

## تکثیر سلول‌های بنیادی خون‌ساز خون بند ناف بر روی بسترهای نانوالیاف زیست سازگار به صورت هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

مجید مختاری<sup>۱</sup> (Ph.D Student)، آزاده انبارلو<sup>۱</sup> (M.Sc)، امیر آتشی<sup>۱\*</sup> (Ph.D)، مسعود سلیمانی<sup>۱</sup> (Ph.D)، مهشید اخوان رهنما<sup>۲</sup> (M.Sc)

۱- گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

### چکیده

هدف: پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) یک روش درمانی برای بیماری‌های بدخیم و غیر بدخیم خونی می‌باشد. محدودیت اصلی استفاده از خون بندناف در پیوند مغز استخوان، مقدار کم HSCs به دلیل حجم کم خون بند ناف است. بنابراین سیستم‌های مختلفی برای تکثیر HSCs در شرایط آزمایشگاهی (ex vivo) برای غلبه بر این محدودیت طراحی شدند. هدف از این مطالعه مقایسه شرایط مختلف تکثیر HSCs در ex vivo می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بدین منظور HSCs در چهار حالت کشت داده شدند که عبارتند از: در محیط دو بعدی (2D)، هم‌کشتی HSCs با سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) در محیط دو بعدی (2D-Co)، کشت در محیط سه بعدی تشکیل شده از نانوالیاف پلی‌اتر سولفون (3D) (PES) و کشت در محیط سه بعدی (نانوالیاف PES) به صورت هم‌کشتی با MSCs (3D-Co).

یافته‌ها: مقایسه بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که سلول‌های کشت داده شده در حالت 3D-Co میزان تکثیر و بیان بالاتری از نشانگر بنیادینگی CD34 نسبت به سایر گروه‌ها دارد. همچنین قدرت کلنی‌زایی در این گروه به نسبت سایر گروه‌های مورد مطالعه افزایش معناداری به همراه داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه امکان‌پذیر بودن استفاده از این سیستم را جهت تکثیر با حداقل تمایز سلول‌های CD34<sup>+</sup> اثبات نمود. مطالعات بیش‌تر به منظور ارزیابی سلول‌های تکثیر یافته با این سیستم به منظور استفاده در بالین ضروری است.

واژه‌های کلیدی: پیوند سلول بنیادی خون ساز، نانوالیاف، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فنون هم‌کشتی

### مقدمه

به پیوند HSCs در جهت درمان اختلالات بدخیم و غیر بدخیم شده است. اخیراً از این سلول‌ها در طب ترمیمی و مهندسی بافت استفاده شده است [۲، ۳]. پیوند خون بندناف با تاخیر در پیوندپذیری نوتروفیلی و پلاکتی همراه است که بخشی از آن را مرتبط با کم بودن تعداد سلول‌های CD34<sup>+</sup> و سلول‌های هسته‌دار (TNC) می‌دانند. برای بهبود نتایج بالینی پیوندهای

سلول‌های بنیادی خون‌ساز (HSCs) سلول‌هایی هستند که دارای توانایی تمایز به انواع سلول‌های خونی می‌باشند [۱، ۲]. این سلول‌ها را می‌توان از افراد سالم از طریق آسپیراسیون مغز استخوان، موبیلیزاسیون سلول‌های بنیادی به خون محیطی و یا خون بند ناف به دست آورد. در سه دهه اخیر توجه ویژه‌ای

کشت‌های دو بعدی تنها یک تک لایه‌ای از سلول‌ها را بر خلاف طبیعت سه بعدی بافت در ارگانیسیم ایجاد می‌کند. بنابراین، مدلی مناسب برای برهم‌کنش سلولی به حساب نیامده و مستعد زیان‌های هیدرودینامیکی محیط است [۱۱-۱۳]. در کشت سه بعدی، هدف افزایش نسبت سطح به حجم و در نتیجه افزایش سطح تماس و اتصال برای سلول می‌باشد. در صورتی که در محیط دو بعدی حداقل اتصال و سیگنال بین سلولی وجود دارد [۱۱، ۱۳، ۱۴]. در این مطالعه از پلیمر پلی‌اتر سرفون به دلیل تخلخل مناسب و مشابه با مغز استخوان، زیست سازگاری و نیز عدم زیست تخریب‌پذیری برای ایجاد محیط سه بعدی استفاده شد. چون ترکیبات حاصل از زیست تخریبی بسیاری از داربست‌ها سبب تغییر بیولوژی سلول بنیادی در محیط *in vitro* می‌شوند. مثلاً تخریب پلی‌ال لاکتیک اسید PLLA سبب تولید اسیدلاکتیک می‌شود که بیان ژنی سلول بنیادی را تغییر می‌دهد [۱۵، ۱۶]. هدف از این مطالعه مقایسه کشت دو بعدی با سه بعدی و همچنین ارزیابی نقش حمایتی MSCs در تکثیر توام با حداقل تمایز HSCs می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط دو بعدی و سه بعدی. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان از مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته تهیه شدند.  $2 \times 10^4$  عدد سلول بنیادی مزانشیمی بر روی هر یک از داربست‌های ساخته شده و هم‌چنین پلیت مربوط به کشت دو بعدی انتقال داده شد [۱۷] و برای ۶ روز در این وضعیت قرار گرفتند و هر سه روز یک‌بار تعویض محیط با DMEM حاوی ۱۰٪ FBS (Gibco) انجام گرفت.

