مجلـــه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۶، شمـاره‌ی ۱۱۷، مهر و آبان ۱۳۹۷، صفحات ۳۲ تا ۴۳

گسترش برون تن سلول‌های بنیادی خونساز خون بند ناف بر روی نانوداربست الکترواسپاین پوشیده شده با کلاژن-فیبرونکتین

مریم اسلامی[۱]، دکتر یوسف مرتضوی[۲و۳]، دکتر مسعود سلیمانی[۴]، دکتر فاطمه سلیمانی فر[۵]، دکتر صمد ندری[۶]، دکتر سیمزر حسین زاده[۷]، دکتر مریم درویش[۸]

نویسنده‌ی مسئول: دکتر یوسف مرتضوی، گروه بیوتکنولوژی و نانوفناوری پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران youmort@yahoo.com

دریافت: ۹۶/۶/۲۸ پذیرش: ۹۷/۲/۸

چکیده

زمینه و هدف: *پیوند مغز استخوان یک رویکرد درمانی در درمان بیماری‌های بدخیم و غیر بدخیم خونی است. سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف به دلیل مزایایی چون سهولت دستیابی و در دسترس بودن، عدم وجود خطر برای اهداکنندگان، پایین‌تر بودن میزان آلودگی و... جایگزین مناسبی برای سلول‌های بنیادی خونساز مغز استخوان می‌باشند. محدودیت اصلی در استفاده از آنها، مقدار کم این سلول‌ها به دلیل حجم کم خون بند ناف است. هدف از این مطالعه گسترش سلول‌ها در محیط شبیه سازی شده ریز محیط بافت طبیعی در آزمایشگاه بود که یکی از راه‌کارها جهت غلبه بر این محدودیت است.*

روش بررسی: *به منظور غلبه بر محدودیت تعداد سلول‌های بنیادی خونساز، و با در نظر گرفتن اهمیت توپوگرافی و شیمی سطح بستر سلول‌های CD133+ با روش MACS جداسازی شده و میزان خلوص سلول با فلوسایتومتری بررسی شد. سپس سلول‌های CD133+ بر روی بستر نانوالیاف PLLA کونژوگه شده با کلاژن- فیبرونکتین، محیط سه بعدی (PLLA) و محیط دو بعدی کشت داده شدند.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های CD133+ جداسازی شده دارای درصد خلوص مناسبی جهت انجام مراحل بعدی کار می‌باشند. مقایسه بین گروه‌های مورد مطالعه نیز نشان داد که سلول‌های کشت شده در گروه سه بعدی پوشیده شده با کلاژن- فیبرونکتین میزان تکثیر بالاتری نسبت به داربست PLLA و سیستم معمول کشت سلولی (کشت دو بعدی) دارد ($P < ۰/۰۰۰۱$)، همچنین قدرت کلنی‌زایی و زیست سازگاری نیز در این گروه بیشتر است ($P < ۰/۰۵$).*

نتیجه گیری: *نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پوشاندن داربست سه بعدی PLLA با کلاژن- فیبرونکتین، سیستم مناسبی را به منظور تکثیر سلول‌ها با حداقل تمایز در محیط خارج از بدن فراهم می‌آورد.*

واژگان کلیدی: ***خون بند ناف، سلول‌های CD133+، PLLA، محیط سه بعدی***

۱- دانشجوی دکترای تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی و نانوفناوری پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.
۲- دکترای تخصصی خون شناسی، استاد هماتولوژی،گروه بیوتکنولوژی و نانوفناوری پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۳- دکترای تخصصی خون شناسی، استاد هماتولوژی، مرکز تحقیقات ژن درمانی سرطان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۴- دکترای تخصصی خون شناسی، دانشیار دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی، استادیار مرکز تحقیقات مکمل‌های غذایی و پروبیوتیک، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۶- دکترای تخصصی نانو فناوری پزشکی، دانشیار گروه بیوتکنولوژی و نانوفناوری پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۷- دکترای تخصصی نانو فناوری پزشکی، استادیار گروه مهندسی بافت و پزشکی بازیافتی، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۸- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی، استادیار بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

مقدمه

یکی از پرکاربردترین و موفقیت‌آمیزترین زمینه‌های به کارگیری سلول‌های بنیادی خونساز (HSC)، کاربرد آنها برای درمان ناهنجاری‌های خونی بدخیم و غیربدخیم می‌باشد. یک سلول بنیادی خونساز، سلول تمایز نیافته چند توان با توانایی تکثیر، خودنوزایی و تولید رده‌های مختلف خونی می‌باشد که این سلول‌ها معمولا توازن بین خودنوزایی و تمایز را حفظ می‌کنند. منابع سلول‌های بنیادی خونساز عبارتند از: مغز استخوان ،خون محیطی، کبد جنین و خون بند ناف (۱). اولین پیوند مغز استخوان توسط تزریق ترکیبات سلولی حاصل از مغز استخوان صورت گرفت و سوسپانسیون استخوانی تزریق شده شامل مجموعه هتروژنی از جمعیت‌های اصلی سلول‌های بنیادی خونساز بود. اما عدم دهندگان مناسب با تجانس HLA بالا و بروز واکنش پیوند علیه میزبان (GVHD) در گیرنده‌ی پیوند، از محدودیت‌های به کارگیری HSC های منتج از این منبع است (۲).

