تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز خون بندناف بر روی بسترهای نانوالیاف زیست سازگار: *گزارش کوتاه*

فاطمه اسکندری[۱]
مسعود سلیمانی[۱*]
نسیم کلانتری[۱]
مهدی آزاد[۲]
امیر الهوردی[۱]

۱- گروه خون‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه خون‌شناسی تلفن: ۸۸۰۱۵۰۵۰-۰۲۱
E-mail: soleim_m@modares.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۱۴ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۰۶ آنلاین: ۱۳۹۳/۱۱/۲۰

زمینه و هدف: این مطالعه با هدف تکثیر سلول‌های بنیادی در خارج از بدن، با استفاده از بسترهای نانوالیاف زیست سازگار انجام شد. پیوند مغز استخوان (HSCT) یک رویکرد درمانی در درمان بدخیمی‌های خونی و ناسازگاری مغز استخوان است. خون بندناف (UCB) به‌عنوان یک جایگزین برای سلول‌های بنیادی/ خون‌ساز (HPSC) برای در پیوند آلوژنیک شناخته شده است. مانع اصلی در استفاده از HPSC مشتق از خون بندناف، حجم کم نمونه‌های جمع‌آوری شده است. بنابراین، در شرایط آزمایشگاهی گسترش HSCs روش مفید برای غلبه بر این محدودیت است.

روش بررسی: این مطالعه علمی- پژوهشی از آبان ۱۳۹۰ لغایت خرداد ۱۳۹۱ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسید. جداسازی سلول‌های بنیادی با روش MidiMACS انجام و میزان خلوص سلول‌ها با فلوسایتومتری بررسی شد. سلول‌ها بر روی پلیت و بستر نانوالیاف کونژوگه با فیبرونکتین کشت و توانایی کلنی‌زایی آنها، با روش سنجش کلنی بررسی شد.

یافته‌ها: سلول‌های کشت‌شده در پلیت و نانوالیاف پس از دو هفته افزایش داشت که در محیط پلیت افزایش بیشتر بود (به‌ترتیب ۱۴ برابر و شش برابر). فعالیت کلنی‌زایی نیز پس از این مدت نسبت به سلول‌های روز اول روند کاهشی داشت که این روند در نانوالیاف کمتر از پلیت بود ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی گواه بر توانایی بستر نانوالیاف در تکثیر سلول‌های بنیادی خارج از بدن بوده و می‌توان از این بستر جهت تکثیر در شرایط آزمایشگاهی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی خونساز، خون بندناف، بستر نانوالیاف پلی اترسولفون.

مقدمه

به‌تازگی پیوند سلول‌های بنیادی خونساز خون بند ناف به‌طور چشمگیری جهت درمان انواع بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است.[۱و۲] در مقایسه با سایر منابع سلولی از جمله مغز استخوان و خون محیطی، خون بند ناف به‌دلیل میزان بالای تحمل به آنتی‌ژن لکوسیتی انسانی (HLA) غیر سازگار و همچنین خطر پایین بروز بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD)، به‌عنوان منبع جایگزین مناسب جهت درمان معرفی شده است.[۳-۵] اما تعداد سلول‌های موجود در یک واحد خون بند ناف اندک بوده و جهت غلبه بر این مشکل، تکثیر سلول‌ها در خارج از محیط بدن، روش مناسبی است که می‌تواند میزان تأخیر در پیوند و خطر ترومبوسیتوپنی و نوتروپنی پس از آن‌را تا حد ممکن کاهش دهد.[۶] سایتوکین‌های معمول جهت تکثیر شامل SCF, Flt3 ligand, TPO, IL3, IL6 هستند که به‌شکل ترکیب با محیط‌های فاقد سرم مورد استفاده قرار می‌گیرند. ریزمحیط مغز استخوان، شبکه‌ی سه بعدی پیچیده‌ای از ماتریکس خارج سلولی را فراهم آورده و اعمالی نظیر خودنوسازی، لانه‌گزینی و سرنوشت سلولی را تنظیم می‌کند. در روش‌های تکثیر معمول در پلیت اثرات

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]

