

مهار مسیر TGF-b به وسیله تکنیک RNAi در سلول‌های بنیادی خون ساز کشت داده شده روی داربست سه بعدی DBM "ماتریکس استخوانی معدنی زدا شده"

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۹/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۱۶

چکیده

زهرالسادات هاشمی^۱، مهدی فروزنده مقدم^{۱*}، مسعود سلیمانی^۲، مریم حفیظی^۳، ناصر امیری زاده^۴

۱- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- گروه بیولوژی سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات فناوری بن‌باخته، تهران، ایران
۴- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: تهران، تقاطع بزرگراه چمران و جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵
تلفن: ۸۴۸۳۸۶۱-۰۲۱
E-mail: foroz@modares.ac.ir

زمینه و هدف: خون بندناف در پیوند مغز استخوان، به علت دوز پایین سلول‌های CD34+ دارای محدودیت‌هایی است که می‌بایست این سلول‌ها مورد تزاید قرار گیرند. تکثیر سلول‌های بنیادی با استفاده از افزایش فعالیت خود تکثیری آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی روی داربست DBM (ماتریکس استخوانی معدنی زدا شده) پوشیده شده با سلول‌های پروژنیاتور مزانشیمی یعنی سلول‌های بنیادی سوماتیک غیر محدود شده (USSC) پیشنهاد می‌شود. مسیر TGF-b از عوامل مهم مهاری برای فعالیت خود تجدید شونده سلول‌های بنیادی است که در این تحقیق از هم‌زمانی کشت برون تن (Ex vivo) و مهار مسیر TGF-b با کمک تکنیک RNAi استفاده شد. روش بررسی: سلول‌های USSC از خون بندناف جدا شده و سپس روی داربست DBM و هم کف پلیت، به عنوان لایه مغزی، پوشش داده شدند. سلول‌های CD34+ با روش Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) از جفت انسانی تخلیص و در شرایط دو بعدی و سه بعدی هم کشتی، با siRNA علیه TGFbR2 تیمار شدند. میزان سرکوب بیان ژن مربوطه با Real-Time PCR کمی بررسی شدند. در نهایت شمارش سلولی، فلوسایتومتری و فعالیت کلنی‌زایی سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌ها: کشت سه بعدی به همراه مهار ژن TGFbR2 موجب افزایش قابل توجه $41 \pm 0.7\%$ برابر سلول‌های CD34+ ولی افزایش نسبت تزاید در دو بعدی ساده بیش از سه بعدی بود و نیز بیش‌ترین مهار بیان ژن، بیش‌ترین افزایش در مارکر سطحی با آنالیز فلوسایتومتری در حالت کشت دو بعدی ساده نشان داده شد ($P < 0.05$). نتیجه‌گیری: بنابراین از نظر موثر بودن سیستم انتقال RNAi، کشت دو بعدی ساده نسبت به سه بعدی کارآمدتر بود به طوری که سلول‌ها آزادی کم‌تر داشته و بیش‌تر با سلول‌های لایه مغزی درگیر بودند.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی خون بندناف، سلول‌های USSC، داربست DBM، مسیر TGF-b، siRNA.

مقدمه

خونی نیاز به دوز بالایی از سلول‌های بنیادی خون‌ساز است. در اثر شیمی‌درمانی یا اشعه درمانی، سلول‌ها دچار آسیب می‌شوند و نیاز به تجدید آن‌ها می‌باشد. در این شرایط کشت سلولی یک روش کمک‌کننده است. در پیوندهای چندانگانه 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 و ویروسی نیاز به سلولی در فاز تقسیم است. در پیوند مغز استخوان Bone Marrow Transplant (BMT) که افراد بسیاری با آن برای بیماری‌های مادرزادی

امروزه سلول‌های بنیادی خون‌ساز Hematopoietic Stem Cells (HSCs) با دست‌ورزی‌های ژنتیکی به منظور تمایز و یا تزاید برای اهداف بالینی به کار برده می‌شوند^۱ با افزایش محتوای سلول‌های بنیادی در خون، درمان موثرتر انجام می‌شود و حتی می‌توان از حجم‌های کم خون بندناف که در حالت عادی کنار گذاشته می‌شوند نیز استفاده کرد. امید است که با ازدیاد این سلول‌ها از طریق Ex vivo به این هدف رسید^{۲,۳} برای درمان بسیاری از بیماری‌های

طی پیوندهای متوالی شاهد نوعی از دست رفتن ذاتی توانایی خود تکثیری در سلول‌های بنیادی خون‌ساز هستیم که به دلیل خروج این سلول‌ها از فاز اولیه و تا حدودی به سمت تمایز رفتن است.^{۱۴} از این رو جستجوی راهی برای تزاید آن‌ها در جهت عدم تمایز موقت آن‌ها و البته با حفظ پتانسیل تمایز به رده‌های مختلف خونی، ضروری می‌باشد. در این راستا با بهره‌گیری از روش‌هایی همانند افزایش بیان فاکتورهای رونویسی که در افزایش فعالیت خود تکثیری نقش دارند، و یا مهار فاکتورهای رونویسی که باعث مهار فعالیت خود تکثیری می‌شوند، می‌توان راهی مناسب جهت رسیدن به افزایش تزاید سلول‌های بنیادی پیدا کرد. در این بین عوامل خارج سلولی یا آگروژن نیز در القا یا مهار فعالیت خود تکثیری حایز اهمیت هستند.

