دوماهنامه طبّ جنوب
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 CD 133 مشتق از خون بند ناف بر روی میکروول زیست سازگار

مینا صوفی‌زمرد [۱]، مسعود سلیمانی [۱*]، سعید آبرون [۱]، مجید مصاحبی‌محمدی [۱]، غلامرضا خمیسی‌پور [۲]، ناصر مبرا [۳]، صادق باباشاه [۴]

[۱] گروه خون‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۲] گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
[۳] گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۴] گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

(دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۳۰- پذیرش 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 می‌آید. 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 می‌باشند. هدف از این سیستم‌ها تولید کافی سلول‌های بنیادی پیش‌ساز هماتوپوئتیکی 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 کلنی‌زایی سلول‌های 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.

نتیجه‌گیری: 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 کلیدی: خون بندناف، سلول‌های**+CD133**، محیط سه‌بعدی، **PDMS**

* تهران، بزرگراه جلال آل احمد، پل گیشا، دانشگاه تربیت مدرس

E-mail: soleim_m@modares.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.2.296]

مقدمه

پیوند سلول بنیادی خون‌ساز آلوژنیک (HSCT)، یک روش درمانی است که برای تعدادی از بدخیمی‌های خونی پرخطر و سندرم‌های نارسایی مغز استخوان به‌وجود آمده است. استفاده از HSCT به‌خاطر 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 می‌توان به‌عنوان یک منبع جایگزین جهت سلول‌های بنیادی خون‌ساز استفاده کرد. پتانسیل استفاده از خون بندناف (UCB) به‌عنوان 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).

CD133 (Prominin-1) 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 ابتدایی‌تر از سلول‌های CD34+ هستند (۳).

CD133 در سلول‌های خون‌ساز، پیش‌سازهای اندوتلیال، گلایوبلاستوما، سلول‌های بنیادی عصبی و گلیال بیان می‌شود (۴ و ۵). CD133 به‌عنوان مارکر جایگزین CD34 در جداسازی سلول‌های بنیادی خون-ساز 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 می‌شود، آنچه در ذهن تداعی می‌گردد جایگزینی، ترمیم و بازسازی بافت‌ها و ارگان‌های تخریب شده است.مهندسی بافت با استفاده از زیست مواد سنتزی و طبیعی بدن، کمک به شبیه‌سازی محیط سه بعدی ماتریکس خارج سلولی (ECM) طبیعی بدن می‌کند، تا با فراهم آوردن محیط واقعی و شرایط مطلوب برای سلول‌ها تکثیر و تولید مناسب آن‌ها را به‌همراه 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 به‌حساب می‌آید، که جهت ساختن ریز ساختارهای میکرو و نانو مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تکنیک از مواد الاستومری به‌خصوص PDMS (poly(dimethylsiloxane استفاده می‌گردد (۱۰).

کشت سلول‌ها به‌طور مرسوم در آزمایشگاه، در ظروف کشت سلول انجام می‌گیرد. در این حالت، سلول‌ها در کف ظروف کشت به‌صورت دو بعدی (2D) تکثیر می‌یابند. اخیراً، دانشمندان دریافته‌اند که کشت سه بعدی (3D) سلول‌ها تغییرات شگفت‌انگیزی را در ساختار و عملکرد آن به‌وجود می‌آورد. بنابراین فراهم نمودن شمارش مناسب جهت پیوند موضوع مهمی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.2.296]

به‌حساب می‌آید. 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) به‌نسبت 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 ۱:۲ انتقال داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۴۰۰*g سانتریفوژ گردید. در ادامه حلقه سلول‌های تک هسته‌ای به آرامی جمع‌آوری گردید و با PBS حاوی EDTA دو مرتبه شستشو داده شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰×g 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 (Miltenyi Biotech,USA) اضافه کرده و خوب 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 ۴۰۰*g سانتریفوژ گردید. سپس به رسوب سلولی مقدار ۵۰۰ میکرولیتر محلول PBS حاوی EDTA بدون گاز افزوده و به آرامی پیپتاژ شد. در نهایت با استفاده از ستون MACS (Miltenyi Biotech,USA) بر اساس روش شرکت سازنده سلول‌های +CD133 جدا گردید.

