

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر سال نوزدهم شماره ۲، صفحه ۳۰۵ – ۲۹۶ (خرداد و تیر ۱۳۹۵)

ISMJ 2016: 19(2): 296-305

بررسی تکثیر سلولهای 133 CD مشتق از خون بند ناف بر روی میکروول زیست سازگار

مینا صوفی زمرد '، مسعود سلیمانی '*، سعید آبرون '، مجید مصاحبی محمدی '، غلامرضا خميسي پور '، ناصر مبرا '، صادق باباشاه '

> ا گروه خونشناسی، دانشکده یزشکی، دانشگاه تربیت مدرس گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیرایزشکی، دانشگاه علوم یزشکی بوشهر ^۳ گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران أ گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

> > (دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۳۰ یذیرش مقاله: ۹۰/۱۲/۲۱)

چکیده

زمینه: پیوند سلولهای بنیادی خونساز یک روش درمانی برای بدخیمیهای خونی و ناسازگاریهای مغز استخوان میباشد. خون بندناف بهعنوان یک منبع جایگزین برای پیوند آلوژنیک به حساب می آید. محدودیت استفاده از خون بندناف مقدار کم سلولهای بنیادی پیشساز هماتوپوئتیک بهدلیل حجم کم خون بندناف است. بنابراین سیستمهای تکثیر سلولهای بنیادی پیشساز هماتوپوئتیک در شرایط Ex vivo در صدد غلبه بر این مشکل می باشند. هدف از این سیستم ها تولید کافی سلول های بنیادی پیش ساز هماتو پوئتیکی است که توانایی پیوند و خونسازی طولانی مدت را داشته باشند.

مواد و روشها: در مطالعه حاضر سلولهای +CD133 جدا شده از خون بندناف، برروی میکروولهای سه بعدی ساخته شده از جنس PDMS پوشیده شده از کلاژن کشت داده شد. سپس از نظر قدرت تکثیری به مدت ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین قدرت کلنی زایی سلول های تکثیر شده مورد ارزیابی قرار گرفت و با محیط دو بعدی مقایسه گردید.

یافتهها: نتایج حاصل نشان داد که سلولهای +CD133 مشتق از خون بندناف برروی میکروولها دارای قدرت تکثیری بالاتر همراه با حفظ قدرت کلنیزایی در مقایسه با محیط کشت سلولی روتین مورد استفاده در آزمایشگاه میباشد.

نتیجه گیری: در مطالعه حاضر نشان داده شد که سلولهای +CD133 بر روی میکروول PDMS پوشانده شده با کلاژن دارای قدرت تکثیری بالاتری در مقایسه با محیط دو بعدی میباشند. امید است با استفاده از محیطهای کشت سه بعدی و فراهم نمودن شرایطی که مقلد شرایط سه بعدی مغز استخوان است، محدودیت استفاده از خون بندناف برطرف گردد.

واژگان كليدى: خون بندناف، سلولهاى+CD133، محيط سهبعدى، PDMS

^{*} تهران، بزرگراه جلال آل احمد، یل گیشا، دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

پیوند سلول بنیادی خونساز آلوژنیک (HSCT)، یک روش درمانی است که برای تعدادی از بدخیمیهای خونی پرخطر و سندرمهای نارسایی مغز استخوان به وجود آمده است. استفاده از HSCT به خاطر قابلیت دسترسی به آنتیژن لکوسیت انسانی یکسان (HLA) بین اهداء کننده و گیرنده، محدودیت دارد.

علیرغم افزایش تعداد اهداء کنندگان غیرخویشاوند، شانس یافتن یک اهداء کننده با HLA سازگار برای بسیاری از بیماران پایین است. سلولهای بنیادی خونساز از مغز استخوان، خون محیطی و خون بندناف بهدست میآید. بررسیهای بالینی در دهه گذشته نشان دادند که از خون بندناف می توان به عنوان یک منبع جایگزین جهت سلولهای بنیادی خونساز استفاده کرد. پتانسیل استفاده از خون بندناف (UCB) به عنوان یک منبع از سلولهای بنیادی خونساز قابل به عنوان یک منبع از سلولهای بنیادی خونساز قابل پیوند اولین بار در اوایل دهه ۱۹۸۰ مطرح شد (۱). بر پایه این مطالعات اولین پیوند خون بندناف انسانی که با موفقیت انجام شد بر روی یک بیمار جوان مبتلا به آنمی فانکونی در سال ۱۹۸۸ صورت گرفت (۲).