آماده‌سازی داربست. جهت ساخت نانوالیاف‌های PES از فرایند الکتروریسی استفاده شد. برای تهیه محلول با غلظت  $1/22$  گرم پلی‌اتر سولفون با وزن مولکولی ۸۰۰۰ دالتون (سیگما-آلدریش) در ۹ سی‌سی کلروفرم و ۱ سی‌سی *N,N*-دی‌متیل فرماید (DMF) در دمای اتاق با

خون بندناف گروه‌های متعددی بر روی تکثیر HSCs در محیط *ex vivo* تمرکز کرده‌اند. متأسفانه تکثیر HSCs در *ex vivo* مشکل است زیرا همان‌طور که سلول‌ها تکثیر می‌یابند تمایل به تمایز نیز دارند که احتمالاً به دلیل حذف اثرات مناسبی است که به واسطه ریزمحیط (microenvironment) در *in vivo* وجود دارد [۴]. HSCs عمدتاً در مغز استخوان و در یک ریزمحیط خاص که نیچ یا کنام سلول‌های بنیادی نامیده می‌شود قرار دارند و این ریزمحیط سرنوشت سلول، خودنوزایی و تمایز آن‌ها را تنظیم می‌کند [۵]. سلول‌های مختلفی نظیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، استئوبلاست‌ها، آدیپوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها و هم‌چنین ماتریکس خارج سلولی تشکیل‌دهنده ریزمحیط مغز استخوان می‌باشند. مطالعات اخیر نشان داده است که شبیه‌سازی اجزا نیچ سلول‌های بنیادی از جمله هم‌کشتی HSCs با MSCs، خودنوزایی را تسهیل و تمایز در *ex vivo* را کنترل می‌کند [۶، ۷].

MSCs از مهم‌ترین سلول‌های حمایت‌کننده خون‌سازی می‌باشند. این سلول‌ها به صورت چسبیده به پلاستیک رشد کرده و دارای مارکرهای سطحی CD73، CD90، CD105، CD16 و HLA-ABC می‌باشند در حالی که برای مارکرهای CD31، CD34، CD45، CD80 و HLA-DR منفی هستند [۴، ۸]. MSCs عمل‌کردهای حیاتی HSCs را از طریق تماس مستقیم سلول-سلول، ترشح یا مهار سایتوکاین‌های اندوژن و تشکیل یک شبکه ماتریکس خارج سلولی کنترل می‌کنند. در میان فاکتورهای مختلف ترشح شده از MSCs، کموکاین CXCL12 (SDF-1) که یک تنظیم‌کننده مهم خون‌سازی و لانه‌گزینی HSCs است وجود دارد. سطوح بالای SDF-1 در سیستم‌های هم‌کشتی MSC منجر به کاهش تنظیمی طیف وسیعی از سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های دخیل در تمایز HSCs می‌شود SDF-1 هم‌چنین سایتوکاین‌هایی را که مانع خودنوزایی HSCs می‌شود را کاهش می‌دهد [۹، ۱۰].

محیط‌های کشت دو بعدی علی‌رغم سادگی، محدودیت‌هایی از جمله ظرفیت پایین کشت محصول را دارند.

۴/۰٪ رنگ‌آمیزی و درصد سلول‌های زنده محاسبه شدند. شمارش سلولی در روزهای ۵ و ۱۰ انجام گرفت. فلوسایتومتری. میزان خلوص سلول‌های CD34 عبور داده شده از ستون MACS با استفاده از فلوسایتومتری (ABI Attune Flow cytometer) مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی CD34-PE (Miltenyi Biotec) انکوبه شدند. Mouse IgG1 به عنوان ایزوتایپ کنترل مورد استفاده قرار گرفت. ارزیابی سلول‌های CD34<sup>+</sup> در روزهای ۵ و ۱۰ نیز صورت گرفت.

تست سنجش کلنی. توانایی کلنی‌زایی سلول‌ها قبل و بعد از هم‌کشتی با MSCs مورد ارزیابی قرار گرفت. ۵۰۰ سلول در ۱/۱ میلی‌لیتر محیط methocult H4435 (Stem Cell Technologies Inc.) درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز انکوبه شدند. سپس پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز انکوبه شدند. تعداد کلنی‌ها بعد از ۱۴ روز با میکروسکوپ معکوس شمارش شدند. آنالیز آماری. تمامی تست‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شدند. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad (PRISM V 5.0 analytical Software) و روش آماری one-way ANOVAs انجام گرفت. معناداری کم‌تر از ۰/۰۵ (P value < ۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