تأئید سلول‌های CD133 جدا شده از خون بندناف

جهت تأئید خلوص سلول‌های عبور داده شده از ستون MACS، از روش فلوسایتومتری استفاده گردید. تعداد ۲×۱۰۵ سلول را برداشت نموده و به آن ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی CD133-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 Mouse IgG1 (Miltenyi Biotech,USA) استفاده گردید.

آماده‌سازی محیط کشت سه بعدی

تکنیک مورد استفاده در آماده سازی میکروول‌های مدور، تکنیک Softlitography است. به‌طور خلاصه ابتدا، سطح wafer silicon توسط یک پلیمر حساس به نور UV (SU8) پوشانده می‌شود و توسط دستگاه Spin Coater تمام سطح Wafer به‌صورت یکنواخت با قطر مشخص از پلیمر پوشانده می‌شود. سپس پلیمر موجود بر روی Wafer silicon در دمای ۱۰۰ درجه به‌مدت ۳ دقیقه قرار داده می‌شود تا کاملاً خشک شود. سپس، با استفاده از تابش نورUV با طول موج ۴۲۰ نانومتر به ساختار پلیمری تشکیل شده (روش Photo Mask)، الگوهای میکروولی با قطر۲۰۰ میکرون (µM) و ارتفاع ۶۸ میکرون (µM) ایجاد می‌شود. بعد از ایجاد الگو PDMS، در دمای ۷۰

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.2.296]

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 می‌دهیم.

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 از محیط کشت (Stem cell technologies، Vancouver، BC، Canada) Stem Span و مخلوطی از فاکتورهای رشد شامل (Canada، BC، Vancouver، technologies، Stem cell) ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر FLT-3 ligand، ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر ترومبوپوئتین (Thrombopoietin) (TPO) و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد سلول بنیادی (SCF ،Factor) Cell Stem 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 استفاده از لام نئوبار انجام گرفت.

تست سنجش کلنی

جهت انجام این تست از محیط (Stem cell technologies، Vancouver، BC، Canada) Methocult استفاده گردید. تعداد ۲×۱۰۳ 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 سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 نگهداری گردید. بعد از روز ۱۴ کلنی‌های حاصل از نظر وجود هموگلوبین که نشان‌دهنده کلنی‌های CFU-E و BFU-E می‌باشد با رنگ‌آمیزی بنزیدین مورد ارزیابی قرار گرفت.

رنگ‌آمیزی بنزیدین

رنگ‌آمیزی بنزیدین جهت نشان دادن هموگلوبین مورد استفاده قرار گرفت. رنگ بنزیدین را به‌مدت ۱۵ دقیقه روی کلنی‌های درون پتری دیش سنجش کلنی ریخته و محلول شستشوی رنگ، محلول حاوی ۵۰ درصد متانول و ۵۰ درصد آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه را به آن اضافه نموده و به‌مدت ۲۰ دقیقه نگه می‌داریم. کلنی‌ها از نظر وجود رنگ آبی تیره پس از رنگ‌آمیزی بررسی می‌شوند.