Prominin-1) CD133 (اولین عضو شناخته شده از خانواده پرومینین به حساب میآید، که بهعنوان پروتئینهای غشایی پنج بار غشاگذر شناخته میشوند. هنوز عملکرد اختصاصی و لیگاندهای پرومینینها تا حدودی ناشناخته است. سلولهای +CD133 قادر به نوسازی طولانی مدت در حیوانات زنوگرافت بوده، و اعتقاد بر این است که این سلولها بسیار ابتدایی تر از سلولهای +CD34 هستند (۳).

CD133 در سلولهای خونساز، پیشسازهای اندوتلیال، گلایوبلاستوما، سلولهای بنیادی عصبی و گلیال بیان می شود (۴ و ۵). CD133 به عنوان مارکر

جایگزین CD34 در جداسازی سلولهای بنیادی خونساز به حساب میآید. نشان داده شده است که
سلولهای +CD133 بهصورت کامل متعهد نشده و
دارای قدرت تمایز و خود نوسازی میباشند (۶) و
همچنین این سلولها دارای قدرت کلنیزایی بالاتری در
مقایسه با سلولهای -CD34+/CD133 هستند (۷).

وقتی اصطلاحاتی همچون بافتهای مهندسی شده، مهندسی بافت و طب ترمیم مطرح می شود، آنچه در ذهن تداعی می گردد جایگزینی، ترمیم و بازسازی بافتها و ارگانهای تخریب شده است.مهندسی بافت با استفاده از زیست مواد سنتزی و طبیعی بدن، کمک به شبیه سازی محیط سه بعدی ماتریکس خارج سلولی شبیه سازی محیط سه بعدی ماتریکس خارج سلولی واقعی و شرایط مطلوب برای سلولها تکثیر و تولید مناسب آنها را به همراه داشته باشد، چرا که اگر شرایط نگهداری سلولها صحیح نباشد ممکن است بیان ژنهای مختلف، ارسال پیامها یا تولید فاکتور رشد، حرکت و چرخه سلولی دچار تغییر گردد (۸ و ۹).

لیتوگرافی نرم تکنیکی ارزان به حساب می آید، که جهت ساختن ریز ساختارهای میکرو و نانو مورد استفاده قرار می گیرد. در این تکنیک از مواد PDMS

(۱۰) استفاده می گردد (۱۰). کشت سلولها به طور مرسوم در آزمایشگاه، در ظروف کشت سلول انجام می گیرد. در این حالت، سلولها در کف ظروف کشت به صورت دو بعدی (2D) تکثیر می یابند. اخیراً، دانشمندان دریافتهاند که کشت سه بعدی (3D) سلولها تغییرات شگفتانگیزی را در ساختار و عملکرد آن به وجود می آورد. بنابراین فراهم نمودن شمارش مناسب جهت پیوند موضوع مهمی

به حساب می آید. در مطالعه حاضر تکثیر سلولهای + CD133 جدا شده از خون بندناف برروی محیط سه بعدی ساخته شده بررسی گردید و با محیط کشت دو بعدی مقایسه شد.

مواد و روشها

جداسازی سلولهای تکهستهای از خون بندناف

نمونههای خون بندناف از مادران با زایمان طبیعی از بیمارستان صارم بعد از گرفتن رضایتنامه کتبی تهیه گردید. جهت جداسازی سلولهای تک هستهای خون بندناف با استفاده از هیدروکسی اتیل استارچ (HES) به بسبت ۱:۵ رقیق و بهمدت ۴۵ دقیقه الی ۱ ساعت در دمای محیط رها شد. سپس محصول حاصل از مرحله قبل بر روی فایکول با غلظت ۱٬۰۷۷ به نسبت ۲:۱ انتقال داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۳۴۰۰ سانتریفوژ گردید. در ادامه حلقه سلولهای تک سانتریفوژ گردید. در ادامه حلقه سلولهای تک EDTA دو مرتبه شستشو داده شد و بهمدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۶۰۰ سانتریفوژ شد. پس از سانتریفیوژ محلول روئی دور ریخته شد. رسوب سلولی حاصل، حاوی سلولهای تک هستهای بود.