منبع دیگر، خون بند ناف (UCB) است که در جفت و بند ناف وجود دارد و مسئول تغذیه‌ی جنین می‌باشد. این منبع با وجود اینکه غنی از HSC ها و مقادیر زیادتر سلول بنیادی/پیش ساز (HPSC) در مقایسه با خون محیطی است، معمولا پس از تولد دور ریخته می‌شود. هر دو این سلول‌ها (HSCs و HPSC)، قدرت خودنوزایی دارند و محتوای سلول‌های بنیادی را در فرد حفظ می‌کنند. HSC های خون بند ناف در مقایسه با مغز استخوان واجد مزایای زیر است: سهولت جمع‌آوری و در دسترس بودن، عدم ریسک و یا خطر برای مادر/ نوزاد، عدم آلودگی خون بند ناف به ویروس‌هایی چون سیتومگالو ویروس (CMV)، ویروس اپشتاین بار (EBV) و عدم هر نوع ویروس و عفونتی دیگر که قابلیت انتقال دارد، کاهش پاسخ سلول‌های T و B در خون بند ناف در مقایسه با فرد بالغ و نهایتا کاهش رد ایمنولوژیک پیوند و GVHD به علت عدم T بالغ در خون بند ناف. اما دارای معایبی نیز می‌باشد که عبارتند از: عدم تجربه کافی در خصوص پیوند خون بند ناف، آلودگی UCB با سلول‌های مادری طی جمع آوری خون، محدودیت و تعداد کم سلول‌های بنیادی در هر واحد خون بند ناف (۶-۳)؛ که مورد آخر اصلی‌ترین محدودیت در به کارگیری این سلول‌ها برای اهداف درمانی می باشد. برای غلبه بر این محدودیت، روش‌های متعددی به کار گرفته شده است که از جمله‌ی آنها کشت و تکثیر سلول‌ها در محیط آزمایشگاه می‌باشد. دو فاکتور بستر محیط کشت (دوبعدی یا سه بعدی) و برهمکنش سلول- بستر و محیط کشت، اهمیت بسزایی در این فرآیند دارند. برای انتخاب نوع بستر و محیط کشت، توجه به این مساله که نیچ طبیعی HSCها (مغز استخوان) دارای ساختاری سه بعدی می‌باشد، به‌طور چشمگیری در کارکرد بیولوژیکی سلول‌ها موثر است. همچنین اکسیژن، مواد غذایی و فضا را برای رشد سلول‌ها فراهم می‌کند، این امر ما را به انتخاب داربست‌های سه بعدی به‌عنوان گزینه مناسبی که توپوگرافی بستر محیط کشت را شبیه سازی کنند سوق می‌دهد (۸و ۷). علاوه بر سه بعدی بودن نیچ طبیعی HSCها، ارتباط سلول‌ها با یکدیگر و ماتریکس خارج سلولی (ECM) نیز در برهمکنش سلول- بستر و محیط کشت تاثیرگذار می‌باشند. البته عوامل گوناگون دیگری چون جدول زمان بندی تعویض محیط کشت، حضور و عدم حضور سرم، تعداد سلول‌های منتقل شده به ظروف کشت و... نیز بر روند تکثیر تاثیر گذار می‌باشند.

در این راستا، استفاده از داربست مهندسی شده زیست تخریب پذیر که بستر مناسبی را جهت تکثیر و گسترش HSC ها در محیط آزمایشگاه فراهم کند دارای اهمیت بسزایی می‌باشد. در این مطالعه گسترش سلول‌های بنیادی CD133+ خون بند ناف که پیش ساز نابالغ

سلول‌های خونی می‌باشند، بر روی داربست سه بعدی زیست تخریب پذیر پلی ال لاکتیک اسید که تخریب آن سبب تولید اسید لاکتیک می‌شود صورت گرفت. جهت شبیه سازی ماتریکس خارج سلولی (ECM) که در برهمکنش سلول-بسترمحیط کشت دخیل است سطح داربست‌ها قبل از گسترش با ترکیب کلاژن-فیبرونکتین مهندسی شدند (۱۵-۹).

روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی بود و با کد اخلاق zums.Rec.1394.35 در شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان پذیرفته شد.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای (MNC)خون بندناف: نمونه‌های خون بند ناف از مادران باردار که ۹ ماه بارداری را سپری کرده و به روش طبیعی زایمان کرده بودند، بعد از گرفتن رضایت نامه کتبی تهیه گردید. جهت جداسازی MNC، نمونه خون به نسبت ۱:٦ با هیدروکسی اتیل استارچ (HES) رقیق و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط زیر هود قرار داده شد. سپس مایع رویی حاصل از این مرحله بر روی فایکول با غلظت ۱/۰۷۷گرم برمیلی‌لیتر (سیگما) به نسبت ۱:۲ انتقال داده شد و پس از سانتریفوژ، MNC ها جداسازی شدند.

جداسازی سلول‌های +CD133 از MNC های جدا شده در مرحله‌ی قبل: به منظور جداسازی سلول‌های +CD133، سلول‌های جدا شده با ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی ضد +CD133 نشان دار شده با ذرات آهن (Miltenyi Biotech USA) انکوبه گردید و پس از سانتریفوژ و شست‌وشوی رسوب حاصل، با استفاده از ستون MACS (Miltenyi Biotech USA)، سلول‌های +CD133 جداسازی شدند.