آنالیز آماری

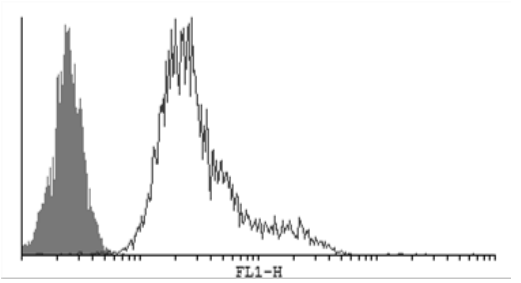
آنالیز آماری با استفاده از از آنالیز Reapeted Measure در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc، USA،Il،Chicago) ویرایش ۱۶ انجام گرفت.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.2.296]

یافته‌ها

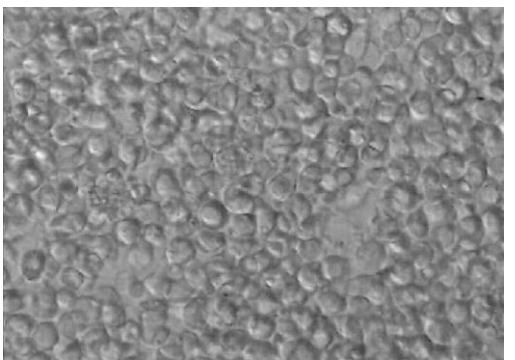
سلول‌های +CD133 از سلول‌های هسته‌دار خون بندناف با کمک تکنیک MACS جدا گردیدند. جهت تأیید این سلول‌ها از فلوسایتومتری استفاده گردید. نتایج حاصل خلوص ۹۸ درصد را نشان دادند. در شکل ۱ نتیجه حاصل از فلوسایتومتری در روز بعد از جداسازی آورده شده است.



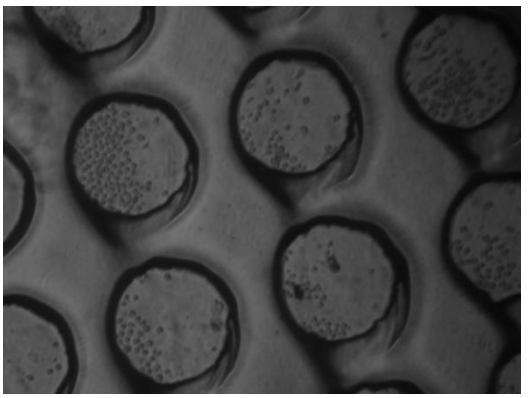
شکل ۱) نتیجه حاصل از بررسی میزان خلوص سلول‌های +CD133 در روز بعد از جداسازی

تکثیر سلول‌های +CD133 در محیط دو بعدی و سه بعدی

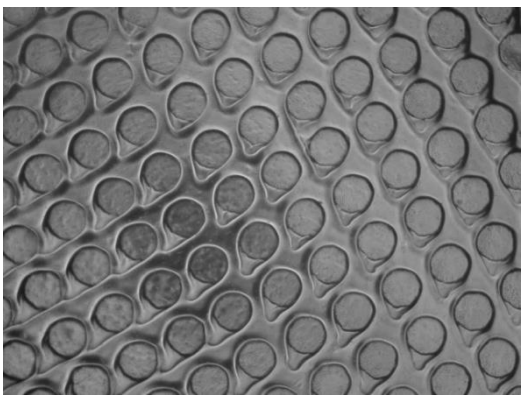
نتایج حاصل از تکثیر سلول‌های+CD133 جدا شده و تکثیر یافته از خون بندناف نشان‌دهنده قدرت تکثیری بالاتری از سلول‌های کشت داده شده در میکروول‌ها در مقایسه با سلول‌های +CD133 کشت شده در محیط دو بعدی بود. شکل ۲ نمایی از سلول‌های موجود در شرایط کشت دو بعدی را نشان می‌دهد.