جداسازی سلولهای +CD133 از سلولهای تکهستهای جدا شده از بندناف

جهت جداسازی سلولهای +CD133، به سلولهای جدا شده از خون بندناف ۵۰ میکرولیتر آنتیبادی ضد+CD133 نشاندار شده با ذرات آهن ضد+CD133 نشاندار شده با ذرات آهن مخلوط گردید و بهمدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. بعد از انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتیگراد بهمدت ۵ دقیقه با دور

به رسوب سلولی BDTA حاوی PBS حاوی PBS مقدار ۵۰۰ میکرولیتر محلول PBS حاوی بدون گاز افزوده و به آرامی پیپتاژ شد. در نهایت با استفاده از ستون MACS (Biotech,USA) بر اساس روش شرکت سازنده سلولهای +CD133 جدا گردید.

تأئيد سلولهاي CD133 جدا شده از خون بندناف

جهت تأثید خلوص سلولهای عبور داده شده از ستون MACS، از روش فلوسایتومتری استفاده گردید. تعداد ۲×۱۰۵ سلول را برداشت نموده و به آن میکرولیتر آنتیبادی TD133-PE (Miltenyi Biotech,USA) اضافه کردیم. سپس، سلولها در روز بعد جهت بررسی با دستگاه فلوسایتومتری (Beckton Dickinson, USA) انتقال داده شد. جهت کنترل منفی از Beckton Dickinson, USA) استفاده گردید.

آمادهسازی محیط کشت سه بعدی

تکنیک مورد استفاده در آماده سازی میکروولهای مدور، تکنیک Softlitography است. به طور خلاصه ابتدا، سطح wafer silicon توسط یک پلیمر حساس به نور (SU8) پوشانده می شود و توسط دستگاه Spin Coater تمام سطح Wafer به صورت یکنواخت با قطر مشخص از پلیمر پوشانده می شود. سپس پلیمر موجود بر روی Wafer silicon در دمای سپس پلیمر موجود بر روی Wafer silicon در دمای خشک شود. سپس، با استفاده از تابش نور UV با طول موج ۴۲۰ نانومتر به ساختار پلیمری تشکیل شده موج ۴۲۰ نانومتر به ساختار پلیمری تشکیل شده (روش Am) و ارتفاع ۶۸ میکروون (μ M) و ارتفاع ۶۸ میکرون (μ M) ایجاد می شود. بعد از ایجاد الگو PDMS در دمای ۷۰ ایجاد می شود. بعد از ایجاد الگو PDMS در دمای ۷۰ ایجاد می شود. بعد از ایجاد الگو PDMS در دمای ۷۰

استفاده از لام نئوبار انجام گرفت.

تست سنجش كلني

جهت انجام این تست از محیط BC ،Vancouver ،Stem cell technologies) ،Vx1x ، Stem cell technologies) با استفاده گردید. تعداد ۱۲۳ محیط استفاده گردید. تعداد ۱۲۳ محیط عدد سلول به محیط ۱/۱ میلیلیتر محیط methocult اضافه شده و به وسیلهی ورتکس بهطور کامل مخلوط گردید. مخلوط حاصل توسط سرنگ با سوزن گاژ ۱۶ در پتری دیشهای ۳۵ میلیلیتری ریخته شد و به مدت ۲ هفته در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO2 نگهداری گردید. بعد از روز ۱۴ کلنیهای حاصل از نظر وجود هموگلوبین که نشاندهنده کلنیهای حاصل از نظر وجود هموگلوبین که نشاندهنده کلنیهای حاصل از نظر وجود هموگلوبین که رنگ آمیزی بنزیدین مورد ارزیابی قرار گرفت.