## نتایج

نتایج آزمون‌های خواص فیزیکی داربست‌ها. نتایج تصاویر میکروسکوپ الکترونی پوششی نشان داد که داربست‌های نانوالیافی پلی‌اتر سولفون دارای ساختاری متخلخل، یکنواخت با حفره‌های مرتبط هستند (شکل ۱-۱ و ۱-۲) که آن‌ها را برای استفاده در مهندسی بافت مناسب می‌سازد. همچنین حفره و تخلخل‌های داربست در اندازه‌ی نانو هستند که باعث می‌شود نسبت سطح به حجم در این مقیاس افزایش یافته و به همین نسبت قدرت اتصال سلول‌ها افزایش یابد. نتایج حاصل از کشت سلول‌های CD34<sup>+</sup> در چهار وضعیت مورد مطالعه. سلول‌های کشت شده در محیط دو

سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه روی همزن به مدت ۴ ساعت حل و همگن شد. سپس محلول به داخل سرنگ کشیده شد و پس از هواگیری در انتهای پمپ قرار گرفت تا ریسندگی بر روی آن انجام گیرد. ولتاژ به کار رفته ۲۲ کیلوولت و فاصله‌ی نازل تا جمع‌کننده ۲۳ سانتی‌متر تنظیم شده بود. سطح جمع‌کننده با ورقه‌ی نازک آلومینیومی پوشانده شد و الیاف بر روی پوشش آلومینیومی جمع‌آوری گردید. صفحات نانوالیافی تولید شده به مدت یک روز در آون خلاء نگهداری و حلال‌زدایی شدند.

### ارزیابی مورفولوژی داربست‌ها

سطح نمونه‌ها با ضخامتی حدود ۱۲ نانومتر طلا با استفاده از دستگاه اسپوترکوتر (شرکت Bal-Tec از کشور سوئیس) پوشش داده شدند. نمونه‌های پوشش‌دار به منظور مشاهده به میکروسکوپ SEM (مدل XL30 ساخت شرکت فیلیپس از کشور هلند) منتقل و عکس‌برداری انجام شد.

جداسازی سلول‌های CD34<sup>+</sup>. خون بند ناف توسط مامای بخش زایمان در کیسه‌های خون حاوی ضد انعقاد CPDA1 گرفته شد و قبلاً رضایت‌نامه آگاهانه برای تمامی نمونه‌ها گرفته شد. سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از فایکول (GE Healthcare) از خون بند ناف جداسازی شدند. سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده در مجاورت CD34 MicroBead (human-Miltenyi Biotec) قرار گرفتند. سپس به ستون MACS منتقل شدند. در انتها سلول‌ها جمع‌آوری و به محیط StemSpan™ (Stem cell technologies Inc.) محتوی TPO، SCF، و ال-گلوتامین mmol/l ۱ و ۲ X Antibiotic منتقل شدند [۱۸].

کشت سلولی. ۵×۱۰<sup>۴</sup> از سلول‌های CD34<sup>+</sup> در محیط دو بعدی و سه بعدی [۱۵] به دو صورت منفرد و هم‌کشتی با MSCs همراه با محیط StemSpan™ (Stem cell technologies Inc.) محتوی TPO، SCF، FLT-3 (Peprotech) و ال-گلوتامین mmol/l ۲ کشت داده شدند.

شمارش سلولی. برای بررسی میزان تکثیر سلول‌ها از هموسیتومتر استفاده شد. سلول‌ها با استفاده از تریپان بلو

بعدی (2D). سلول‌های جدا شده و تائید شده در محیط کشت دو بعدی در حضور Stem Span و فاکتورهای اشاره شده کشت گردید. تعویض محیط هر دو روز یکبار انجام گردید. شکل ۲ (الف) تصویری از سلول‌های موجود در شرایط کشت دو بعدی را نشان می‌دهد.

میزان سلول‌های  $CD34^+$  در گروه‌های مختلف. میانگین خلوص سلول‌های  $CD34^+$  عبور داده شده از ستون MACS با استفاده از فلوسایتومتری حدود ۹۵٪ بود. میانگین درصد سلول‌های  $CD34^+$  در روزهای ۵ و ۱۰ در گروه 2D به ترتیب  $۲/۵۵۴ \pm ۴۲/۹۳$  و  $۱/۶۱۷ \pm ۳۳/۲۳$ ، گروه 2D-Co به ترتیب  $۲/۵۵۱ \pm ۴۹/۱۰$  و  $۱/۵۳۵ \pm ۴۰/۱۰$ ، گروه 3D به ترتیب  $۳/۱۲۱ \pm ۶۸/۵۳$  و  $۱/۸۰۰ \pm ۴۸/۶۰$ ، گروه 3D-Co به ترتیب  $۰/۷۵۵ \pm ۷۹/۳۰$  و  $۱/۰۰۷ \pm ۵۵/۱۳$  می‌باشد (شکل ۳). درصد این سلول‌ها در گروه 3D-Co از بقیه گروه‌ها در روز ۵ بیشتر بود و در حقیقت این گروه قابلیت بیشتری در حفظ بنیادینگی سلول‌های بنیادی خون‌ساز را داشته است. اگرچه درصد مارکر بنیادینگی  $CD34$  در گروه 3D-Co در روز ۱۰ بیش‌تر از بقیه گروه‌ها بود ولی نسبت به روز ۵ کاهش یافت.