توپوگرافی و خصوصیات مکانیکی و بیوشیمیایی محیط بر روی رفتار سلولی نادیده گرفته می‌شود.[۷-۹] جهت نیل به این هدف بسترهای نانوالیاف به‌صورت شبکه‌ی سه‌بعدی متخلخل مورد استفاده قرار می‌گیرند.[۱۰] مطالعات نشان دادند که اتصال کوالان فیبرونکتین بر روی بسترهای پلیمری باعث اتصال سلول‌های $CD34^+$ و افزایش تکثیر آنها شده است.[۱۱] در مطالعه حاضر اثر بسترهای نانوالیاف پلی‌اتر سولفون کونژوگه شده با فیبرونکتین، بر میزان تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز $CD133^+$ خون بند ناف مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

مطالعه حاضر علمی- پژوهشی بوده و طی آبان ۱۳۹۰ لغایت خرداد ۱۳۹۱ و در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسید. نمونه‌های خون بند ناف از سازمان انتقال خون تهران تهیه شد.

سلول‌ها با روش Positive selection و ستون MACS (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) و با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال CD133 (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) از خون بند ناف جداسازی شد. میزان خلوص سلول‌های جداشده توسط روش فلوسایتومتری و با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال $CD133^+$ بررسی شد. نانوالیاف Polyethersulfone (PES) (Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran) تهیه و جهت استریل کردن نانوالیاف از الکل ۷۰٪ فیلتر شده و Phosphate Buffered Saline (PBS) استریل استفاده شد. جهت اتصال کووالان فیبرونکتین بر روی نانوالیاف PES از 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) crosslinking agent (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) استفاده شد و تایید اتصال فیبرونکتین توسط تست طیف‌سنجی فروسرخ (FTIR) بررسی گردید. تعداد ۵۰,۰۰۰ سلول در محیط فاقد سرم StemSpan™ (STEMCELL Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada)، در پلیت‌های ۴۸ خانه در دو حالت بدون بستر نانوالیاف و همراه با بستر نانوالیاف کونژوگه شده با فیبرونکتین و در حضور سایتوکین‌های Stem cell factor (SCF), Flt3 ligand (FL) (۵۰ ng/ml) (STEMCELL Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada) کشت داده شد. سلول‌ها به‌مدت ۱۴ روز در محیط کشت قرار داشتند و یک روز در میان تعویض محیط آنها انجام می‌شد. در روز ۱۴ کشت، شمارش سلولی توسط لام نئوبار انجام شد و جهت بررسی میزان قابلیت حیات سلولی، از محلول تریپان‌بلو ۰/۴٪ استفاده شد. میزان خلوص سلول‌های جدا شده از بند ناف با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال $CD133^+$، PE (Phycoerythrin) (STEMCELL Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada) بررسی شد.

برای شمارش سلول‌ها لام نئوبار مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور حدود ۵۰ µl از سوسپانسیون سلولی برداشته و هم حجم آن تریپان‌بلو ۰/۴٪ اضافه گردید. بلافاصله یک قطره روی لام نئوبار قرار داده شد و سلول‌های موجود در چهار مربع مربوط به شماش گلبول‌های سفید شمارش گردید، مجموع شمارش بر چهار تقسیم و در ضریب ثابت ۱۰,۰۰۰ ضرب شد. لازم به یادآوری است که فقط سلول‌های زنده مورد شمارش قرار گرفتند. جهت انجام این تست از محیط MethoCult™ (STEMCELL Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada) استفاده گردید.

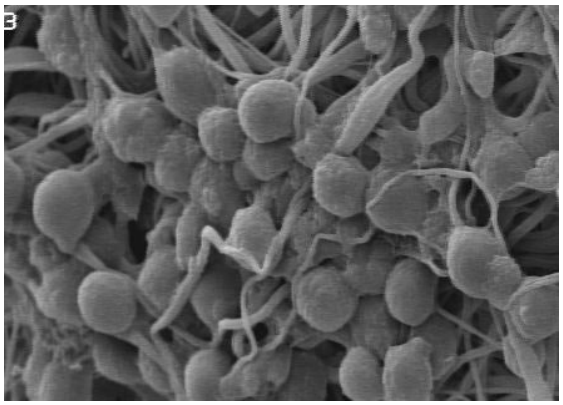
جهت انجام این تست این‌گونه عمل گردید: ابتدا تعداد ۲×۱۰^۳ عدد سلول به محیط ۱/۱ ml محیط MethoCult اضافه شده و به‌وسیله ورتکس به‌طور کامل مخلوط گردید و مخلوط حاصل توسط سرنگ با سوزن گاژ ۱۶ در پتری دیش‌های ۳۵ میلی‌لیتری ریخته شد. جهت تامین رطوبت محیط، یک پلیت حاوی PBS استریل در کنار محیط کشت MethoCult قرار داده شد.