آنالیز فلوسایتومتری: به‌منظور تایید و تعیین میزان خلوص سلول‌های عبور داده شده از ستون MACS، سلول‌های جدا شده از ستون را با ۱۰ میکرولیتر آنتی بادی -CD133+ PE(Miltenyi Biotech USA) انکوبه نموده و سپس با دستگاه فلوسایتومتری Beckton (Dickinson, USA) میزان خلوص سلول‌های +CD133 جدا شده مورد بررسی قرار گرفت.

آماده سازی محیط کشت: محیط کشت مورد استفاده جهت تکثیر سلول‌ها، محیط Stemline II همراه با (۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر SCF، (۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر Flt3)، (۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر Tpo) بود.

کشت سلول‌ها در ظروف کشت پلاستیکی (TCPS): حدود ۵×۱۰^{٤} سلول +CD133 همرا با ۲۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد به هر چاهک پلیت ۲٤ خانه پلی استرینی اضافه و سپس پلیت به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد انکوبه شد. محیط‌ها هر ۲ تا ۳ روز یک بار تعویض گردید.

آماده سازی داربست: جهت ساخت نانو الیاف PLLA از فرآیند الکتروریسی استفاده شد. ابتدا پلی ال لاکتیک اسید در ۹ سی سی کلروفرم ۹ درصد وزنی/ وزنی و ۱ سی‌سی محلول N,N دی متیل (DMF) در دمای اتاق با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه روی همزن به مدت ٤ ساعت حل و همگن شد. سپس محلول به داخل سرنگ کشیده شد و پس از هواگیری در انتهای پمپ قرار گرفت تا ریسندگی بر روی آن انجام گیرد. ولتاژ به کار رفته ۲۲ کیلوولت و فاصله ی نازل تا جمع کننده ۲۳ سانتی‌متر تنظیم شده بود. سطح جمع‌کننده با ورقه‌ی نازک آلومینیومی پوشانده شد و الیاف بر روی پوشش آلومینیومی جمع آوری گردید. صفحات نانوالیافی تولید شده به مدت یک روز در آون خلا نگهداری و حلال زدایی شدند.

ارزیابی داربست‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی(SEM):

برای ارزیابی ساختار داربست سلولی، بررسی میزان تکثیر و اتصال سلول‌ها، داربست سلولی از روز صفر به‌عنوان یک

کنترل و روز ۷ داربست پوشیده شده با کلاژن- فیبرونکتین برای SEM آماده شد. برای این منظور، نخست سطح داربست‌های حاوی سلول با فسفات شست‌وشو داده شدند و سپس در گلوترآلدئید ۲/۵ درصد به‌مدت ۱ ساعت فیکس شدند. سپس به‌منظور حذف رطوبت و دهیدراته نمودن، داربست‌ها در شیب غلظت الکل قرار داده شده و خشک شدند؛ سطح نمونه‌ها با ضخامتی حدود ۱۲ نانومتر طلا پوشش داده شدند. نمونه‌های پوشش‌دار با استفاده از SEM مورد بررسی قرارگرفتند.

کشت سلول‌ها بر روی داربست پلی ال لاکتیک اسید (PLLA) سه بعدی: نخست داربست PLLA پس از پلاسما شدن به مدت ۱۸۰ ثانیه، در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور و سپس با PBS شست‌وشو داده شد، بعد از آن در معرض اشعه UV قرار گرفت و به مدت ۲٤ ساعت خشک شد و در انتها استریل گردید. سپس مطابق با چاهک‌های پلیت، ۲٤ خانه پانچ شدند و پس از قرار گرفتن در خانه‌های پلیت، با محلول EDC/NHS به‌مدت ۲٤ ساعت در یخچال برای ایجاد لنگرگاه پروتئین‌ها انکوبه شدند. سپس با کلاژن با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد پوشانده شدند. بعد از این مدت کلاژن‌ها از روی داربست‌ها برداشته شدند و سطح داربست با فیبرونکتین با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد پوشانده شد. در ادامه فیبرونکتین از روی داربست برداشته و حدود 5×10^{4} سلول CD133+ همرا با ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد به چاهک‌های پوشانده شده با کلاژن- فیبرونکتین افزوده شد. سپس پلیت به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد انکوبه شد. محیط‌ها هر ۲ تا ۳ روز یک بار تعویض گردید. در گروه کنترل، سلول‌ها بر روی داربست‌های PLLA بدون پوشش پروتئینی کشت شدند.

بررسی میزان کلنی زایی: به‌منظور بررسی میزان کلنی زایی، سلول‌های کشت شده در روز صفر و سلول‌های کشت شده در روز ۷، حدود 1×10^{4} سلول به حدود ۲ میلی‌لیتر محیط methocult افزوده شد و با استفاده از ورتکس کاملا مخلوط گردید. مخلوط حاصل در پتری دیش ۳۵ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس این پلیت همراه با دو پلیت حاوی آب دیونیزه در یک پلیت ۱۰۰ میلی‌لیتری به مدت ۷ روز در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO2 ۵ درصد نگهداری گردید. با استفاده از میکروسکوپ معکوس، کلنی‌های حاصل بررسی و شمارش شدند.