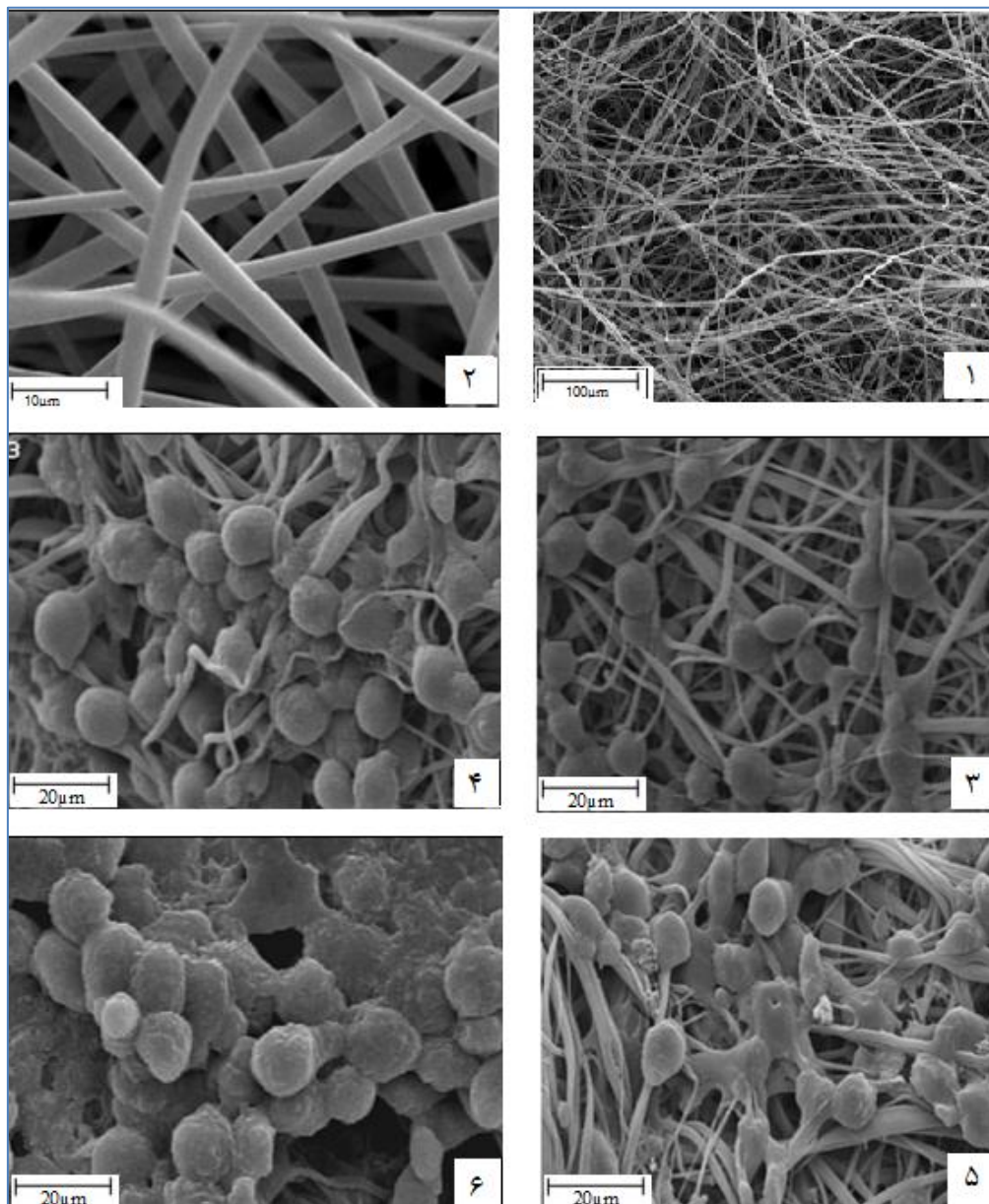
نتایج حاصل از سنجش کلنی. قدرت کلنی‌زایی سلول‌ها قبل و بعد از تکثیر در چهار وضعیت مورد مطالعه تحت بررسی قرار گرفتند. شکل ۴ کلنی‌های حاصل از سلول‌های کشت شده را نشان می‌دهد. تعداد کلنی‌های ایجاد شده در محیط methocult در شکل ۴ آورده شده است. نتایج سنجش کلنی نشان داد که قدرت کلنی‌زایی در روز ۵ و ۱۰ کم‌تر از روز صفر است و در روزهای ۵ و ۱۰ گروه 3D-Co بالاتر از بقیه گروه‌ها است. اگرچه تعداد سلول افزایش می‌یابد ولی میزان مارکر  $CD34$  کاهش می‌یابد با توجه به این‌که قدرت کلنی‌زایی ارتباط مستقیمی با حفظ بنیادینگی دارد و در روز ۱۰ به علت کاهش مارکر  $CD34$  در مقایسه با روز ۵ و روز صفر میزان کلنی‌زایی نیز کاهش یافته است.