رنگ آمیزی بنزیدین

رنگ آمیزی بنزیدین جهت نشان دادن هموگلوبین مورد استفاده قرار گرفت. رنگ بنزیدین را بهمدت ۱۵ دقیقه روی کلنی های درون پتری دیش سنجش کلنی ریخته و محلول شستشوی رنگ، محلول حاوی ۵۰ درصد متانول و ۵۰ درصد آب مقطر و ۱ میلی لیتر آب اکسیژنه را به آن اضافه نموده و بهمدت ۲۰ دقیقه نگه می داریم. کلنی ها از نظر وجود رنگ آبی تیره پس از رنگ آمیزی بررسی می شوند.

آناليز آماري

آنالیز آماری با استفاده از از آنالیز SPSS Inc) SPSS در نرمافزار Reapeted Measure ویرایش ۱۶ انجام گرفت.

درجه انکوبه شد تا کاملاً سفت شود. در خاتمه این میکروولهای آماده شده را برش زده و به کمک الکل ۷۰ درجه استریل کرده و سپس سلول را بر روی آن کشت می دهیم.

کشت بر روی محیط کشت سه بعدی و دو بعدی

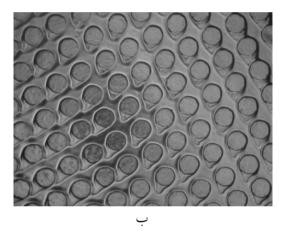
سلولها جهت کشت در محیط دو بعدی به پلیت ۲۴ خانهای انتقال داده شد. سپس جهت تکثیر این سلولها زر محیط کشت (Stem cell technologies) و Stem Span (Canada ،BC ،Vancouver ،BC ،Canada و مخلوطی از فاکتورهای رشد شامل (cell Stem ،technologies ،Vancouver نانوگرم بر میلیلیتر Thrombopoietin) (TPO) نانوگرم بر میلیلیتر ترومبوپوئتین (TPO) (TPO) نانوگرم بر میلیلیتر فاکتور رشد سلول بنیادی ۱۰۰ نانوگرم بر میلیلیتر فاکتور رشد سلول بنیادی (Cell Stem (SCF ،Factor) استفاده گردید.

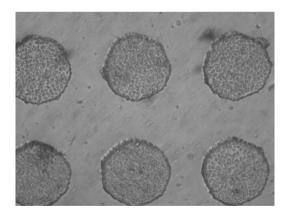
جهت کشت سلولها در محیط سه بعدی نیز از محیط مشابه شرایط کشت دو بعدی استفاده گردید. محیطها هر ۳-۲ روز یکبار تعویض گردید. تعداد ۵۰۰۰۰ سلولهای بر روی میکروول آماده شده سه بعدی از جنس PDMS پوشیده شده با کلاژن کشت داده شد. محیط میکروولها در روز بعد تعویض گردید. سلولها بهمدت ۱۴ در شرایط دو بعدی و سه بعدی نگهداری شدند.

بررسی میکروسکوپی تکثیر سلولهای +CD133 مشتق از خون بندناف در محیط دو بعدی و سه بعدی

بررسی میکروسکوپی سلولهای کشت شده در محیط دو بعدی و سه بعدی در روزهای ۷ و ۱۴ انجام گرفت. سلولهای کشت داده شده بر روی میکروول سه بعدی از نظر افزایش تعداد سلول بررسی گردید و با محیط دو بعدی مقایسه گردید. شمارش سلولها با

الف



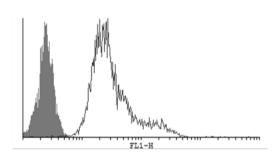


ج

شکل ۳) الف) نمای کلی از محیط سه بعدی مورد استفاده در روز اول، ب) تکثیر سلولهای کشت داده شده در روز ۷، ج) نمایی از تکثیر سلولها در روز ۱۴ بعد از کشت سلولها

ىافتەھا

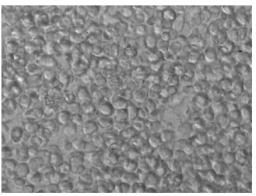
سلولهای +CD133 از سلولهای هسته دار خون بندناف با کمک تکنیک MACS جدا گردیدند. جهت تأیید این سلولها از فلوسایتومتری استفاده گردید. نتایج حاصل خلوص ۹۸ درصد را نشان دادند. در شکل ۱ نتیجه حاصل از فلوسایتومتری در روز بعد از جداسازی آورده شده است.