آنالیز آماری این مطالعه توسط SPSS software version 16 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) و با استفاده از روش اندازه‌های تکراری (Repeated measures) انجام و نتایج $P<۰/۰۵$ به‌صورت معنادار گزارش شد.

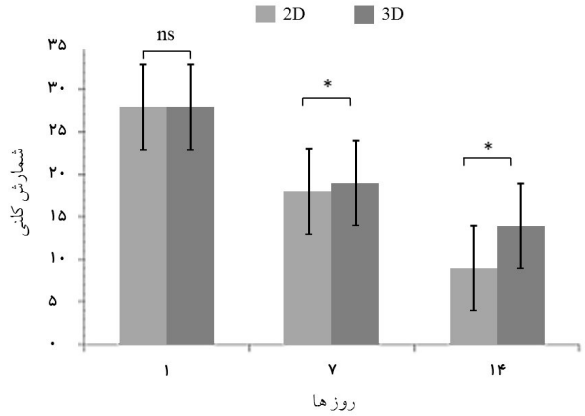
یافته‌ها

سلول‌های $CD133^+$ از سلول‌های هسته‌دار خون بند ناف با کمک تکنیک MACS جدا گردیدند. جهت تایید خلوص این سلول‌ها از فلوسایتومتری استفاده گردید. نتایج حاصل خلوص ۹۸٪ را نشان داد. میزان زنده بودن سلول‌ها نیز توسط تریپان‌بلو و لام نئوبار بررسی شد که به‌میزان ۹۸٪ بود. برای اثبات پیوند فیبرونکتین بر روی داربست‌ها از تست طیف‌سنجی فروسرخ استفاده شد (انجام شده در دانشکده علوم

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]



شکل ۱: سلول‌های کشت داده شده بر بستر نانوالیاف در روز ۱۴ کشت



نمودار ۱: آنالیز شمارش کلنی * P<۰/۰۵، ns: non significant، 3D: سه بعدی، 2D: دو بعدی

پایه دانشگاه تهران). تعداد ۵۰،۰۰۰ سلول از سلول‌های جدا شده و تایید شده از نظر خلوص، در محیط کشت دو بعدی در حضور محیط کشت StemSpan و فاکتورهای رشد اشاره شده کشت داده شد. محیط سلول‌ها هر دو روز یک‌بار تعویض گردید.

همین تعداد سلول نیز بر روی داربست نانو الیاف کشت گردید. در شکل ۱ نمای کلی از محیط سه‌بعدی مورد استفاده آورده شده است. پس از گذشت دو هفته از کشت سلول‌ها، با شمارش سلولی مشخص شد که تعداد سلول‌های تکثیر شده بر روی بستر نانوالیاف کمتر از پلیت کشت سلولی بوده است.

به‌منظور تعیین میزان توان کلنی‌زایی سلول‌ها تست سنجش کلنی انجام شد که جهت انجام تست، سلول‌های کشت شده در پلیت، همچنین کشت شده بر روی بستر نانوالیاف از روی نانوالیاف برداشته شد و در محیط MethoCult کشت داده شد. آنالیز نتایج حاصل از شمارش تعداد کلنی‌های تشکیل‌شده از سلول‌های به‌دست آمده از محیط دو و سه‌بعدی در نمودار ۱ نشان داده شده است.

نتایج حاصل رابطه معناداری را بین تعداد کلنی‌ها در محیط دو و سه‌بعدی نشان می‌دهد.