از جمله مهم‌ترین این عوامل می‌توان به عوامل القا کننده تکثیر از قبیل Notch, Wnt, BMP-4, Sonic hedgehog و دیگر فاکتورهای رشد و یا عوامل مهارکننده مانند TGF- β و TNF- α و نیز به سایر سایتوکین‌های مهاری اشاره کرد.^{۱۵} Transforming Growth Factor- β (TGF- β) یک سایتوکین چند کاره (Multifunctional) می‌باشد. این سایتوکین در فرآیند جنین‌زایی، تمایز سلولی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوزیس) و نیز چرخه سلولی دخالت دارد و توسط سلول‌های خون‌ساز به دو صورت اتوکراین و پاراکراین ترشح می‌شود.^{۱۷،۱۸} که می‌تواند سلول‌ها را در مرحله GI چرخه سلولی نگه داشته و منجر به تمایز سلول‌ها شود.^{۱۹-۲۱} این سایتوکین موجب مهار ورود به میتوز و در نتیجه باعث مهار فعالیت خود تکثیری است.^{۲۲-۲۵}

تحقیقات جدید نشان‌دهنده نقش این سایتوکین در القای حالت خفتگی در بدن است.^{۲۶} حال آن‌که در مطالعات قبلی این نقش برای سایتوکین TGF- β رد شده بود.^{۲۷} به دلیل این‌که در محیط کشت آزمایشگاهی و در کشت طولانی‌مدت سلول‌های مغز استخوان و نیز در خود بافت داربست‌های مهندسی بافت با منشا مغز استخوان، هم پروتیین و هم RNA پیامبر آن موجود است، بنابراین برای مهار این مسیر سیگنال‌دهی به سراغ گیرنده نوع دو که گیرنده اصلی در این مسیر است می‌رویم. این گیرنده سرین-تریونین کینازی عرضی غشایی (Transmembrane) و با حذف آن، TGF- β شناسایی نشده و مسیر سیگنال‌دهی متوقف می‌شود. بنابراین در این تحقیق سعی شده است تا با انجام هم‌زمان استفاده از کشت سه بعدی و مهار مسیر

و اکتسابی خونی درمان می‌شوند،^۴ نیاز به دوز بالایی از سلول‌های بنیادی یا سلول‌های پیش‌ساز خونی می‌باشد.^۵ سلول‌های CD34+ در BMT بیش‌تر از منبع خون بدناف به دلیل پایین بودن آلوآنتی‌ژن‌ها (Alloantigen) و آنتی‌ژن‌های (HLA Human Leukocyte Antigen) سطحی و در نتیجه عدم نیاز به سازگاری بالایی بین دهنده و گیرنده، تهیه می‌گردند.^۶ تعداد کل سلول‌های به‌دست آمده از این منبع در سطح کم‌تری می‌باشد^۷ که برای غلبه بر این مشکل چند راه حل ارایه گردیده است: پیوند هم‌زمان چندین واحد UCB، تزریق هم‌زمان سلول‌های UCB CD34+ با دوز کم همراه با سلول‌های استرومال BM خود بیمار یا فرد اهدا کننده، تکثیر Ex vivo سلول‌های UCB CD34+ مانند کشت سه بعدی و سپس تزریق سلول‌های تکثیر شده، دست‌کاری ژنتیکی سلول‌های بنیادی جهت افزایش توانایی خود تجدیدشوندگی و تزاید این سلول‌ها.^{۸،۹} راه حل ارایه شده در این تحقیق، ادغام دو راه حل آخر است. باید گفت پودرهای استخوانی را می‌توان به‌عنوان داربست برای پیوند استخوان به‌کار برد زیرا که کارایی بیش‌تر نسبت به روش‌های گذشته و سایر مواد دارند. این مواد خود دارای قدرت تحریک‌کنندگی برای بافت استخوان هستند زیرا که دارای پروتیین‌های زمینه‌ای کلاژن و نیز فاکتورهای رشد مثل خانواده‌ی TGF می‌باشند که باعث وجود خاصیت تحریک‌کنندگی در این داربست‌ها شده است.^{۱۰،۱۱} تحقیقات روی داربست Demineralized Bone Matrix (DBM) نشان داده است که این داربست برای تزاید سلول‌های خون‌ساز مناسب می‌باشد.^{۱۱} این داربست ماتریکس استخوانی است که از بافت طبیعی استخوان تهیه و مواد معدنی آن با کمک استخراج اسیدی حذف شده است تا مواد پروتیینی بستر آشکار شده و در اختیار سلول‌های فیدر قرار گیرند. این داربست به همراه لایه تغذیه‌کننده‌ای از سلول‌های چسبنده پروژنیاتور مزانشیمی یا سلول‌های بنیادی سوماتیک غیر محدود شده Unrestricted Somatic Stem Cells (USSC)،^{۱۲،۱۳} می‌تواند تا حدودی ریزمحیط (Microenvironment) سه بعدی مغز استخوان را تقلید کند. همواره دست‌ورزی ژنتیکی روی مسیرهای مختلف به منظور افزایش قدرت تکثیر سلول‌ها انجام شده است. القای فاکتورهای رشد و رونویسی و یا مهار پاره‌های دیگر از فاکتورها و سایتوکین‌ها در این زمینه بررسی شده‌اند. در طی فرایند تزاید، سلول‌های بنیادی توانایی بنیادی خود را از دست داده و به سمت تمایز می‌روند. هم‌چنین در

TGF- β به تازید قابل توجهی از سلول‌های بنیادی خون‌ساز رسید. هم‌چنین ساختار شبیه‌سازی شده آشیانه سلولی (Niche) سلول‌های بنیادی می‌تواند به عنوان مدلی برای حالت *In vivo* باشد به طوری که سرکوب یک مسیر سیگنال‌دهی با کمک تکنیک RNAi در محیط آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گیرد تا شدت اثر سیستم انتقال siRNA در حالت دو بعدی و سه بعدی بررسی شود.

روش بررسی

نوع مطالعه علمی پژوهشی می‌باشد که در سال ۱۳۸۹ و در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

جمع‌آوری نمونه و جداسازی سلول‌های USSC: واحدهای خون بندناف بر اساس راهکارهای مصوب کمیته اخلاق پزشکی در دانشگاه تربیت مدرس و بیمارستان شریعتی جمع‌آوری شدند. از این افراد برای گرفتن نمونه به منظور تهیه جامعه آماری رضایت‌نامه گرفته شد. در ابتدا با روش معمول فایکول، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف جدا شده و سپس سلول‌های USSC بر اساس پروتکل Kogler G. از خون بندناف جداسازی، نگهداری و پاساژ داده شدند.^{۲۸-۳۰}