سلول‌های کشت شده در محیط دو بعدی به صورت هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی (2D-Co). سلول‌های جدا شده و تائید شده در محیط کشت دو بعدی به صورت هم‌کشتی با MSCs در حضور Stem Span و فاکتورهای اشاره شده کشت گردید. شکل ۲ (ب) تصویری از سلول‌های موجود در شرایط کشت دو بعدی به صورت هم‌کشتی با MSCs را نشان می‌دهد.

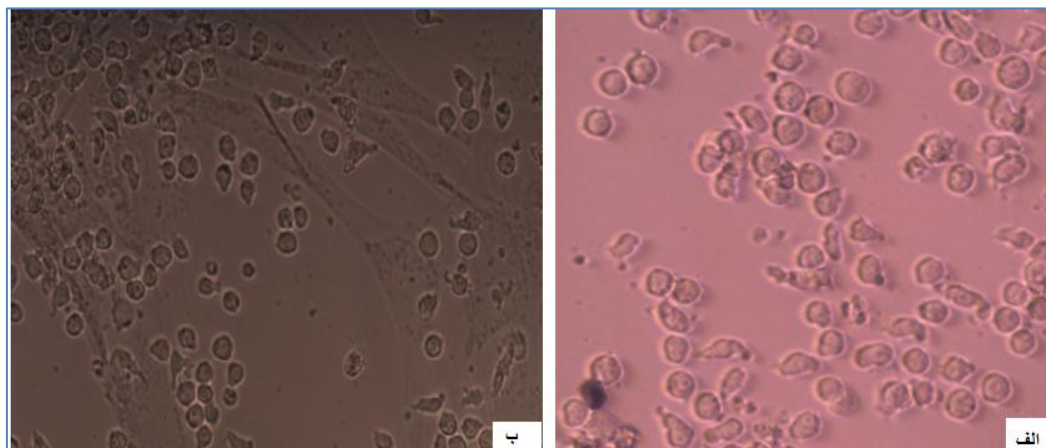
سلول‌های کشت شده در محیط سه بعدی (3D). همان‌گونه که گفته شد تعداد  $۵ \times ۱۰^۴$  سلول بر روی هر یک از داربست‌ها کشت گردید. هم‌چنین بعد از کشت HSCs بر روی داربست وضعیت سلول‌ها در روزهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱-۳ و ۱-۴ وضعیت سلول‌ها را در روزهای ۵ و ۱۰ بر روی داربست نشان می‌دهد.

سلول‌های کشت شده در محیط سه بعدی به صورت هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی (3D-Co). داربست‌هایی که MSCs بر روی آن‌ها کاشته شده بودند در چاهک پشت و رو شدند، به نحوی که سطح مقابل در دسترس قرار گرفت. سپس  $۵ \times ۱۰^۴$  عدد از HSCs بر روی هر یک از داربست‌ها قرار داده شد. سپس وضعیت سلول‌های کشت شده در روزهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱-۵ و ۱-۶ وضعیت سلول‌ها را بر روی داربست‌های حاوی MSCs در سطح زیرین نشان می‌دهد.

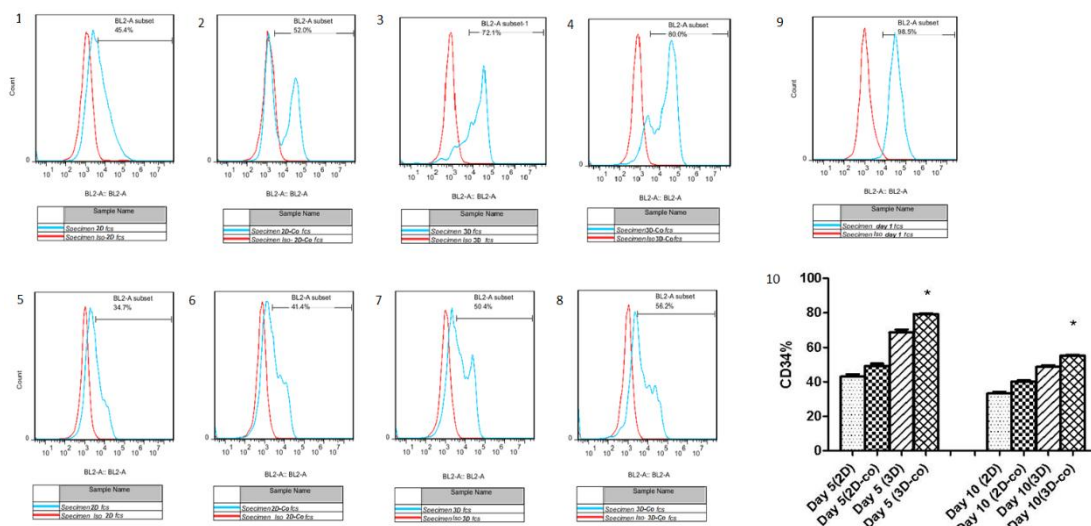
نتایج تکثیر سلولی در چهار وضعیت مورد مطالعه. شمارش سلول‌ها در چهار وضعیت در روزهای ۵ و ۱۰ انجام گرفت. میانگین سلول‌های شمارش شده در روزهای ۵ و ۱۰ در گروه 2D به ترتیب  $۱۵۰۰۰ \pm ۲۰۵۰۰$  و  $۲۷۵۳۸ \pm ۳۷۸۳۳۳$ ، گروه 2D-Co به ترتیب  $۱۵۲۷۵ \pm ۲۸۶۶۶۷$  و  $۵۱۱۶۶۷ \pm ۲۸۴۳۱$ ، گروه 3D به ترتیب