شکل ۱) نتیجه حاصل از بررسی میزان خلوص سلولهای +CD133 در روز بعد از جداسازی

تکثیر سلولهای +CD133 در محیط دو بعدی و سه بعدی

نتایج حاصل از تکثیر سلولهای+CD133 جدا شده و تکثیر یافته از خون بندناف نشاندهنده قدرت تکثیری بالاتری از سلولهای کشت داده شده در میکروولها در مقایسه با سلولهای +CD133 کشت شده در محیط دو بعدی بود. شکل ۲ نمایی از سلولهای موجود در شرایط کشت دو بعدی را نشان می دهد.

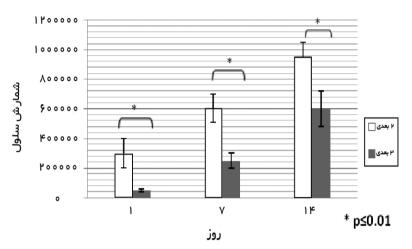


شکل ۲) سلولهای ⁺CD133 تکثیر یافته در محیط کشت دو بعدی با بزرگنمایی

http://bpums.ac.ir

در شکل π نمایی از سلولهای تکثیر شده در محیط سه بعدی در روز V (شکل V– φ) و روز V (شکل V– φ) آورده شده است. در این تصویر نشان داده شده است که بعد از گذشت V0 روز از زمان کشت تعداد سلولها در مقایسه با روز اول افزایش یافته است.

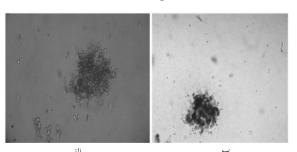
تعداد سلولهای شمارش شده در محیط دو بعدی و سه بعدی در روزهای مختلف در جدول ۱ آورده شده است. همچنین آنالیز آماری حاصل از شمارش نتایج معنی داری ($P<\cdot\cdot\cdot\circ$) را نشان داد (شکل *).



شکل ۴) نتایج حاصل از آنالیز شمارش سلولی همراه با P<٠/٠٠٥ معنیدار میباشد.

نتايج حاصل سنجش كلني

سلولهای کشت شده بر روی میکروولها از درون میکروولها از درون میکروولها خارج گردید و در محیط methocult کشت داده شد. شکل ۵- الف، کلونی حاصل را نشان می دهد. جهت تأئید کلونهای اریتروئیدی رنگ آمیزی بنزیدین انجام گرفت. تودههای سلولی با بیش از ۵۰ عدد سلول به عنوان کلنی تعریف می گردند. کلنی هایی که به رنگ قهوهای تا آبی تیره بودند به عنوان کلنی های مثبت در نظر گرفته شدند (شکل ۵- ب).



الف شکل ۵) الف) کلنی حاصل از سلول CD133 کشت داده شده در محیط سه بعدی؛ ب) رنگ آمیزی بنزیدین

جدول ۱) تعداد سلولهای شمارش شده در روزهای مختلف

Cell Count	Day
٣٠٠٠٠	Day • (۲D)
۵۰۰۰۰	Day • (TD)
<i>\$</i>	Day V(YD)
70	Day V(TD)
90	Day 14(7D)
9	Day ۱۴(۳D)

بحث

در مطالعه حاضر از سیستم کشت سه بعدی پوشانده شده با کلاژنی استفاده گردید، که قادر به تکثیر سلولهای +CD133 مشتق از خون بندناف در مقایسه با محیط دو بعدی بود. دو دهه قبل وجود پیشسازهای خونی در گردش خون نوزادان ارزیابی گردید و در حدود یک دهه پیش اولین پیوند موفقیت آمیز خون بندناف گزارش شد.