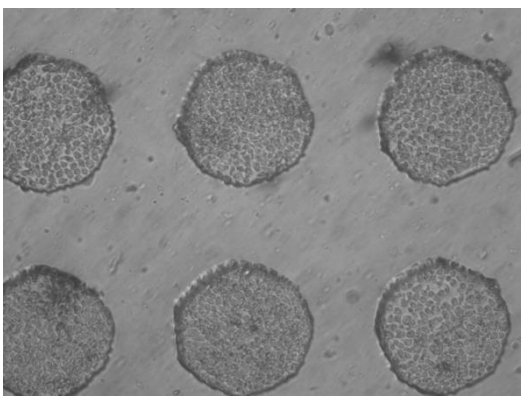
شکل ۲) سلول‌های $CD133^{+}$ تکثیر یافته در محیط کشت دو بعدی با بزرگنمایی



الف



ب



ج

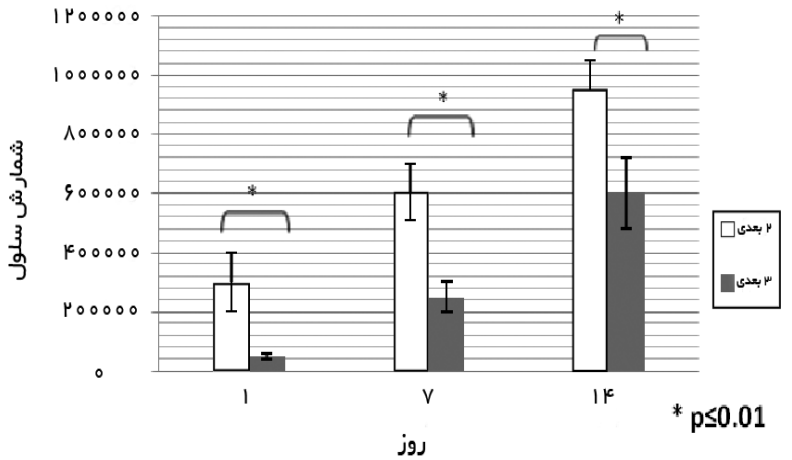
شکل ۳) الف) نمای کلی از محیط سه بعدی مورد استفاده در روز اول، ب) تکثیر سلول‌های کشت داده شده در روز ۷، ج) نمایی از تکثیر سلول‌ها در روز ۱۴ بعد از کشت سلول‌ها

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.2.296]

در شکل ۳ نمایی از سلول‌های تکثیر شده در محیط سه بعدی در روز ۷ (شکل۳- ب) و روز ۱۴ (شکل ۳- ج) آورده شده است. در این تصویر نشان داده شده است که بعد از گذشت ۱۴ 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 معنی‌داری (P<۰/۰۰۵) را نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴) نتایج حاصل از آنالیز شمارش سلولی همراه با P<۰/۰۰۵ معنی‌دار می‌باشد.

نتایج حاصل سنجش کلنی

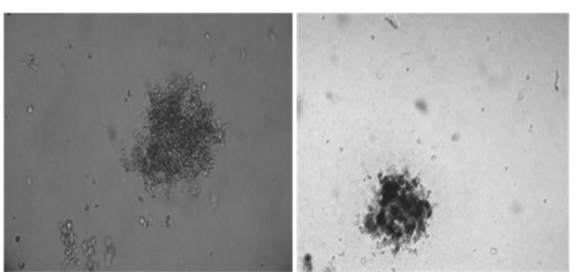
سلول‌های کشت شده بر روی میکروول‌ها از درون میکروول‌ها خارج گردید و در محیط methocult کشت داده شد. شکل ۵- الف، کلونی حاصل را نشان می‌دهد. جهت تأئید کلون‌های اریتروئیدی رنگ‌آمیزی بنزیدین انجام گرفت. توده‌های سلولی با بیش از ۵۰ عدد سلول به‌عنوان کلنی تعریف می‌گردند. کلنی‌هایی که به رنگ قهوه‌ای تا آبی تیره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

جدول ۱) تعداد سلول‌های شمارش شده در روزهای مختلف

Day	Cell Count
Day ۰(۲D)	۳۰۰۰۰۰
Day ۰(۳D)	۵۰۰۰۰
Day ۷(۲D)	۶۰۰۰۰۰
Day ۷(۳D)	۲۵۰۰۰۰
Day ۱۴(۲D)	۹۵۰۰۰۰
Day ۱۴(۳D)	۶۰۰۰۰۰

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 موفقیت‌آمیز خون بندناف گزارش شد.