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی پوششی (۱ و ۲) داربست‌های نانوالیاف پلی اتر سولفون؛ (۳ و ۴) تصویر سلول‌های کشت شده در حالت 3D (۳) روز ۵ کشت، (۴) روز ۱۰ کشت؛ (۵ و ۶) تصویر سلول‌های کشت شده در حالت 3D-Co (۵) روز ۵ کشت، (۶) روز ۱۰ کشت.



شکل ۲. تصویر سلول‌های کشت شده الف) در حالت دو بعدی (2D)؛ ب) همکشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی (2D-Co). بزرگنمایی  $\times 400$ .

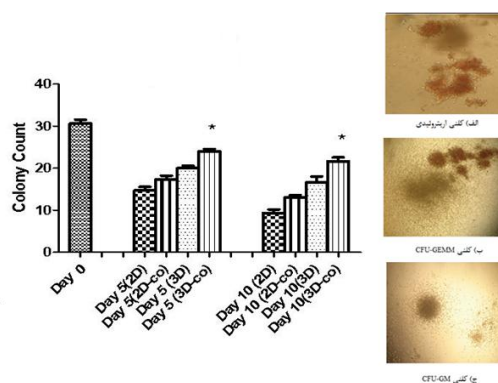


شکل ۳. نتایج فلوسایتومتری نشان داده شده یکی از سه تکرار می باشد، (۱-۴) نتایج فلوسایتومتری در روز ۵؛ (۵-۸) نتایج فلوسایتومتری در روز ۱۰؛ (۹) در روز صفر؛ (۱۰) آنالیز آماری مربوط به بررسی مارکر CD34. بین گروه 3D-Co و سایر گروه ها  $P < 0.05$ \*

## بحث و نتیجه گیری

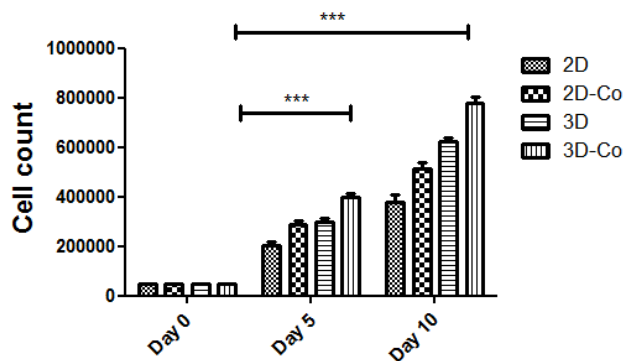
تاسیس بانک‌های خون بند ناف و نتایج موفقیت آمیز حاصل از پیوندهای خون بند ناف، باعث افزایش توجه به این منبع سلولی شده است. این منبع جهت بیماری‌های کاربرد دارد که به دلایل مختلف دهنده مناسب مغز استخوان در اختیار ندارند [۱۹،۳]. یافتن یک روش موثر و کاربردی در زمینه تکثیر HSCs انسانی در *ex vivo* جهت استفاده از این سلول‌ها در درمان انواع اختلالات خونی و همچنین درمان حمایتی در بیماری‌های بدخیم ضروری است [۲۰].

کشت در محیط‌های دو بعدی یکی از روش‌های متداول تکثیر HSCs می‌باشد [۱۳]. اخیراً در یک کارآزمایی بالینی که توسط مرکز MD Anderson صورت گرفت. یک واحد خون بند ناف در یک سیستم همکشتی با MSCs در حضور SCF، TPO، FLT-3L و G-CSF در شرایط *ex vivo* تکثیر داده شدند. همکشتی HSCs با MSCs منجر به افزایش ۱۲ برابری در تعداد TNC، ۳۱ برابری در سلول‌های CD34<sup>+</sup> و ۱۷/۵ برابری در تعداد سلول‌های کلنی‌زا گردید [۴، ۱۰]. این افزایش در تعداد سلول‌ها احتمالاً به دلیل استفاده از MSCs به منظور فراهم ساختن محیط خون‌سازی، توانایی کشت کل واحد خون بند ناف به جای سلول‌های CD133<sup>+</sup>، به حداقل رساندن از



شکل ۴. سمت راست تصاویر مربوط به کلنی‌های حاصل از کشت سلول‌های CD34<sup>+</sup> بزرگنمایی  $\times 100$ . سمت چپ نمودار مربوط به آنالیز شمارش کلنی بین گروه 3D-Co و سایر گروه‌ها  $P < 0.05$ \*

شکل ۵. آنالیز آماری مربوط به شمارش سلولی.  $P < 0.001$ \*\*\* بین روز



صفر و روزهای ۵ و ۱۰.