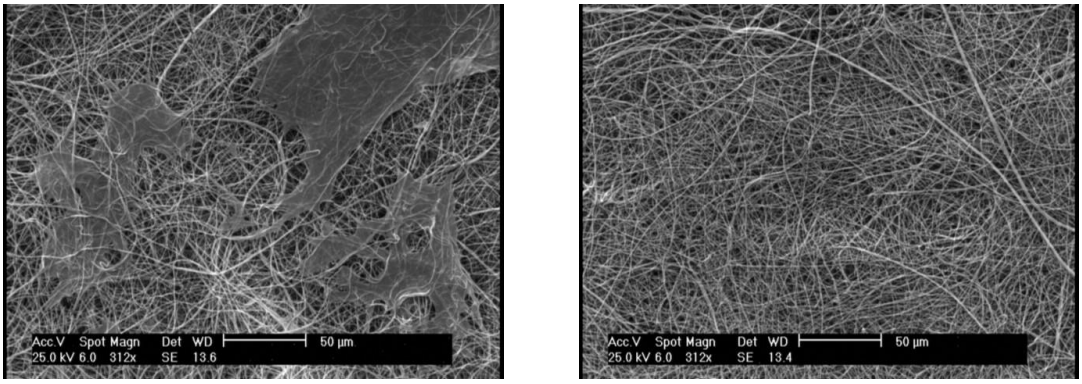
آزمون MTT: در این روش، ابتدا تعداد مناسبی سلول (ترجیحا ۳۰۰۰ سلول در هر چاهک) در هر یک از چاهک‌های حاوی داربست کشت داده شد تا سلول‌ها به مدت ۷ روز تکثیر شده و به حالت پایدار خود درآیند. در ادامه پس از گذشت ۳، ۵ و ۷ روز انکوباسیون محیط کشت رویی دور ریخته شد. به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول MTT اضافه گردید و به مدت ۲ تا ٤ ساعت در انکوباتور CO2 در ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد قرار داده شد. کریستال‌های فورمازان در آب غیرمحلول بوده و بایستی قبل از رنگ سنجی توسط ماده حلالی نظیر DMSO به حالت محلول درآیند. در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید و به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول‌ها محاسبه شد.

آنالیز آماری: تمامی تست‌ها سه بار تکرار شدند. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad (PRISM V 5.0 analytical Software) و روش آماری one-way ANOVAs انجام گرفت.

یافته ها

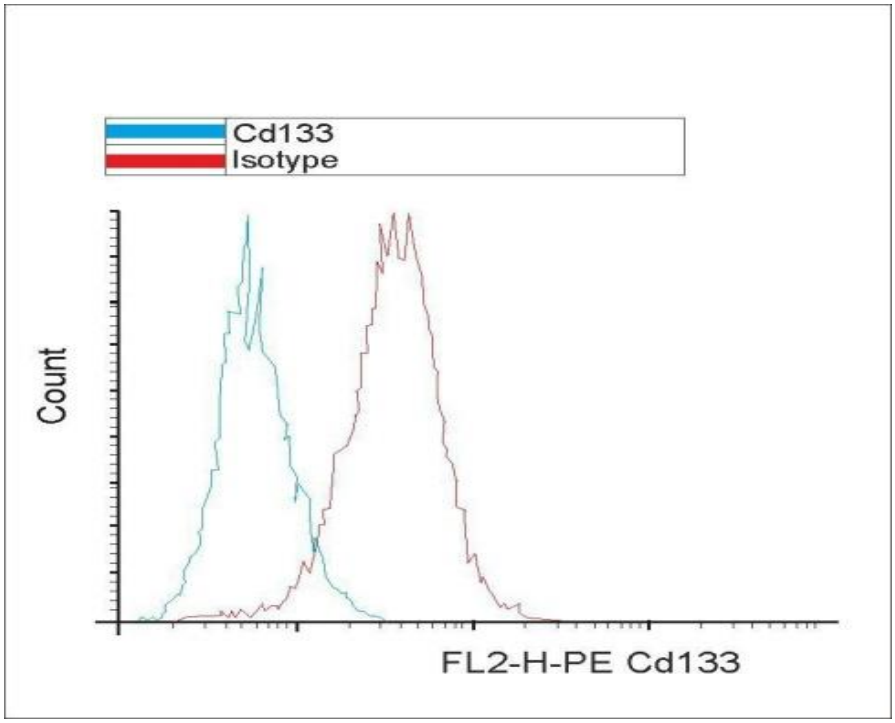
ارزیابی خواص فیزیکی داربست با استفاده از

میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM): نتایج شکل ۱ نشان داد که داربست PLLA دارای ساختاری متخلخل، یکنواخت با حفره‌های مرتبط می‌باشند. این ویژگی آن‌ها را برای استفاده در مهندسی بافت مناسب می‌سازد. همچنین حفره و تخلخل‌های داربست در اندازه‌ی نانو هستند که باعث می‌شود نسبت سطح به حجم در این مقیاس افزایش یافته و به همین نسبت قدرت اتصال سلول‌ها افزایش یابد.