الف ب

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

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.2.296]

بیماران پیوندی طی درمان متحمل دوز بالای شیمی 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 پیش‌ساز خون محیطی که به واسطه دارو و سایتوکاین G-CSF وارد خون محیطی شده‌اند، به‌طور مشخص دوره سیتوپنی را کوتاه می‌کند ولی قادر به حذف کامل آن نیست. یک منبع توانا از سلول‌های خون‌ساز نابالغ، سلول‌های CD133+ هستند. این سلول‌ها پیش سازهای رده‌های خونی هستند که می‌توانند 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 نمی‌شود. در بیمارانی که جابه‌جایی 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 می‌تواند کمک کننده 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 موفقیت‌آمیز افزایش می‌یابد (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 جمع‌آوری نمونه در دست بوده و همین امر سبب محدودیت حجم و تعداد سلول می‌شود. در نتیجه پیوند موفقیت‌آمیز محدود به کودکان و بیماران کم وزن می‌گردد (۱۲). توازن ازدیاد جمعیت سلول‌های بنیادی برای رسیدن به یک دوز درمانی مناسب پیوند بالغین سودمند بوده و احتمال استفاده از این منبع را افزایش می‌دهد. از طرف دیگر، استفاده از خون بندناف به‌دلیل وجود بانک خون بندناف آسان‌تر می‌شود. در مقایسه با پیوند مغز استخوان، شانس موفقیت خون بندناف بیشتر است. پتانسیل تکثیر سلول‌های خون‌ساز نیز در خون بندناف بالاتر از مغز استخوان می‌شود (قابلیت تکثیر به‌مدت ۳۰ هفته در برابر ۱۰ هفته در مغز استخوان). حداقل دوز سلول‌های هسته‌دار مورد نیاز برای یک فرد بالغ۲×۱۰۷ 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 پیدا کنند، بدون این‌که قابلیت پیوند و چند قوه‌ای بودن آن‌ها تغییر پیدا کند و یا به رده‌های دیگر تمایز پیدا کنند.

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

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.2.296]

جدا شده از خون بندناف در مقایسه با سلول‌های کشت شده در شرایط رایج کشت در آزمایشگاه تکثیر بالاتری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۵).

علاوه بر بیماری‌های خونی و بدخیمی‌ها، امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی خون‌ساز در درمان بیماری‌های قلبی- عروقی، کبدی، عصبی و دیابت در سطح وسیعی در حال تحقیق می‌باشد. 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 می‌کند. 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 پرفیوژن و ایجاد کننده استرس شار (Shear) می‌باشد. کشت سلول‌ها به‌طور مرسوم در آزمایشگاه در ظروف کشت سلول انجام می‌گیرد. در این حالت سلول‌ها در کف ظرف به‌صورت دو بعدی تکثیر می‌یابند.

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 می‌تواند گرادیان غلظت فاکتورهای رشد را حفظ نموده و چسبندگی سلول به سلول دیگر را تنظیم نماید. همچنین این ساختار می‌تواند مجاورت با غشای پایه یا عروقی را مشخص کند (۱۵).

مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از محیط سه بعدی طراحی شده مدور می‌تواند سبب تکثیر بیشتر 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 فیبرونکتین به آن متصل شده بود، کشت دادند. آن‌ها موفق شدند این 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 می‌باشد. 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 می‌کند (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<۰/۰۰۵). این موضوع نشان می‌دهد که استفاده از محیط‌های کشت سه بعدی در تکثیر سلول‌های CD133 همراه با حفظ قدرت کلنی‌زایی موثر می‌باشد.

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

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.2.296]

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.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.2.296]

ISMJ 2016; 19(2):296-305

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]

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

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

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

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

(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.

Material & Methods: 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.

Results: 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

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

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

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOI: 10.18869/acadpub.ismj.19.2.296]