN, Chai C, Lee PC, Tang YN, Ramakrishna S, Leong KW, *et al.* Surface-aminated electrospun nanofibers enhance adhesion and expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Biomaterials* 2006; 27(36): 6043-51.
- 48- 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.
- 49- Das H, Abdulhameed N, Joseph M, Sakthivel R, Mao HQ, Pompili VJ. *Ex vivo* nanofiber expansion and genetic modification of human cord blood-derived progenitor/stem cells enhances vasculogenesis. *Cell Transplant* 2009; 18(3): 305-18.
- 50- Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater* 2010; 5(6): 062001.
- 51- Yildirim S, Boehmler AM, Kanz L, Möhle R. Expansion of cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitor cells in coculture with autologous umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is superior to cytokine-supplemented liquid culture. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36(1): 71-9.
- 52- Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis JD, 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.
- 53- Nakamura Y, Hiroyama T, Miharada K, Kurita R. Red blood cell production from immortalized progenitor cell line. *Int J Hematol* 2011; 93(1): 5-9.
- 54- Schoemans H, Theunissen K, Maertens J, Boogaerts M, Verfaillie C, Wagner J. Adult umbilical cord blood transplantation: a comprehensive review. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38(2): 83-93.
- 55- Davis CC, Marti LC, Sempowski GD, Jeyaraj DA, Szabolcs P. Interleukin-7 permits Th1/Tc1 maturation and promotes *ex vivo* expansion of cord blood T cells: a critical step toward adoptive immunotherapy after cord blood transplantation. *Cancer Res* 2010; 70(13): 5249-58.
- 56- Zhang Y, Chai C, Jiang XS, Teoh SH, Leong KW. Co-culture of umbilical cord blood CD34⁺ cells with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2006; 12(8): 2161-70.
- 57- Aggarwal R, Lu J, Pompili VJ, Das H. Hematopoietic Stem Cells: Transcriptional Regulation, *Ex vivo* Expansion and Clinical Application. *Curr Mol Med* 2012; 12(1): 34-49.
- 58- Zheng J, Umikawa M, Zhang S, Huynh H, Silvany R, Chen BPC, *et al.* *Ex vivo* expanded hematopoietic stem cells overcome the MHC barrier in allogeneic transplantation. *Cell Stem Cell* 2011; 9(2): 119-30.
- 59- Dahlberg A, Delaney C, Bernstein ID. *Ex vivo* expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 2011; 117(23): 6083-90.
- 60- Tung SS, Parmar S, Robinson SN, De Lima M, Shpall EJ. *Ex vivo* expansion of umbilical cord blood for transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23(2): 245-57.
- 61- Tan J, Liu T, Hou L, Meng W, Wang Y, Zhi W, *et al.* Maintenance and expansion of hematopoietic stem/progenitor cells in biomimetic osteoblast niche. *Cytotechnology* 2010; 62(5): 439-48.

Original Article

Effect of mineralized bone allograft scaffold with coverage of UCB-derived stromal cells on *ex vivo* expansion of CD34⁺ cells

Hashemi Z.S.¹, Forouzandeh Moghadam M.¹, Soleimani M.¹, Khamisipour Gh.²,
Mossahebi Mohammadi M.¹

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

²Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

Abstract

Background and Objectives

Bone marrow transplantation with umbilical cord blood (UCB) in adult recipients is limited mainly by a low CD34⁺ cell dose. To overcome this shortcoming by minimum manipulation, mineralized bone allograft (MBA) scaffold coated by UCB-USSC (unrestricted somatic stem cells) was used to expand CD34⁺ cells from UCB.

Materials and Methods

In this experimental study, UCB-USSCs were isolated and characterized by morphologic and immunophenotypical analysis. Then they were seeded on MBA (for 3D figuration) and culture plate (for 2D figuration) as a feeder layer. CD34⁺ cells were isolated from the UCB (by MACS method) and were expanded in 2D and 3D conditions for 3 weeks. At the end, cell count, flow cytometry, cologenic assay, and LTC-IC were done.

Results

After 3 weeks, *ex vivo* expansion of UCB-CD34⁺ was enhanced 250 ± 13.2 in 3D. The highest CFC expansion and LTC-IC were observed at day 14. Flow cytometry analysis showed the lowest percentage in 3D culture.

Conclusions

USSCs by 3D MBA structure produce the hematopoietic cytokine, extracellular matrix and binding molecules; they also create the intercellular interaction that can be used as a suitable feeder layer. It provides an *ex vivo* mimicry of bone marrow niche by enhancing surface/volume ratio. This model could be a suitable and alternative environment for HSCs expansion and hematopoiesis.

Key words: MBA, Hematopoietic Stem Cells, Umbilical Cord Blood, Allograft

Received: 1 Nov 2011

Accepted: 28 Jan 2012

Correspondence: Forouzandeh M., PhD of Clinical Biochemistry. Associate Professor of Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821)82883861; Fax: (+9821) 82883861
E-mail: foroz@modares.ac.ir