کشت سلول‌های USSC روی چاهک و داربست DBM: سلول‌های USSC جداسازی شده، روی چاهک‌های ۴۸ تایی به عنوان لایه مغذی و پوشاننده سطح دو بعدی کشت داده شدند. پس از رسیدن به تراکم ۸۰٪، این لایه سلول‌های USSC با میتومايسين C (Mitomycin) به میزان ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ جهت هم‌کشتی با سلول‌های خون‌ساز CD34+ غیرفعال شدند. به طوری که فعالیت میتوزی لایه پشتیبان متوقف شد. میتومايسين فعالیت آنتی‌بیوتیک و ضد توموری دارد و با اتصال متقاطع به DNA از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند.^{۳۱} برای پوشش دادن سلول‌های استرومال USSC روی اسلایس‌های داربست DBM (تهیه شده از مرکز بانک پیوند مغز استخوان ایران) به عنوان لایه مغذی و پوشاننده سطح سه بعدی نیاز به سه فلاسک T75 با تراکم ۸۰٪ است (در مجموع ۳×۱۰^۶ سلول). قبل از عمل کاشت سلولی، داربست‌ها باید برای اتصال سلول‌ها مستعد شده و منافذ آن باز شوند. بدین منظور به مدت ۲۴ ساعت اسلایس‌های داربست در ژلاتین ۰/۱٪ در بافر PBS غوطه‌ور گشته و انکوبه شدند. پس از این مدت اسلایس‌های داربست به مکعب‌هایی با قطر شش تا هشت

میلی‌متر برش داده شدند. این مکعب‌ها در پلیت شش خانه و به صورت یک ردیف و تا حد امکان فشرده، چیده شدند. سپس به روی این قطعات سوسپانسیون غلیظ سلولی در محیط DMEM به همراه FBS (به میزان ۳۰٪ در حجم محیط کشت) اضافه گشت و به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شد. سپس هر قطعه داربست به آرامی به یک چاهک پلیت ۴۸ تایی منتقل شده و به مدت سه روز انکوبه شدند تا تراکم ۸۰٪ به دست آید. در این مدت سلول‌های چسبیده 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 چند داربست برای انجام عکس‌برداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning electron microscope) برداشته (در دانشکده الکترونیک دانشگاه تهران آزمایشگاه لایه نازک) و بقیه با میتومايسين C غیرفعال شدند. غیرفعال‌سازی با کمک اشعه گاما نیز انجام می‌شود ولی در اینجا اسلایس‌های داربست DBM دارای تخلخل هستند و نمی‌توان به طور کامل تمام نقاط را تحت پوشش اشعه قرار داد.

هم‌کشتی سلول‌های CD34+ با USSC: در نهایت سلول‌های CD34+ با روش معمول فایکول و سپس با استفاده از آنتی‌بادی نشان‌دار شده با مگنت (Miltenyi Biotech, BergischGladbach, Germany) و ستون‌های روش LS separation columns-MACS (Miltenyi Biotech متعلق به کشور آلمان) طبق پروتکل شرکت سازنده، از خون بندناف جداسازی شدند. پس از تعیین میزان زنده بودن سلول‌ها و تایید با روش فلوسایتومتری، به سه حالت کشت داده شدند:

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

حالت دوم: هم‌کشتی سلول‌های خون‌ساز با فیدری از سلول‌های USSC. حالت سوم: هم‌کشتی سلول‌های خون‌ساز با فیدر و به همراه داربست DBM. در کلیه این سه حالت از محیط کشت اختصاصی سلول‌های بنیادی خون‌ساز یعنی محیط Stemspan (فرم تجاری آن از شرکت Stem cell technologies در کشور کانادا به نام StemSpan SFEM تهیه شد) به همراه فاکتور رشد سلول بنیادی Stem Cell Factor (SCF)، ترومبوپوئین (Thrombopoietin - TPO)،flt-3 لیگاند (FMS-like tyrosine kinase 3-ligand)، هر یک به میزان ۵۰ ng/ml استفاده

برای طراحی آغازگر دو ژن به کار رفته در این تحقیق (بتا-اکتین و TGFβ2) از نرم‌افزار ۶ Oligo استفاده شد. به ترتیب پنج دقیقه در 95°C ، 15°C ثانیه در 95°C ، 15°C ثانیه در 56°C ، 25°C ثانیه در 72°C ، 10°C ثانیه در 72°C برای مراحل واسرشتگی اولیه (Initial denaturation)، واسرشتگی ثانویه، اتصال (Annealing)، بسط (Extension) و بسط نهایی به کار برده شد.

این مراحل برای ۴۵ چرخه تکرار گشت و در نهایت ذوب (Melting) در Rotor-Gene Real-Time PCR انجام شد. واکنش‌ها به صورت دوتایی بود و میانگین آن‌ها ارایه شد. برای اندازه‌گیری مقدار و بیان نسبی ژن (Relative quantitation) از روش Pfaffl استفاده شد که در آن مقدار Threshold Cycle (TC) برای ژن هدف هم در حالت کنترل و هم در حالت تیمار شده با siRNA و نیز ژن کنترل درون زاد (در این‌جا از ژن بتا-اکتین مورد ارزیابی قرار گرفت) هم در حالت کنترل و هم در حالت تیمار شده با siRNA، در فرمول Pfaffl قرار داده شد تا بیان ژن با ژن کنترل درون زاد نرمالیزه شود و در نهایت کاهش بیان ژن به دست آمد.

فلوسایتومتری: قبل و بعد از تیمار با RNAi و ازدیاد سلولی، سلول‌های CD34+ از نظر مارکر سطح سلولی با استفاده از فلوسایتومتری PARTEC Germany ارزیابی شدند. تعداد ۱۰۵ سلول شمارش شده و با بافر PBS حاوی ۵٪ FBS شستشو شده و با استفاده از آنتی‌بادی‌های کونژوگه شده با فلوروکروم (Fluorescein) (FITC)- conjugated Antibodies (Isothiocyanate) 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 FloMax استفاده شد.

آزمون کلونی‌زایی: سلول‌های ازدیاد شده از گروه کنترل و آزمون برای بررسی کلنی‌زایی با استفاده از محیط Methocult (فرم تجاری آن Methocult H4435 Enriched) و پروتکل شرکت سازنده (Stem cell technologies) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده در نرم‌افزار SPSS و پیراست ۱۶ بررسی شدند و با کمک Student's t-test، P محاسبه گشت و داده‌ها از لحاظ معنی‌دار بودن و نبودن بررسی شدند و مقادیر $P < 0.05$ معنی‌دار می‌باشد.