بحث

خون بند ناف منبع جایگزین مناسبی از سلول‌های بنیادی خونساز می‌باشد که در پیوندهای آلوگرافت در بیمارانی که دهنده‌ی مناسب و سازگار از نظر HLA در اختیار ندارند معرفی شده است.[۳و۴] مسئله‌ای که در پیوند سلول‌های بنیادی خونساز خون بند ناف در افراد بالغ مطرح است، تعداد ناکافی سلول‌های بنیادی اولیه موجود در یک واحد خون بند ناف می‌باشد و این امر استفاده از این منبع را در بیماران بالغ محدود کرده است.[۶] تکثیر سلول‌های بنیادی در محیط خارج از بدن به‌عنوان راهکاری مناسب جهت بهبود این محدودیت پیشنهاد شده است.

سلول‌های بنیادی در بستری تحت عنوان ماتریکس خارج سلولی قرار گرفته‌اند که این بستر به‌طور عمده متشکل از پلی‌ساکاریدها و پروتیین‌های رشته‌ای از جمله کلاژن، فیبرونکتین و لامینین می‌باشد. علاوه بر نقش ساختاری ماتریکس به‌عنوان بستری جهت استقرار، اتصال و تکثیر سلول‌ها، این بستر نقش مهمی را در روند پیام‌دهی سلولی ایفا می‌کند.[۱۵] به‌تازگی روش ریسندگی الکتریکی (الکتروریسی، Electrospinning) جهت ساخت بسترهای نانوالیاف با ساختاری مشابه ماتریکس خارج سلولی به‌کار گرفته شده است.[۱۴-۱۲]

PES، پلیمری سنتتیک، زیست سازگار و غیر زیست تخریب‌پذیر بوده که به‌طور وسیعی به‌عنوان غشایی جهت همودیالیز، فیلتراسیون و فن‌آوری بیوراکتورها مورد استفاده قرار می‌گیرد.[۱۶] جهت شبیه‌سازی بیشتر بسترهای نانوالیاف با ماتریکس خارج سلولی، علاوه بر کاهش قطر الیاف و افزایش تخلخل، روش‌های مختلفی از جمله طراحی کوپلیمرها، ایجاد تغییرات سطحی مانند کونژوگاسیون کلاژن، فیبرونکتین و سایر مواد شیمیایی مورد بررسی قرار گرفته‌اند.[۱۵] پیام‌دهی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]

ماتریکس خارج سلولی به‌طور عمده به‌واسطه اینتگرین‌ها انجام می‌شود و میانکنش‌های بین اجزای ماتریکس و اینتگرین‌ها، حاکی از نقش مهم آن در فعالیت‌های بیولوژیک از جمله اتصال سلولی، تکثیر و تعادل بین خودنوسازی و تمایز می‌باشد.[۱۷]

پژوهش‌های انجام‌شده نشان داده است که توانایی اتصال و تکثیر سلول‌های بنیادی به‌دست آمده از بافت آدیپوز بر روی این بستر که توسط توالی‌های پپتیدی فیبرونکتین کونژوگه شده‌اند، افزایش یافته است.[۱۶] در پژوهش حاضر به‌منظور تکثیر خارج از بدن سلول‌ها، از بستر نانوالیاف PES کونژوگه شده با فیبرونکتین که پایداری اکسیداتیو، حرارتی، هیدرولیتیک و مکانیکی مناسبی داشته، استفاده شد و اثر خصوصیات مکان‌نگاری (توپوگرافی) سطح بستر بر روی تکثیر مورد بررسی قرار گرفت.[۱۷] در این مطالعه نشان داده شد که فیبرونکتین کونژوگه شده بر سطح بستر، به‌طور مؤثری اتصال و تکثیر سلول‌های بنیادی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. یافته‌های ما همچنین بر اهمیت خصوصیت مکان‌نگاری بستر و ارتباطات سلول- سوبسترا بر تنظیم تکثیر و خودنوسازی سلول‌ها در محیط واجد سایتوکین تأکید می‌کند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز خون بندناف بر روی بسترهای نانوالیاف زیست سازگار" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۹۱-۱۳۹۰ می‌باشد که با حمایت دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