ب الف

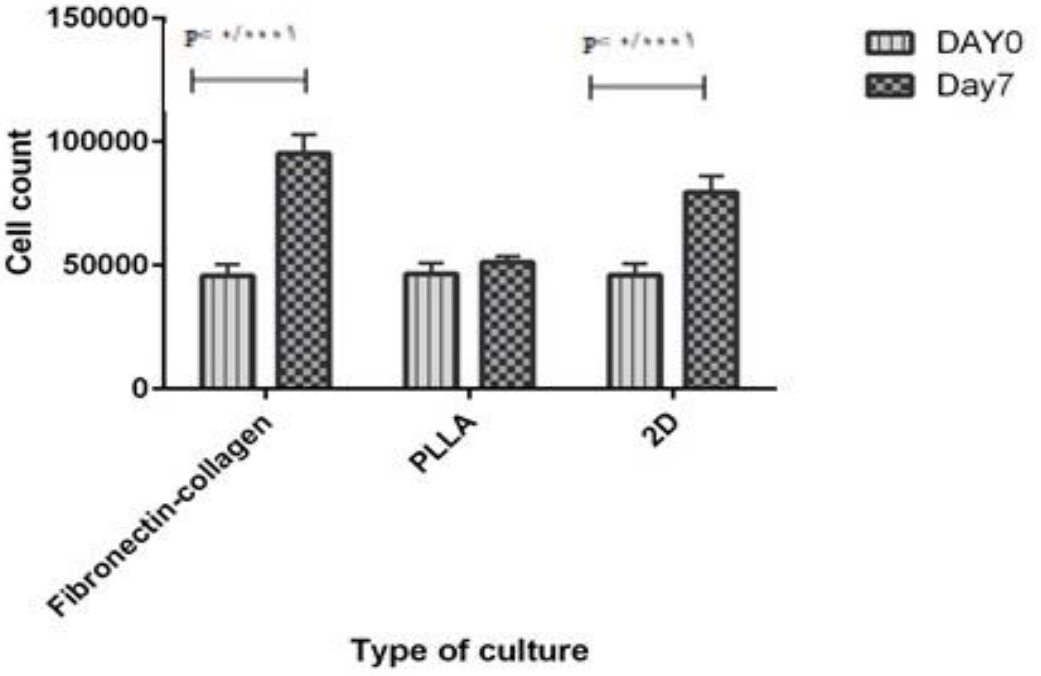
شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM). الف: داربست نانو الیاف PLLA قبل از گسترش سلول. ب: تصویر سلول‌های کشت شده در حالت 3D روز هفتم.



شکل ۲: نتیجه فلوسایتومتری سلول‌های کشت شده بر روی داربست PLLA پوشیده شده با کلاژن-فیبرونکتین

آنالیز فلوسایتومتری: تایید سلول‌های +CD133 خون بند ناف که توسط تکنیک MACS جدا سازی شدند با استفاده از فلوسایتومتری انجام شد. درصد خلوص قبل از کشت ۹۳ درصد و بعد از کشت بر روی داربست‌های PLLA پوشیده شده با کلاژن- فیبرونکتین، بعد از ۷ روز ۷۸/۲ درصد بود (شکل ۲). (درصد خلوص پس از کشت بر روی دار بست PLLA و محیط دو بعدی به ترتیب ۵۷/٤ درصد و ۳۵/٦ درصد (۱۱).

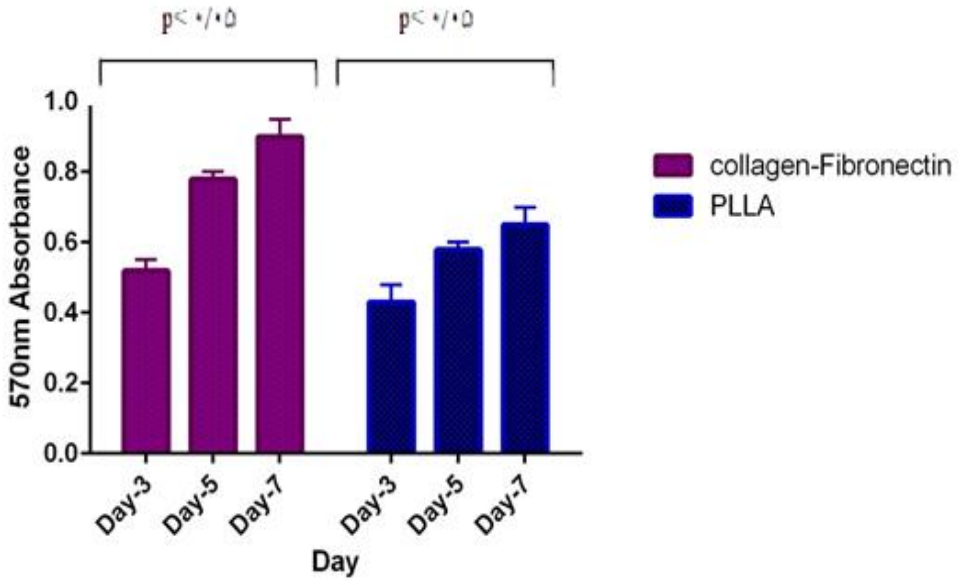
گسترش سلول‌های +CD133 بر روی داربست PLLA پوشیده شده با کلاژن- فیبرونکتین، داربست PLLA، محیط کشت دو بعدی: پس از گذشت ۷ روز، سلول‌های +CD133 شناور موجود در سه محیط، مورد شمارش قرار گرفتند. تعداد سلول‌ها به ترتیب در محیط کشت داربست PLLA پوشیده شده با کلاژن- فیبرونکتین، داربست PLLA و محیط کشت دو بعدی به ترتیب ۱/٤، ۱/۱ و ۲/۱ فواد افزایش نشان دادند. در داربست PLLA پوشیده شده با کلاژن- فیبرونکتین و محیط کشت دو بعدی اختلاف معناداری در تعداد سلول‌ها در روز صفر و ۷ وجود داشت (P<۰/۰۰۰۱) (شکل ۳).