در مطالعه حاضر، از نانوالیاف‌های زیست‌سازگار از جنس پلی‌اتر سولفون برای ایجاد محیط سه بعدی استفاده شد. همچنین در یکی از گروه‌های مورد مطالعه این داربست‌ها با MSCs پوشانده شدند. نتایج حاصل از شمارش سلولی نشان داد که هم‌کشتی در محیط سه بعدی (3D-Co) بیش‌ترین توانایی را در تکثیر HSCs دارد به نحوی که در این گروه مارکر CD34 بیان بالاتری به نسبت سایر گروه‌ها به همراه داشت که این مسئله نشان‌دهنده حفظ پتانسیل بنیادینگی سلول‌های تکثیر یافته می‌باشد. در ضمن قدرت کلنی‌زایی این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های تکثیر شده در سه وضعیت دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان داد. در مجموع، استفاده از نانوالیاف‌های پوشانده شده با MSCs و کشت HSCs در این وضعیت نشان داد که این نوع سیستم کشت دارای قدرت بالایی در حفظ حالت بنیادینگی HSCs در مقایسه با سایر گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد. اگرچه بهتر است برای استفاده از این روش در بالین میزان پیوندپذیری و لانه‌گزینی سلول‌های تکثیر شده مورد ارزیابی قرار گیرند.

در این مطالعه نشان داده شد که تکثیر بالا سلول‌های CD34<sup>+</sup> جدا شده از خون بند ناف بر روی نانوالیاف‌های پوشانده شده با MSCs در یک سطح و استفاده از سطح مقابل جهت کشت سلول‌های CD34<sup>+</sup> امکان‌پذیر است. این سیستم کشت با هدف به‌کارگیری نقش حمایتی MSCs در تکثیر توام با حداقل تمایز سلول‌های CD34<sup>+</sup> طراحی گردید و سبب افزایش بیش‌تری در تعداد کلی سلول‌ها و قدرت کلنی‌زایی در مقایسه با سایر روش‌های مورد مطالعه گردید.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان‌نامه دانشجویی در گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. بدین وسیله بر خود لازم می‌دانیم از تمامی اعضا این گروه تقدیر و تشکر نماییم.

دست دادن سلول‌های CD34<sup>+</sup> در فرایند جداسازی مثبت و همچنین اضافه کردن FLT-3L به محیط کشت می‌باشد که در نتیجه آن میانگین زمان پیوندپذیری نوترفیل ۱۴ و پلاکت ۳۵ روز گردید [۴].

در مطالعه‌ای لیستن (Leisten) و همکارانش محیطی سه بعدی با استفاده از کلاژن طراحی کردند، این داربست‌های کلاژنی با MSCs مشتق از بند ناف و مغز استخوان پوشانده شده بودند. MSCs مشتق از هر دو منبع توانایی افزایش تکثیر MSCs را دارا بودند اما MSCs مشتق از بند ناف توانایی کم‌تری در حفظ پتانسیل بنیادینگی HSCs را داشتند و تکثیر آن‌ها همراه با تمایز بود و این سلول‌ها برای حفظ خودنوزایی و توانایی بازسازی طولانی‌مدت HSCs مناسب نبودند [۲۱].

Yan Li و همکارانش گزارش کردند که کشت در محیط‌های non woven ساخته شده از PET برهمکنش‌های سلول-سلول و سلول-ماتریکس را افزایش می‌دهد و اجازه توزیع سه بعدی سلول‌های خون‌ساز و استرومایی را می‌دهد [۱۲].

کشت در محیط‌های داربستی در واقع در نقش غشای پایه عمل می‌کند که منجر به افزایش سلول‌های بنیادی خون‌ساز و جنینی می‌شود [۲۲]. در این راستا Qi Feng و همکارانش داربست‌هایی کونژوگه با فیبرونکتین طراحی کردند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که این نوع داربست‌ها در مقایسه به محیط‌های کشت دوبعدی حاوی فیبرونکتین، میزان کارایی بالاتری دارند [۲۰]. علاوه بر این موسوی و همکارانش (۲۰۱۴) داربست‌هایی از جنس پلی‌کاپرولاکتون که با فیبرونکتین پوشانده شده بود جهت تکثیر سلول‌های بنیادی خون‌ساز طراحی کردند. آن‌ها نشان دادند که تعداد کل سلول‌ها و همچنین سلول‌های CD34<sup>+</sup> نسبت به محیط دو بعدی بیش‌تر است [۲۳]. اسکندری و همکارانش (۲۰۱۵) نیز از داربست‌هایی از جنس پلی‌اتر سولفون کونژوگه با فیبرونکتین استفاده نمودند و مزیت استفاده از محیط سه بعدی در مقایسه با دو بعدی برای کشت سلول‌های بنیادی خون‌ساز را نشان دادند [۱۵].