گشت. TGFβ2 علیه siRNA^{۲-۴} ترانسفکشن: برای انجام ترانسفکشن کلیه مواد از شرکت Invitrogen تهیه گشت. در این‌جا از روش ترانسفکشن جلویی (Forward transfection) استفاده شد به طوری که روز قبل از ترانسفکشن حدود ۲۵ تا ۳۵ هزار سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط فاقد آنتی‌بیوتیک و سرم به هر خانه پلیت ۴۸ خانه در سه حالت کشت: کشت ساده، کشت روی فیدر و کشت سه بعدی در DBM منتقل شد. برای هر حالت کشت، دو گروه در نظر گرفته شد: گروه اول با Stealth Select RNAi TM siRNA بر علیه TGFβ2 و گروه دوم با StealthTM RNAi negative control duplexes تیمار شدند. برای بررسی میزان ترانسفکشن در گروه کشت ساده نیز از Block-iTTM alexa fluor red fluorescent oligo استفاده شد. کلیه الیگونوکلیوتیدهای مذکور به میزان ۲/۴ پیکومول در ۲۰ میکرولیتر Opti-MEM در یک تیوب و حدود ۰/۴ میکرولیتر از LipofectamineTM RNAiMAX در ۲۰ میکرولیتر Opti-MEM در تیوب دیگری اضافه شدند. پس از گذشت زمان پنج دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، محتویات دو تیوب به یکدیگر اضافه شدند و پس از گذشت ۲۰ دقیقه کمپلکس نهایی تشکیل شده و آن را به خانه‌های پلیت اضافه می‌کنیم. با اضافه کردن این کمپلکس حجم نهایی به ۲۴۰ میکرولیتر می‌رسد که غلظت نهایی الیگونوکلیوتید به ۱۰ نانومول می‌رسد. به آرامی پلیت را به سمت جلو و عقب تکان داده تا به خوبی کمپلکس با محیط کشت مخلوط شود. سپس پلیت‌ها در انکوباتور 37°C و $5\% \text{CO}_2$ گذاشته و می‌توان بعد از شش ساعت محیط سلولی را تعویض کرد.

اندازه‌گیری کمی میزان سرکوب بیان ژن TGFβ2 با استفاده از Real-Time PCR کمی (Quantitative Real-Time PCR (QRT-PCR): بر اساس پروتکل شرکت سیناژن و محلول RNXTM-plus، RNA کل سلولی تخلیص گشت. این عمل در فواصل ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن انجام شد. سپس محلول حاصل شده با (Fermentase) DNaseI تیمار گشته و برای سنتز cDNA از آنزیم Revert AidTM M- Reverse Transcriptase و پرایمر MuLV Random hexamer بر اساس شرکت سازنده (Fermentase) استفاده شد. برای انجام واکنش به ترتیب از مخلوط اصلی (Master Mix-Takara)، آغازگر (5-Primer) پیکومول) و cDNA (۵۰ نانوگرم) به میزان شش، یک و یک میکرولیتر را مخلوط کرده و با آب مقطر حجم به ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد.

یافته‌ها

سه حالت کشت و در دو گروه تیمار شده با siRNA و کنترل منفی شمارش شدند. این شمارش ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن انجام گشت. همان‌طور که اشاره شد ترانسفکشن در روز سوم پس از جداسازی انجام گشت و بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت از زمان ترانس فکشن از نظر میزان بیان نسخه RNA (Transcript) ژن TGF β 2 با استفاده از QRT-PCR ارزیابی شدند. در نهایت ۹۶ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌ها از نظر ایمونوفلوئوسانس با فلوسایتمتری و از نظر عملکردی با آزمون کلونی‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. بنابراین کل روند تراید در طی هشت روز انجام گشت. جدول ۱ نشان می‌دهد که بیش‌ترین تعداد سلول در گروه تیمار شده و در ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن مشاهده شد. این تراید در حالت کشت روی فیدر به وضوح قابل مشاهده بود.

آزمون QRT-PCR: برای سنجش تغییرات ایجاد شده در میزان بیان ژن مورد نظر از آزمون QRT-PCR استفاده شد. بیان نسخه RNA برای ژن بتا-اکتین و ژن TGF β 2 در دو گروه کنترل و تیمار شده با siRNA بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد. میزان نسبت این دو رونوشت با روش Pfaffl قانونمند شد. در نهایت نتایج حاکی از آن بود که برای هر سه حالت کشت، بیش‌ترین کاهش بیان ژن حدود ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن حاصل بوده است. اما در بین این سه حالت، بیش‌ترین کاهش بیان ژن TGF β 2 در کشت ساده مشاهده شد که در حدود ۵۱٪ بود (نمودار ۱).

بررسی فلوسایتمتریک سلول‌های تراید یافته از نظر نشان‌گر CD34: در روز اول (روز جداسازی) و در روز هشتم سلول‌های HSCs در سه حالت کشت و برای هر حالت در دو گروه تیمار شده با siRNA علیه TGF β 2 و نیز کنترل، از نظر میزان نشان‌گر سطحی CD34 ارزیابی شدند. تعداد ۱۰۰ هزار سلول برای هر گروه برداشت شد و پس از انکوبه شدن با آنتی‌بادی علیه نشان‌گر CD34 نشان‌دار شده با FITC و هم‌چنین ایزوتیپ کنترل، نتایج فلوسایتمتری مطالعه شدند. به طور میانگین میزان بیان CD34 در روز اول پس از جداسازی حدود ۸۹٪ بود و در روز هشتم میزان سلول‌های CD34+ در جمعیت سلولی افت کرده و به میزان ۲۷/۲، ۲۰/۳ و ۱۴/۱ درصد برای گروه کنترل به ترتیب در سه حالت کشت ساده، کشت روی فیدر و کشت روی DBM رسید. ولی در گروه تیمار شده با siRNA علیه TGF β 2، حدود ۳۰ هزار سلول با آنالیز فلوسایتمتری ۸۹٪ استفاده شد، تعداد