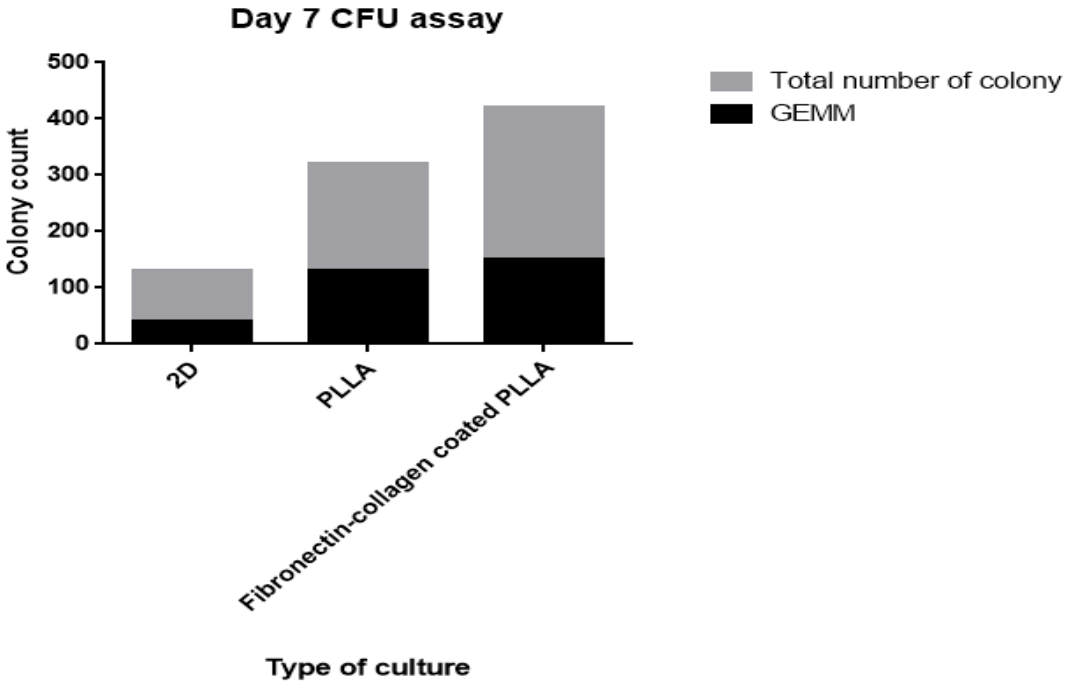
شکل ۳: مقایسه میزان افزایش سلول‌ها در محیط ۲بعدی و ۳بعدی در روز ۰ و روز ۷

زیست سازگاری داربست PLLA: همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده، زیست سازگاری داربست PLLA در روزهای ۳، ۵ و ۷ پس از کشت سلول مورد ارزیابی قرار گرفته است. حیات و بقای سلول‌ها به ترتیب در هر ۳ روز مورد بررسی در داربست پوشیده شده با کلاژن- فیبرونکتین، داربست فاقد پوشش پروتئینی افزایش یافته که نشان دهنده‌ی سازگاری سلول‌ها با داربست سه بعدی است و شرایط تکثیر برای سلول‌ها فراهم است، اما همان طور که شکل ٤ نشان می‌دهد این افزایش در داربست‌های پوشیده شده با کلاژن-

فیبرونکتین به مراتب بیشتر از داربست PLLA فاقد پوشش پروتئینی است (P<۰/۰۵) (شکل ٤).



*شکل ٤: تست **MTT** سلول‌های کشت شده بر روی داربست‌های ۳ بعدی: کلاژن- فیبرونکتین و **PLLA***



*شکل ۵: مقایسه قدرت کلنی زایی سلول‌های کشت شده بر روی محیط ۳ بعدی و دو بعدی و نسبت کلنی‌های **GEMM** به کل کلنی‌های تشکیل شده در روز ۷*

نتایج حاصل از بررسی کلنی زایی: به منظور تعیین قدرت کلنی‌زایی CD133+ ها، ۷ روز پس از کشت، آزمون سنجش کلنی بر روی سلول‌هایی که در محیط کشت ۳ بعدی و ۲ بعدی کشت شده بودند انجام شد. تعداد کل کلنی در محیط سه بعدی پوشیده شده کلاژن- فیبرونکتین نسبت به ۲ محیط دیگر بیشتر بود. همچنین تعداد کلنی‌های CFU-GEMM که حاوی سلول‌های پرتوان پیشساز رده‌های میلوئیدی می‌باشد، نسبت به بقیه ی کلنی‌ها بیشتر بود که این وضعیت در هر ۳ محیط مورد بررسی به همین صورت بود (شکل۵).