http://bpums.ac.ir

بيماران پيوندي طي درمان متحمل دوز بالاي شيمي درمانی میشوند و از یک دوره زمانی سیتوپنی در ارتباط با بیماری عفونی، حوادث خونریزی دهنده، و دیگر عوارض پیوندی رنج میبرند. استفاده از سلولهای پیش ساز خون محیطی که به واسطه دارو و سايتوكاين G-CSF وارد خون محيطي شدهاند، بهطور مشخص دوره سیتوینی را کوتاه می کند ولی قادر به حذف كامل آن نيست. يك منبع توانا از سلولهاي خونساز نابالغ، سلولهای +CD133 هستند. این سلولها پیش سازهای ردههای خونی هستند که می توانند از منابع مختلفی جدا شده و در مسیرهای تمایزی متفاوتی ازدیاد پیدا کنند. مواردی از استفاده بالینی کشت سلولهای +CD133 اولیه وجود دارد که شامل افزایش تعداد سلولهای بنیادی در مواقعی است که میزان کافی سلول با جمعآوری از مغز استخوان و خون فراهم نمی شود. در بیمارانی که جابه جایی سلولها در آنها ناکافی بوده یا جمعآوری سلول بهدلیل فیبروتیک بودن مغز استخوان یا آسیب آن در اثر شیمی درمانی یا اشعه درمانی مشکل است، کشت سلولها مي تواند كمك كننده باشد.

علاوهبر این، ازدیاد سلولهای بنیادی در بیمارانی که بهدلیل رد پیوند یا شیمی درمانی مکرر، نیاز به پیوند چندگانه دارند، سودمند است. مدارک موجود نشان داده است که زمان قبول پیوند از سلولهای تزاید یافته، با سلولهای تازه جدا شده، مشابه است. این سلولها پس از پیوند قادر به خونسازی کوتاه مدت میباشند، ولی پیوند طولانی مدت در استفاده از سلولهای کشت شده، هنوز زیر سوال است. کاربرد دیگر کشت و ازدیاد سلولهای بنیادی در ژن درمانی است. جهت انتقال ژن ویروسی نیاز به سلولی است که در فاز تقسیم سلولی باشد. کاربرد دیگر، تکثیر

سلولهای بنیادی، استفاده آن در پیوند خون بندناف است. پیوند خون بندناف بهسرعت در حال پیشرفت است و با تأسیس بانک خون بندناف و مدارک موجود از پیوند موفقیت آمیز افزایش می یابد (۱۱). این منبع جهت بیمارانی کاربرد دارد که بهدلایل مختلف، دهنده مناسب مغز استخوان، در اختیار ندارند.

یک مسئله مهم در پیوند خون بندناف این است که تنها یک شانس برای جمع آوری نمونه در دست بوده و همين امر سبب محدوديت حجم و تعداد سلول می شود. در نتیجه پیوند موفقیت آمیز محدود به کودکان و بیماران کم وزن می گردد (۱۲). توازن ازدیاد جمعیت سلولهای بنیادی برای رسیدن به یک دوز درمانی مناسب ييوند بالغين سودمند بوده و احتمال استفاده از این منبع را افزایش می دهد. از طرف دیگر، استفاده از خون بندناف بهدلیل وجود بانک خون بندناف آسانتر می شود. در مقایسه با پیوند مغز استخوان، شانس موفقیت خون بندناف بیشتر است. پتانسیل تکثیر سلولهای خونساز نیز در خون بندناف بالاتر از مغز استخوان می شود (قابلیت تکثیر بهمدت ۳۰ هفته در برابر ۱۰ هفته در مغز استخوان). حداقل دوز سلولهای هسته دار مورد نیاز برای یک فرد بالغ۱۰۷×۲ به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن است. در حالی که تعداد کل سلولهای شمارش شده در نمونه خون بندناف بهطور متوسط ۱۱×۱۰۸ است. لذا برای پیوند سلولهای خونساز بندناف به بیماران بالغ لازم است که این سلولها در محیط In vitro توسط سایتوکاینهای مختلف و در شرایط کشت تکثیر ییدا كنند، بدون اين كه قابليت پيوند و چند قوهاي بودن آنها تغییر پیدا کند و یا به ردههای دیگر تمایز پیدا کنند.