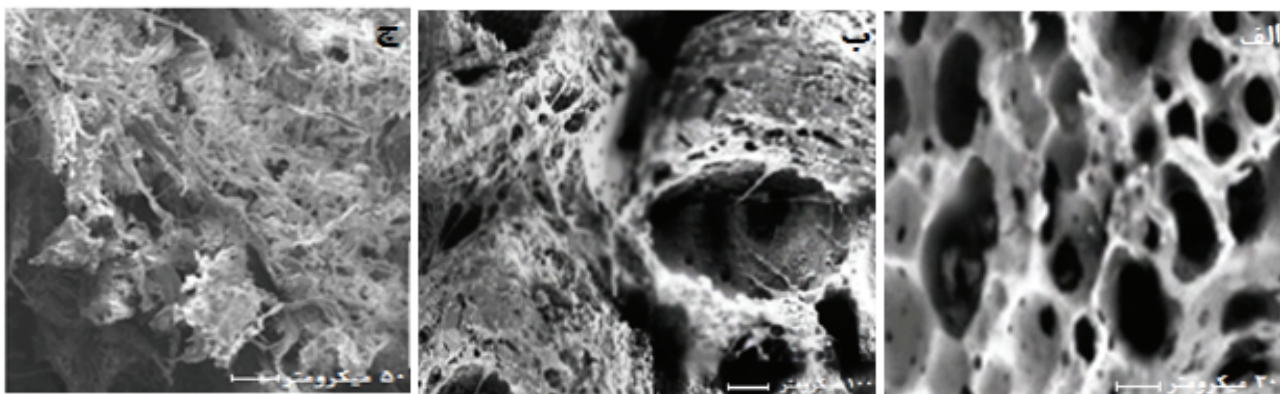
کشت سلول‌های USSC: سلول‌های USSC پس از جداسازی از خون بندناف به مدت دو هفته در محیط کشت اختصاصی نگه‌داری شدن تا کلنی‌های اولیه تشکیل شوند. این سلول‌ها در ابتدا به فرم ستاره‌ای شکل هستند ولی پس از رسیدن به تراکم ۸۰٪ کشیده، موازی و تا حدودی دوکی شکل شدند (شکل ۱-ب). این سلول‌ها برای پوشاندن سطح داربست DBM و هم‌چنین کف پلیت ۴۸ خانه به کار برده شدند. پس از رسیدن به تراکم مناسب این لایه تغذیه کننده (سلول‌های فیدر USSC) با میتومايسين C غیر فعال گشتند. چند قطعه از داربست DBM حاوی سلول‌های فیدر برای عکس‌برداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) به کار رفتند. تصاویر SEM از سطح داربست DBM تخلخل ۴۰٪ را نشان می‌دهد. داربست DBM پوشیده شده از سلول‌های فیدر سطحی روشن‌تر دارد و سلول‌ها به‌طور مجزا به‌صورت نوارهای کشیده و روشن قابل مشاهده هستند (شکل ۱).

ترانسفکشن سلول‌های CD34+: سلول‌های CD34+ با روش MACS از خون بندناف جداسازی شدند و سپس به تعداد ۳۰ هزار سلول در سه حالت: کشت ساده، کشت روی فیدر و کشت سه بعدی به پلیت ۴۸ خانه اضافه شد. محیط به‌کار رفته محیط کشت اختصاصی سلول‌های بنیادی StemSpan همراه با فاکتورهای SCF، TPO و fIt-3 می‌باشد. هر حالت با Stealth™ RNAi علیه TGF β 2 و نیز Stealth™ RNAi negative control ترانسفکت شدند. برای بررسی بازده و کارایی ترانسفکشن از BLOCK-iT™ alexa fluor red استفاده شد. پس از شش تا هشت ساعت از زمان ترانسفکشن، میزان ترانسفکشن در سلول‌های این گروه با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد. به طور میانگین میزان ترانسفکشن حدود ۶۰٪ تخمین زده شد (شکل ۲). ترانسفکشن روز سوم پس از جداسازی سلول‌های CD34+ انجام شد که علت این موضوع مقاومت سلول‌های خفته در برابر ترانسفکشن است. بنابراین با القای رشد در سلول‌های بنیادی خون‌ساز با استفاده از محیط کشت ازدیاد سلول‌های بنیادی و در حضور سایتوکین‌های اولیه، سلول‌های خون‌ساز اولیه بیش‌تر مستعد ترانسفکشن شدند.

نتایج حاصل از شمارش سلول‌های CD34+: سلول‌های CD34+ در

جدول- ۱: شمارش سلول‌های CD34+ در حالات و زمان‌های مختلف

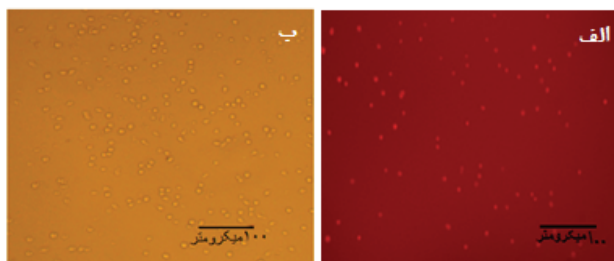
حالت	زمان	روز قبل از انجام ترانسفکشن	۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن		۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن	
			تعداد سلول‌ها	تزیاد سلولی	تعداد سلول‌ها	تزیاد سلولی
کشت دو بعدی ساده	کنترل	۳۰×۱۰ ^۳	(۹۳±۹)×۱۰ ^۳	۳/۱±۰/۳	(۲۱۱±۷)×۱۰ ^۳	۷/۰۵±۰/۲۵
			تست	(۱۶۵±۱۲)×۱۰ ^۳	۵/۵±۰/۴۲	(۴۳۳±۳۰)×۱۰ ^۳
کشت روی فیدر	کنترل	۳۰×۱۰ ^۳	(۱۸۹±۱۵)×۱۰ ^۳	۶/۳±۰/۵۱	(۳۹۰±۱۲)×۱۰ ^۳	۱۲/۹۹±۰/۴
			تست	(۲۹۱±۲۲)×۱۰ ^۳	۹/۷±۰/۷۴	(۶۶۱±۱۰)×۱۰ ^۳
کشت در شرایط سه بعدی DBM	کنترل	۳۰×۱۰ ^۳	(۴۵۰±۱۷)×۱۰ ^۳	۱۵±۰/۵۶	(۸۹۲±۱۹)×۱۰ ^۳	۲۹/۷۳±۰/۶۳
			تست	(۷۱۴±۲۸)×۱۰ ^۳	۲۳/۸±۰/۹	(۱۲۳۲±۲۲)×۱۰ ^۳