References

1. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995;346(8969):214-9.
2. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998;339(22):1565-77.
3. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001;97(10):2962-71.
4. Kleen TO, Kadereit S, Fanning LR, Jaroscak J, Fu P, Meyerson HJ, et al. Recipient-specific tolerance after HLA-mismatched umbilical cord blood stem cell transplantation. *Transplantation* 2005;80(9):1316-22.
5. Frassoni F, Podesta M, Maccario R, Giorgiani G, Rossi G, Zecca M, et al. Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir compared with bone marrow transplantation. *Blood* 2003;102(3):1138-41.
6. Dravid G, Rao SG. Ex vivo expansion of stem cells from umbilical cord blood: expression of cell adhesion molecules. *Stem Cells* 2002;20(2):183-9.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY, McAfee S, Dey BR, Attar E, et al. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(1):82-9.
11. Dzierzak E. Hematopoietic stem cells and their precursors: developmental diversity and lineage relationships. *Immunol Rev* 2002;187:126-38.
12. Lim SH, Mao HQ. Electrospun scaffolds for stem cell engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(12):1084-96.
13. Szentivanyi A, Chakradeo T, Zernetsch H, Glasmacher B. Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63(4-5):209-20.
14. Ma Z, Gao C, Gong Y, Ji J, Shen J. Immobilization of natural macromolecules on poly-L-lactic acid membrane surface in order to improve its cytocompatibility. *J Biomed Mater Res* 2002;63(6):838-47.
15. Kuo YC, Yeh CF. Effect of surface-modified collagen on the adhesion, biocompatibility and differentiation of bone marrow stromal cells in poly(lactide-co-glycolide)/chitosan scaffolds. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;82(2):624-31.
16. Sperling C, Houska M, Brynda E, Streller U, Werner C. In vitro hemocompatibility of albumin-heparin multilayer coatings on polyethersulfone prepared by the layer-by-layer technique. *J Biomed Mater Res A* 2006;76(4):681-9.
17. Hayashi Y, Furue MK, Okamoto T, Ohnuma K, Myoishi Y, Fukuhara Y, et al. Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 2007;25(12):3005-15.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]

TUMJ Tehran University Medical Journal, February 2015; Vol. 72, No. 11: 789-793 Brief Report

Expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem cell on biocompatible nanofiber scaffolds: *brief report*

Fatemeh Eskandari M.Sc.[1]
Masoud Soleimani Ph.D.[1*]
Nasim Kalantari Ph.D.[1]
Mehdi Azad Ph.D.[2]
Amir Allahverdi M.Sc.[1]

1- Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2- Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medicine, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran.

* Corresponding author: P.O.Box:14115-331, Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-88015050
E-mail: soleim_m@modares.ac.ir

Abstract

Received: 04 May 2014 Accepted: 27 Dec. 2014 Available online: 09 Feb. 2015

Background: Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a therapeutic approach in treatment of hematologic malignancies and incompatibility of bone marrow. Umbilical cord blood (UCB) known as an alternative for hematopoietic stem/ progenitor cells (HPSC) for in allogenic transplantation. The main hindrance in application of HPSC derived from umbilical cord blood is the low volume of collected samples. So, ex vivo expansion of HPSCs is the useful approach to overcome this restriction. Synthetic biomaterials such as nanofibers is used to produce synthetic niches. The aim of this study was the ex vivo expansion of hematopoietic stem cells on biocompatible nanofiber scaffolds.

Methods: This study was done at Tarbiat Modares University from November 2012 to June 2013 and was a research study. Umbilical cord blood $CD133^+$ hematopoietic stem cells were separated using MidiMacs (positive selection) system by means of monocolonal antibody (microbeads) CD133. Flow cytometry was used to assess the purity of cells. Cell culture was done on plate (2 Dimensional) and fibronectin conjougated polyether sulfone nanofiber scaffold (3 Dimensional). Colony assay test was used to asses the ability of colonization of cells.

Results: Cell count analysis revealed the expansion of hematopoietic stem cells in cell culture plate (2D environment) and on nanofiber scaffold (3D environment) after 2 weeks. Expansion of cells in 2D environment was greater than 3D condition. Colony assay test revealed that the colonization ability of cells decreased after 2 weeks, but this decrease was lower in scaffold culture than plate culture.

Conclusion: This study demonstrated that umbilical cord blood $CD133^+$ hematopoietic stem cells can expand on fibronectin conjugated polyether sulfone scaffold and we can use this system for expanding of cells in vitro situation.

Keywords: Hematopoietic stem cells, nanofibers, polyether sulfone, umbilical cord blood.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-29]