بحث

پیوند HSC ها یک درمان استاندارد برای بیماری‌های خونی پیشرفته و با خطر بالا است. وجود پیش‌سازهای کافی برای ایجاد یک پیوند موفق به واسطه‌ی پیوند HSC های خون بند ناف در ۳۰ تا ۸۰ درصد کودکان گزارش شده است (۱۶). اما محدود بودن تعداد سلول‌های هسته‌دار موجود در یک واحد UCB، محدودیتی در استفاده از این سلول‌ها در پیوند UCB در بالغین به شمار می رود. در این راستا روش‌های متعددی جهت غلبه بر این محدودیت پیشنهاد شده که عبارتند از: پیوند همزمان چندین واحد UCB، تزریق همزمان HSC های خون بند ناف همراه با سلول‌های استرومال مغز استخوان خود بیمار یا فرد اهدا کننده و نهایتا تکثیر و گسترش برون تن HSC ها و سپس تزریق سلول‌های تکثیر شده. از این رو کشت سلول‌ها بر روی ساختاری سه بعدی، از این جهت که سلول‌ها در محیطی مشابه با کنام طبیعی خود تکثیر می‌شوند دارای اهمیت بسزایی می‌باشد (۱۷). اخیرا دانشمندان دریافته‌اند که کشت سه بعدی سلول‌ها تغییرات شگفت انگیزی را در ساختار و عملکرد آن به وجود می آورد. کوکریمان و همکاران نشان دادند که فیبروبلاست‌های کشت داده شده در کشت‌های سه بعدی در مقایسه با کشت‌های دو بعدی سریع‌تر تکثیر شده و مهاجرت می کنند. به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها به علت نزدیکی سلول‌ها به یکدیگر در کشت سه بعدی و شبیه سازی محیط موجود زنده باشد (۱۸). علاوه بر این، عملکرد سلول‌ها در محیط آزمایشگاه شدیدا وابسته به آرایش ترکیبات سلولی و غیر سلولی در مقیاس نانومتر و میکرومتر در ماتریکس خارج سلولی است. همچنین برای حمایت فیزیکی سلول‌ها، ECM طبیعی بستری با لیگاندهای ویژه را برای حمایت و چسبندگی سلول‌ها فراهم می‌کند و پیام‌هایی را به صورت سیگنال‌های داخل سلولی ایجاد نموده و بر بیان ژن‌ها و رشد و تکثیر سلول‌ها تاثیر می‌گذارد. همچنین تکثیر و عملکرد سلولی را با فاکتورهای رشد متنوع تنظیم می‌کند (۱۹). لذا، طراحی داربست‌های مهندسی شده با پروتئین‌هایی چون فیبرونکتین و کلاژن که در ECM نیز یافت می‌شوند بر رشد و تکثیر سلول‌ها تاثیر گذار می‌باشد (۲۱و ۲۰). در مطالعه‌ی مورد بررسی نیز گسترش سلول‌ها بر روی محیط کشت دوبعدی، داربست سه بعدی PLLA و داربست سه بعدی PLLA پوشیده شده با کلاژن-فیبرونکتین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج شمارش سلول‌های موجود در مایع رویی نشان داد که تعداد سلول‌های شناور در محیط دو بعدی پس از ۷ روز افزایش یافته، اما در محیط سه بعدی تعداد سلول‌های شناور کاهش یافته که استنباط اولیه می‌تواند این باشد که کشت سلول‌ها در محیط سه بعدی باعث کندی تکثیر سلول‌ها شده اما نتایج تست MTT در روزهای ۳، ۵ و ۷ نشان داد که میزان بقای سلول‌های کشت شده در محیط سه بعدی به تدریج افزایش یافته است. این امر موید آن است که میزان تکثیر سلول‌ها در داربست‌های پوشیده شده با پروتئین به مراتب بیشتر از گروه سه بعدی بدون پوشش پروتئینی می‌باشد. از این رو در خصوص افزایش تکثیر در داربست PLLA مهندسی شده با پروتئین می‌توان گفت خصوصیات شیمیایی سطح به اندازه ویژگی‌های توپوگرافی در سرعت