## منابع

- [12] Li YAN, Ma T, Kniss DA, Yang S, Lasky LC. Cutting Edge Communication. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 368: 355-368.
- [13] 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: 439-448.
- [14] Aggarwal R, Lu J, Pompili VJ, Das H. Hematopoietic stem cells: transcriptional regulation, ex vivo expansion and clinical application. *Curr Mol Med* 2012; 12: 34.
- [15] Eskandari F, Allahverdi A, Nasiri H, Azad M, Kalantari N, Soleimani M, et al. Nanofiber expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem. *Iran J Ped Hematol Oncol* 2015; 5: 170-178.
- [16] Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 2004; 32: 477-486.
- [17] Jing D, Fonseca AV, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, et al. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells - modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica* 2010; 95: 542-550.
- [18] Shahrabi S, Kaviani S, Solimani M, Porfatolah AA, Zonubi Z. Effects of in vitro expansion of CD133+ hematopoietic stem cells isolated from umbilical cord blood in expression of microRNAs involved haematopoiesis. *Koomesh* 2013; 15: 11-16.
- [19] Kato for the Japan Cord Blood Bank S. Cord blood banking and cord blood transplantation. *ISBT Sci Ser* 2008; 3: 211-212.
- [20] Feng Q, Chai C, Jiang X, Leong KW, Mao H. Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin. *J Biomed Mater Res A* 2006; 78: 781-791.
- [21] Leisten I, Kramann R, Ventura Ferreira MS, Bovi M, Neuss S, Ziegler P, et al. 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. *Biomaterials* 2012; 33: 1736-1747.
- [22] Dellatore SM, Garcia AS, Miller WM. Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion. *Curr Opin Biotechnol* 2008; 19: 534-540.
- [23] Mousavi SH, Abroun S, Soleimani M, Mowla SJ. Expansion of human cord blood hematopoietic stem / progenitor cells in three-dimensional Nanoscaffold coated with Fibronectin. *Int J Hematol stem cell Res* 2015; 9: 72-79.
- [1] Yang J, Aguila JR, Alipio Z, Lai R, Fink LM, Ma Y. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem/progenitor cells mediated by the stem cell gene Sall4. *J Hematol Oncol* 2011; 4: 38.
- [2] Walasek MA, van Os R, de Haan G. Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. *Ann N Y Acad Sci Wiley Online Library* 2012; 1266: 138-150.
- [3] Schuster JA, Stupnikov MR, Ma G, Liao W, Lai R, Ma Y, et al. Expansion of hematopoietic stem cells for transplantation: current perspectives. *Exp Hematol Oncol* 2012; 1: 12.
- [4] Robinson SN, Simmons PJ, Yang H, Alousi AM, Marcos de Lima J, Shpall EJ. Mesenchymal stem cells in ex vivo cord blood expansion. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011; 24: 83-92.
- [5] Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 93-106.
- [6] Nishino T, Osawa M, Iwama A. New approaches to expand hematopoietic stem and progenitor cells. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12: 743-756.
- [7] Jing D, Fonseca AV, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, et al. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells - modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica* 2010; 95: 542-550.
- [8] Solali S, Kaviani S, Soleimani M, Zonubi Z. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *Koomesh* 2015; 16: 505-511. (Persian).
- [9] 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: 359-366.
- [10] Bari S, Seah KK, Poon Z, Cheung AM, Fan X, Ong SY, Li S, et al. Expansion and homing of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells for clinical transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21: 1008-1019.
- [11] Jozaki T, Aoki K, Mizumoto H, Kajiwara T. In vitro reconstruction of a three-dimensional mouse hematopoietic microenvironment in the pore of polyurethane foam. *Cytotechnology* 2010; 62: 531-537.



# Expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem cells on biocompatible nanofiber scaffold as co-culture with bone marrow derived mesenchymal stem cells

Majid Mokhtari (Ph.D Student)<sup>1</sup>, Azadeh Anbarlou (M.Sc)<sup>1</sup>, Amir Atashi (Ph.D)<sup>\*1</sup>, Masoud Soleimani (Ph.D)<sup>1</sup>, Mahshid AkhavanRahnama (M.Sc)<sup>2</sup>

1 – Dept. of Hematology, School of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2 – Dept. of Hematology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

(Received: 4 Jan 2016; Accepted: 14 Nov 2016)

**Introduction:** Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is one of the treatment approaches for malignant and non-malignant hematologic diseases. The most important disadvantage of UCB in HSCT is low number of cells that can be collected. So, different systems for ex vivo expansion of HSCs were designed to overcome this limitation. The goal of this study was to examine different conditions of ex vivo expansion of HSCs.

**Materials and Methods:** In this study, HSCs were cultured in four conditions: 1- In two-dimensional culture (2D), 2- Co-culture with mesenchymal stem cells (MSCs) in 2-D (2D-Co), 3- In three-dimensional culture (constructed with poly ether sulfon nanofibers) (3D), and 4- Co - culture with MSCs in 3-D (3D-Co).

**Results:** The comparison of these groups showed that 3D-Co group had more expansion levels and expression of CD34 marker than other groups. Moreover, the clonogenic capacity in this group was increased in comparison to other groups.

**Conclusion:** The results of our study showed that the possibility usage of this system for expansion with lowest levels of differentiation in CD34+ HSCs. Further studies are needed to evaluate expanded cells with this system to use in clinical practice.

**Keywords:** Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Nanofiber, Mesenchymal Steml Cells, Coculture Techniques

---

\* Corresponding author. Tel: +98 21 82883579  
atashia@modares.ac.ir