در این مطالعه ما با استفاده از محیط کشت سه بعدی CD133 رست سازگار نشان دادیم که تکثیر سلولهای

علاوه بر بیماری های خونی و بدخیمی ها، امروزه استفاده از سلولهای بنیادی خونساز در درمان بیماریهای قلبی - عروقی، کبدی، عصبی و دیابت در سطح وسیعی در حال تحقیق می باشد. هدف از کشت سه بعدی تقلید شرایط فیزیکو شیمیایی، سلولی و ریز محیط موجود در بدن بوده، که مسیر را به سوی ایجاد مهندسی بافت باز می کند. مهندسی بافت شامل مواردی همچون طراحی محیط کشت و محیطهای فاقد سرم، طراحی فلاسک و بیوراکتورهای کشت جهت اتوماسیون کشت، سنسورها و ابزارهای حساس و پیشگویانه جهت بررسی کینتیک کشت، داربست و تکثیر Ex vivo در ساختار سه بعدی، تبادل کنندههای اکسیژن و سیستم تهویه و هوادهی جدید، سیستم يرفيوژن و ايجاد كننده استرس شار (Shear) مي باشد. کشت سلولها بهطور مرسوم در آزمایشگاه در ظروف كشت سلول انجام مي گيرد. در اين حالت سلولها در کف ظرف به صورت دو بعدی تکثیر می یابند.

اخیراً دانشمندان دریافتهاند که کشت فیبروبلاستها در محیط سه بعدی تغییرات قابل ملاحظهای را در ساختار و عملکرد آنها به وجود میآورد. دانشمندان نشان دادند که فیبروبلاستهای کشت داده شده بهصورت سه بعدی در مقایسه با کشت دو بعدی سریعتر تکثیر شده و مهاجرت میکنند (۱۳ و ۱۴). علاوه بر تأثیر محیط سه بعدی بر رفتار سلول، فضای هندسی که در آن سلول قرار دارد، میتواند بر تکثیر و

تمایز سلولها اثرگذار باشد. ریز معماری Niche سلولهای بنیادی در شرایط بدن می تواند گرادیان غلظت فاکتورهای رشد را حفظ نموده و چسبندگی سلول به سلول دیگر را تنظیم نماید. همچنین این ساختار می تواند مجاورت با غشای پایه یا عروقی را مشخص کند (۱۵). مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از محیط سه بعدی طراحى شده مدور مى تواند سبب تكثير بيشتر سلولهای یاد شده در مقایسه با محیط دو بعدی گردد. در سال ۲۰۰۳ اهرینگ (Ehring) و همکاران سلولهای بنیادی خونساز بندناف را در یک محیط بدون سرم و سایتوکاین روی یک داربست سه بعدی با ماتریکس کربنی (Cytomatrix) که فیبر ونکتین به آن متصل شده بود، كشت دادند. آنها موفق شدند اين سلولها را بیشتر از محیطهای معمولی تکثیر کنند (۱۶). بهنظر میرسد این تفاوتها به علت نزدیکی فضای سلول در محیط سه بعدی به محیط موجود زنده می باشد. در این راستا لیو (Liu) و همکاران نشان دادهاند که کشت سلولهای بنیادی جنینی موش در بستر سه بعدی از جنس تانتالیوم با منافذ فراوان، تمایز را به سلولهای خون ساز نسبت به شرایط کشت دو بعدی تشدید می کند (۱۷).

در مطالعه حاضر با استفاده از میکروولی که کلاژن به آن متصل شده بود، موفق به تکثیر بیشتر سلولهای CD133 در مقایسه با محیطهای معمولی کشت شدیم ($P<\cdot\cdot\cdot\cdot$). این موضوع نشان می دهد که استفاده از محیطهای کشت سه بعدی در تکثیر سلولهای CD133 همراه با حفظ قدرت کلنی زایی موثر می باشد.

References:

1.Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E, et al.

Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical

transplantation. Blood Cells 1991; 17: 313-29. 2.Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with

http://bpums.ac.ir

- Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989; 321: 1174-8.
- 3.Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. Blood 1997; 90: 5013-21.
- 4.Horn PA, Tesch H, Staib P, et al. Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. Blood 1999; 93: 1435-7.
- 5.Corbeil D, Roper K, Weigmann A, et al. AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family?. Blood 1998; 91: 2625-6.
- 6 Jaatinen T, Hemmoranta H, Hautaniemi S, et al. Global gene expression profile of human cord blood-derived CD133+ cells. Stem Cells 2006; 24: 631-41.
- 7.de Wynter EA, Buck D, Hart C, et al. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. Stem Cells 1998; 16: 387-96.
- 8.Koh CJ, Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. J Am Soc Nephrol 2004; 15: 1113-25.
 9.Koh CJ, Atala A. Therapeutic cloning and tissue

- engineering. Curr Top Dev Biol 2004; 60: 1-15.
- 10.McDonald JC, Duffy DC, Anderson JR, et al. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). Electrophoresis 2000; 21: 27-40.
- 11 Arien-Zakay H, Lazarovici P, Nagler A. Tissue regeneration potential in human umbilical cord blood. Best Pract Res Clin Haematol 2010; 23: 291-303.
- 12.Kogler G, Critser P, Trapp T, et al. Future of cord blood for non-oncology uses. Bone Marrow Transplant 2009; 44: 683-97.
- 13.Cukierman E. Cell migration analyses within fibroblast-derived 3-D matrices. Methods Mol Biol 2005; 294: 79-93.
- 14.Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. Science 2001; 294: 1708-12.
- 15.Fisher OZ, Khademhosseini A, Langer R, et al. Bioinspired materials for controlling stem cell fate. Acc Chem Res 2010; 43: 419-28.
- 16.Ehring B, Biber K, Upton TM, et al. Expansion of HPCs from cord blood in a novel 3D matrix. Cytotherapy 2003; 5: 490-9.
- 17.Liu H, Roy K. Biomimetic three-dimensional cultures significantly increase hematopoietic differentiation efficacy of embryonic stem cells. Tissue Eng 2005; 11: 319-30.

Original Article

Evaluation of the expansion of umbilical cord blood derived from CD133+ cells on biocompatible microwells

M. Soufizomorrod ¹, M. Soleimani ^{1*}, S. Abroun ¹, M. Mossahebi Mohammadi ¹, GH. Khamisipour ², N. Mobarra ³, S. Babashah ⁴

(Received 20 Jan, 2012 Accepted 11 Mar, 2012)

Abstract

Background: Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a therapeutic approach for treatment of hematological malignancies and incompatibility of Bone marrow. Umbilical cord blood (UCB) has known as an alternative for hematopoietic stem/progenitor cells (HPSC) in allogeneic transplantation. The low volume of collected samples is the main hindrance in application of HPSC derived from umbilical cord blood. So, ex vivo expansion of HPSCs is the useful approach to overcome this restriction. The goal of using this system is to produce appropriate amount of hematopoietic stem cells, which have the ability of transplantation and long term haematopoiesis.

<u>Material & Methods</u>: In current study CD133+ cells were isolated from cord blood (CB). Isolated cells were seeded on microwells. Then expanded cells proliferation rate and ability in colony formation were assessed and finally were compared with 2 Dimensional (2D) culture systems.

<u>Results</u>: Our findings demonstrated that CD133+ cells derived from UCB which were cultivated on microwells had significantly higher rate of proliferation in compared with routine cell culture systems.

Conclusion: In Current study, it was shown that CD133+ cells' proliferations which were seeded on PDMS microwells coated with collagen significantly increased. We hope that 3 dimensional (3D) microenvironment which mimics the 3D structure of bone marrow can solve the problem of using UCB as an alternative source of bone marrow.

Key words: Umbilical Cord Blood, CD133+ cells, 3 Dimensional microenvironment, PDMS

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

¹Department of Hematology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Department of Allied Medicine, School of Para Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

³Department of Biochemistry, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Department of Genetics, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

^{*}Address for correspondence: Department of Hematology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN; E-mail: soleim_m@modares.ac.ir