شکل - ۱: عکس برداری SEM از سطح داربست DBM. الف) تصویر سطح داربست DBM با کمک میکروسکوپ SEM بدون سلول‌های فیدر به عنوان کنترل. ب و ج) تصویر سطح داربست DBM زمانی که با سلول‌های USSC پوشش داده شده است با اندازه اشاره شده در زیر شکل می‌توان سلول‌های USSC را به‌طور مجزا مشاهده کرد حال آن‌که در تصویر الف سلولی مشاهده نمی‌شود.

سلول CD34+ در این جمعیت سلولی به‌دست می‌آید که برابر با حدود ۲۶۷۰۰ سلول است. بنابراین با توجه به جدول تزیاد سلولی (جدول ۲) و میزان درصد فلوسایتومتری سلول‌ها در روز هشتم، تزیاد سلولی از نظر فنوتیپی به‌دست می‌آید (نمودار ۲).

نتایج حاصل از آزمون کلنی‌زایی: برای بررسی عملکرد سلول‌های HSCs از آزمون کلنی‌زایی استفاده شد. بدین صورت که سلول‌های گروه کنترل و تیمار شده پس از هشت روز تزیاد به مدت دو هفته در محیط نیمه جامد متوکالت (Methocult) نگهداری شدند. بررسی کلنی‌ها نشان داد که کلنی‌های متعلق به گروه آزمون در مقایسه با

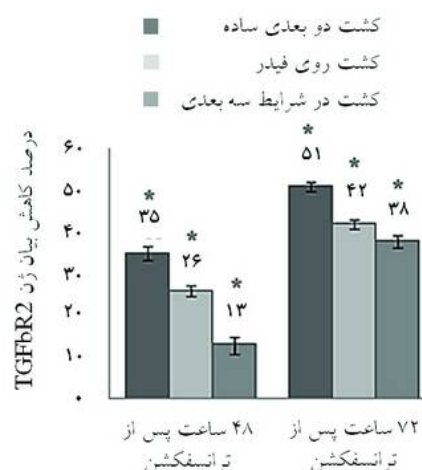


شکل - ۲: سلول‌های HSCs ترانسفکت شده با BLOCK-IT TM Alexa Fluor Red. الف) تصویر با استفاده از نور ماورای بنفش میکروسکوپ فلورسانس. ب) تصویر همین سلول‌ها با نور مرئی میکروسکوپ فلورسانس در همان زمینه قبلی که نشان‌دهنده موفقیت آمیز بودن ترانسفکشن است.

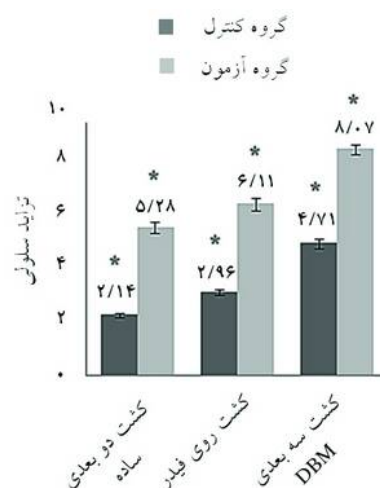
تشکیل‌دهنده کلنی دارد. در گروه آزمون به‌طور میانگین به ازای هر ۱۰۰۰ سلول 90 ± 15 و در گروه کنترل 50 ± 10 کلنی به‌دست آمد. بین سه حالت کشت ساده، روی فیدر و DBM تفاوت محسوسی مشاهده نشد و به‌طور متوسط این تعداد کلنی در گروه آزمون و کنترل هر سه حالت به‌دست آمد.

بحث

سلول‌های USSC تحریک نشده، در حالت طبیعی قادر به تولید مشخص‌سایتوکین‌های GM-CSF، M-CSF، TGF- β ، LIF، CSF، VEGF، IL-1 β ، IL-6، IL-8، IL-11، IL-12، IL-15، SDF-1 α ، HGF می‌باشند. سلول‌های USSC چه در حالت تحریک نشده و چه در حالت تحریک شده با IL-1 β قادر به تولید FLT-3L و TPO نیستند ولی G-SCF را در مقادیر کم یعنی 0.2 pg/ml تولید می‌کنند. سلول‌های USSC در مقایسه با سلول‌های BM-MSC سطح بالاتری از M-CSF، TGF- β ، LIF، SCF، SDF-1 α و IL-11 و سطح پایین‌تری از VEGF، GM-CSF، IL-6 را تولید می‌کنند. سلول‌های USSC در مقایسه با سلول‌های مزانشیمی، تلومراز بلندتری دارند و بنابراین ظرفیت بالایی برای تزیاید دارند. سلول‌های MSC در پاساژهای پایین به سمت پیری رفته و قدرت تکثیر خود را از دست می‌دهند حال آن‌که سلول‌های USSC در پاساژهای بالا نیز هم‌چنان جوان هستند و به سمت پیری نمی‌روند.^{۲۸-۳۰،۳۲} 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 در سه بعد با محیط در تماس باشند، افزایش ترشح فاکتورها را داشته و منجر به افزایش کارایی فیدر می‌شود به‌طوری که غلظت فاکتورها در این ناحیه افزایش می‌یابد. سلول‌های فیدر وابسته به سطح هستند بنابراین با افزایش نسبت سطح به حجم اثر سلول‌های فیدر افزایش می‌یابد. ترشح بیش از حد این فاکتورها و نیز تماس با سلول‌های فیدر منجر به تمایز سلول‌های بنیادی خونساز می‌شود که این سلول‌های CD34+ در این حالت دیگر جمعیتی ناهمگون از سلول‌های خونی می‌باشند که مارکرهای سطحی مختلفی را بیان می‌کنند. هر یک از این سلول‌ها در یک مرحله تمایزی هستند که این سلول‌ها می‌توانند سلول بنیادی خونساز اولیه تا سلول مربوط به رده



نمودار-۱: درصد کاهش بیان ژن TGFβ2 در سلول‌های HSCs ترانسفکشن شده. * $P < 0.05$.



نمودار-۲: میزان ازدیاد سلول‌های CD34 بر اساس ارزیابی‌های ایمنوفلورسنتی در گروه آزمون و کنترل. * $P < 0.05$.

میزان CD34 در جمعیت بیش‌تر بوده و برای سه حالت مذکور به ترتیب $32/6$ ، $24/7$ و $17/5$ درصد مشاهده شد. افزایش میزان CD34 در گروه آزمون هر حالت کشت نسبت به گروه کنترل مربوط به همان حالت، نشان‌دهنده تأثیر مهار علامت‌دهی TGF- β بر میزان بروز این نشان‌گر سطحی است. با توجه به این که در روز اول آزمایش در گروه کنترل اندازه بزرگ‌تری داشتند که نشان از اولیه بودن سلول‌های

گروه آزمون به گروه کنترل در حالت کشت دو بعدی ساده ۲/۴۶ خواهد بود حال آن‌که در کشت روی فیدر این عدد ۲/۰۶ و در کشت سه بعدی DBM به ۱/۷۱ رسیده است. بررسی مارکر سطحی نیز نشان داد که افزایش بیان مارکر CD34 در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل در حالت دو بعدی ساده ۵/۴٪ و در حالت سه بعدی ۳/۴٪ بود. در نهایت با انجام Real time PCR میزان کاهش بیان ژن به‌طور خالص به‌دست آمد که در این‌جا نیز نشان از بیش‌ترین کاهش بیان در کشت دو بعدی ساده داشت. این نتایج نشان‌دهنده موثرتر بودن سیستم انتقال و تحویل siRNA در محیط دو بعدی ساده دارد به‌طوری‌که سلول‌ها در سه بعد آزاد باشند و منافذ آن‌ها برای ورود siRNA بیش‌تر در دسترس باشند. این سلول‌های دست‌ورزی شده با siRNA علیه ژن TGFβ2 قابل استفاده در فاز بالینی می‌باشند زیرا این دست‌ورزی به‌صورت موقت می‌باشد و siRNA در حداکثر ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن از محیط حذف می‌شود و این تیمار به‌صورت دائمی نمی‌باشد. زیرا مسیر TGFβ در بسیاری از مسیرهای سلولی دخالت داشته و پیام‌های حساس سلولی با این فاکتور منتقل می‌شود. هدف نهایی ترازد سلول‌های بنیادی خون‌ساز استفاده آن‌ها در پیوند مغز استخوان است.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی مهار بیان ژن TGF-β در سلول‌های بنیادی خون بندناف بر روی داریست سه بعدی MBA جهت افزایش خودتکثیری این سلول‌ها" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۸۹ و کد ۱۰۱۷۶۳۷ می‌باشد که با حمایت دانشگاه تربیت مدرس اجرا شده است.

خاص باشند. بنابراین در اطراف سلول‌های فیدر غلظت کانونی از فاکتورها و پروتئین‌های مختلف است که باعث درگیری و ایجاد سطح چسبنده برای سلول‌های HSC می‌کند. در حالت سه بعدی این تراکم بیش از دو بعدی همراه با فیدر است. سلول‌های CD34+ که در نزدیک سلول‌های USSC قرار دارند تحت تاثیر ماتریکس خارج سلولی این سلول‌ها هستند و آزادی کافی در سه بعد را ندارند. زمانی که الیگونوکلوئید تداخلی (siRNA) وارد این محیط می‌شود در اطراف سلول‌های CD34+ شناور می‌باشند تا با کمک کمپلکس لیپوفکتامین وارد سلول‌ها شوند. در این حالت برای ورود به سلول‌های خون‌ساز باید از سه بعد کمک بگیرد تا انتقال سلولی با کارایی بهتر انجام شود. برای سلول‌های خون‌ساز که تحت تاثیر سلول‌های فیدر هستند این الیگونوکلوئید باید از سد ماتریکس سلولی عبور کند که احتمال تماس و دسترسی آن به سلول‌های خون‌ساز کاهش می‌یابد و بسیاری از siRNAها به سلول‌های هدف وارد نمی‌شوند و در نهایت نشان از کاهش کارایی سیستم انتقال (siRNA delivery) در حالت سه بعدی می‌باشد. با توجه به جدول ۱ مشاهده می‌شود که نسبت ترازد سلولی در حالت ساده در دو گروه کنترل و آزمون برابر با ۲/۰۴ می‌باشد $\{14/45 \div 7/05 = 2/04\}$ یعنی در حالت ساده گروه تیمار شده نسبت به کنترل خود در حدود دو برابر افزایش تعداد داشته است حال آن‌که این نسبت در کشت روی فیدر ۱/۶۹ و کشت روی DBM به ۱/۳۸ کاهش یافته است. با توجه به نتایج، افزایش فنوتیپی در گروه تیمار شده کشت دو بعدی ساده، ۵/۲۸ و گروه کنترل ۲/۱۴ می‌باشد بنابراین نسبت افزایش فنوتیپی

References

- Alimoghaddam K, Mohyedin M, Vatandoust S, Goliaei Z, Alijanipour P, Forouzia F. Ex vivo-Expansion of Cord Blood Cells and Its Clinical Application. *Yakhteh Med J* 2006;8(3):211.
- Hofmeister CC, Zhang J, Knight KL, Le P, Stiff PJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(1):11-23.
- Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(10):3828-32.
- Bordignon C. Stem-cell therapies for blood diseases. *Nature* 2006;441(7097):1100-2.
- 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.
- To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997;89(7):2233-58
- 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.
- Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 1996;5(3):213-26.
- Hai-Jiang W, Xin-Na D, Hui-Jun D. Expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Am J Hematol* 2008;83(12):922-6.
- 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.

11. Kasten P, Luginbühl R, van Griensven M, Barkhausen T, Krettek C, Bohner 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.
12. 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.
13. Langenbach F, Naujoks C, Kersten-Thiele PV, Berr K, Depprich RA, Kübler NR, Kögler G, et al. Osteogenic differentiation influences stem cell migration out of scaffold-free microspheres. *Tissue Eng Part A* 2010;16(2):759-66.
14. Harrison DE. Proliferative capacity of erythropoietic stem cell lines and aging: an overview. *Mech Ageing Dev* 1979;9(5-6):409-26.
15. Ruscetti FW, Akel S, Bartelmez SH. Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene* 2005;24(37):5751-63.
16. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000;342(18):1350-8.
17. Cashman JD, Eaves CJ, Sarris AH, Eaves AC. MCP-1, not MIP-1alpha, is the endogenous chemokine that cooperates with TGF-beta to inhibit the cycling of primitive normal but not leukemic (CML) progenitors in long-term human marrow cultures. *Blood* 1998;92(7):2338-44.
18. Liesveld JL, Harbol AW, Belanger T, Rosell KE, Abboud CN. MIP-1alpha and TGF-beta production in CD34+ progenitor-stromal cell coculture systems: effects of progenitor isolation method and cell-cell contact. *Blood Cells Mol Dis* 2000;26(4):261-75.
19. Ohishi K, Katayama N, Itoh R, Mahmud N, Miwa H, Kita K, et al. Accelerated cell-cycling of hematopoietic progenitors by the flt3 ligand that is modulated by transforming growth factor-beta. *Blood* 1996;87(5):1718-27.
20. Tanaka R, Katayama N, Ohishi K, Mahmud N, Itoh R, Tanaka Y, et al. Accelerated cell-cycling of hematopoietic progenitor cells by growth factors. *Blood* 1995;86(1):73-9.
21. Ruscetti FW, Bartelmez SH. Transforming growth factor beta, pleiotropic regulator of hematopoietic stem cells: potential physiological and clinical relevance. *Int J Hematol* 2001;74(1):18-25.
22. Sitnicka E, Ruscetti FW, Priestley GV, Wolf NS, Bartelmez SH. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* 1996;88(1):82-8.
23. Ramsfjell V, Borge OJ, Cui L, Jacobsen SE. Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34+ CD38-) human bone marrow progenitor cells: distinct and key interactions with the ligands for c-kit and flt3, and inhibitory effects of TGF-beta and TNF-alpha. *J Immunol* 1997;158(11):5169-77.
24. Keller JR, Mcniece IK, Sill KT, Ellingsworth LR, Quesenberry PJ, Sing GK, et al. Transforming growth factor beta directly regulates primitive murine hematopoietic cell proliferation. *Blood* 1990;75(3):596-602.
25. Pierelli L, Marone M, Bonanno G, Mozzetti S, Rutella S, Morosetti R, et al. Modulation of bcl-2 and p27 in human primitive proliferating hematopoietic progenitors by autocrine TGF-beta1 is a cell cycle-independent effect and influences their hematopoietic potential. *Blood* 2000;95(10):3001-9.
26. Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Eto K, Ema H, Nakauchi H. TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* 2009;113(6):1250-6.
27. Larsson J, Blank U, Klintman J, Magnusson M, Karlsson S. Quiescence of hematopoietic stem cells and maintenance of the stem cell pool is not dependent on TGF-beta signaling in vivo. *Exp Hematol* 2005;33(5):592-6.
28. Kögler 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.
29. 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.
30. Kögler G, Callejas J, Hakenberg P, Enczmann J, Adams O, Daubener W, et al. Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: critical issues. *J Hematother* 1996;5(2):105-16.
31. Tomasz M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol* 1995;2(9):575-9.
32. Kögler 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.

TGF- β downregulation by RNAi technique in *ex vivo*-expanded HSCs on 3D DBM scaffold

Received: November 22, 2011 Accepted: February 05, 2012

Abstract

Zahra Sadat Hashemi M.Sc.¹
Mahdi Forouzandeh Moghadam
Ph.D.^{1*}
Masoud Soleimani Ph.D.²
Maryam Hafizi M.Sc.³
Naser Amirizadeh Ph.D.⁴

1- Department of Biotechnology,
Faculty of Medicine, Tarbiat
Modares University, Tehran, Iran.

2- Department of Hematology and
Blood Banking, Faculty of Medical
Science, Tarbiat Modares
University, Tehran, Iran.

3- Department of Stem Cell Biology,
Stem Cell Technology Research
Center, Tehran, Iran.

4- Research Center of Iranian
Blood Transfusion Organization,
Tehran, Iran.

Background: Bone Marrow Transplantations (BMT) are limited by low CD34+ cell counts in umbilical cord blood (UCB) and these cells need to be expanded for success in such procedures. To achieve this goal, *ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells (HSCs) by enhancing their self-renewal activity on demineralized bone matrix (DBM) scaffold coated with mesenchymal progenitor cells (MPCs) and unrestricted somatic stem cells (USSCs) was recommended. TGF- β pathway is a key inhibitory factor for HSCs self-renewal. In this study *ex vivo* expansion and downregulation of TGF- β pathway were simultaneously performed.

Methods: USSC cells were isolated from UCB and then coated on DBM scaffold as a feeder layer. UCB CD34+ cells were isolated from UCB by magnetic activated cell sorting (MACS) method and were transfected by siRNA against TGF β R2 in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cultures by co-cultivation with USSC. TGF β R2 expression levels were evaluated by quantitative real-time PCR. Cell count and flow cytometry were performed and clonogenic activity was evaluated.

Results: *Ex vivo* expansion of CD34+ cells was significantly enhanced (41 \pm 0.7 folds) by TGF β R2 downregulation, especially in 2D than 3D cultures. Finally, 2D culture showed less TGF β R2 expression levels and higher increase in the percentage of CD34 markers by flow cytometry assay.

Conclusion: The 3D siRNA delivery system would be of lower efficiency in contrast to 2D settings where the cells have less freedom and are in more contact with the feeder layer.

Keywords: Demineralized bone matrix, scaffold, hematopoietic stem cells, siRNA, TGF- β pathway.

* Corresponding author: Department of Biotechnology, Tarbiat Modares University, Medical Faculty, Intersection of Chamran and AL-E-Ahmad Highways P.O. Box: 14115-111, Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 82883861
E-mail: foroz@modares.ac.ir