تکثیر HSC ها و گسترش سلول‌های +CD133 اهمیت دارد. همچنین با توجه به درصد خلوص قبل از کشت (۹۳ درصد) و بعد از۷ روز کشت بر روی داربست‌های PLLA پوشیده شده با کلاژن- فیبرونکتین (۷۸/۲ درصد)، دار بست PLLA (۵۷/٤ درصد) و محیط دو بعدی (۳۵/٦ درصد)، مشخص شد که سلول‌های گسترش بر روی داربست‌های PLLA پوشیده شده با کلاژن- فیبرونکتین، از لحاظ فراهم‌آوری موثرتر بوده‌اند. تعداد سلول‌های ناکارآمد شده نیز بر با در نظر گرفتن تعداد سلول‌های اولیه و درصد خلوص قابل محاسبه است (شکل ۲). لیو و همکاران نیز نشان دادند که کشت سه بعدی سلول‌های بنیادی موشی بر داربست‌های فیبرینی و فیبرین همراه با پلی اتیلن گلیکول ممکن است بر بیان نشانگرهای بنیادینگی تاثیر بگذارد (۲۲و ۸). لی و همکارانش طی پژوهش‌های خود دریافتند که کشت روی ماتریکس‌های پلی استر nonwoven برهمکنش‌های سلول- سلول و سلول- ماتریکس، گسترش سلول‌های استرومایی و سلول‌های خونساز را افزایش می‌دهد. غیر متحرک کردن سطح کووالانسی پروتئین‌های ECM از قبیل فیبرونکتین به چسبندگی سلول‌های HSC به بستر کمک می‌کند و گسترش این سلول‌ها را افزایش می‌دهد (۲۳). چوا و همکارانش نیز گسترش HSC های بند ناف انسانی را در سطوح عمل آوری شده با لایه‌های پلی اتر سولفون (PES) و شبکه‌های نانو رشته‌ای PES آزمایش کردند. آنها مشاهده کردند که از بین سطوح PES کربوکسیله شده، آمینه شده و سطح پلی استر کشت بافت، PES آمینه شده بالاترین کارآیی را برای گسترش سلول‌های +CD34 و+CD45 و پتانسیل تولید کلنی دارا بود. شبکه‌ی نانو رشته‌ای آمینه شده، همچنین، چسبندگی بستر- HSC و گسترش کلونی‌های چند دودمانی (CFU-GEMM) تشکیل دهنده سلول‌های پیش ساز را افزایش می‌دهند (۲٤). در مطالعه‌ی پیش رو نیز کلونی‌های GEMM در سطوح سه بعدی پوشانده شده با کلاژن- فیبرونکتین به مراتب بیشتر از محیط سه بعدی و دو بعدی می‌باشد (۲۵). با توجه به نمودارهای شکل ٤ و ۵ مشاهده می‌شود، داربست ۳ بعدی پوشیده شده با کلاژن- فیبرونکتین در حفظ بنیادینگی سلول و فعالیت ها موثرتر بوده است.

تمامی این مطالعات نشان دهنده‌ی اهمیت تاثیر بستر کشت در تکثیر و تمایز سلول‌های +CD133 می‌باشد. مکانیسم احتمالی برای تاثیرات مشاهده شده سطوح آمینه شده این است که اجزای پروتئینی معینی از محیط کشت را افزایش می‌دهند که بعدها می‌توانند در گسترش سلول‌ها شرکت کنند و یا اینکه گیرنده‌های +CD133 به طور مستقیم با سطوح آمینه برهمکنش می‌دهند. در واقع می‌توان گفت بارهای مثبت لیگاند در این مورد گروه آمینی متصل به سطح می‌توانند با آنتی ژن CD133 با بار منفی جفت شوند و پذیرای سلول‌های +CD133 شده و سیگنال‌هایی را جهت رشد و تکثیر آنها فراهم آورند (۲٦). مقایسه‌ی سرعت تکثیر و گسترش سلول های +CD133 در سطوح PLLA فاقد پروتئین نیز در مقایسه با محیط دو بعدی روند بهتری را نشان می‌دهد که دلیل عمده‌ی آن به‌علت شبیه سازی ساختار سه بعدی نیچ طبیعی سلول‌ها با به کارگیری و استفاده از داربست سه بعدی بر تکثیر سلول ها تاثیر بسزایی داشته است. شکل ۳، مقایسه‌ی میزان افزایش سلول‌ها در محیط دو بعدی و سه بعدی را نشان می‌دهد، این افزایش در گروه سه بعدی به دلیل توپوگرافی بستر به مراتب بیشتر می‌باشد.

بنابراین حتی اگر اهمیت خصوصیات بیوشیمی بستر را نیز نادیده بگیریم، توپوگرافی بستری که تداعی‌کننده شبکه‌ی تور مانند سه بعدی پیچیده‌ی ریز محیط مغز استخوان می باشد در تنظیم عملکرد سلول های +CD133 از قبیل خودنوزایی، تکثیر و انتخاب سرنوشت تاثیر گذار است.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان دهنده‌ی این است که پوشاندن

داربست سه بعدی PLLA با کلاژن- فیبرونکتین، سیستم مناسبی را به منظور تکثیر سلول‌ها با حداقل تمایز در محیط خارج از بدن فراهم می‌آورد.

References

1- Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 93-106.

2- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* 1996; 382: 635-8.

3- Mehta R, Rezvani K, Olson B, et al. Novel techniques for ex vivo expansion of cord blood: Clinical Trials. *Front Med.* 2015; 2: 89.

4- Mousavi SH, Abroun S, Soleimani M, Molwa SJ, et al. Expansion of human cord blood hematopoietic stem/progenitor cells inthree-dimensional Nanoscaffold coated with Fibronectin. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2015; **9**: 72-79.

5- Eskandari F, Allahverdi A, Nasiri H, et al. Nanofiber expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Iran J Pediat Hematol Oncol.* 2015; 5: 170-78.

6- Bertolini F, Battaglia M, Lanza A, et al. Stem cell enumeration in cord blood vs bone marrow and peripheral blood. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 1: S57.

7- Dravid G, Rao S. Ex vivo expansion of stem cells from umbilical cord blood: expression of cell adhesion molecules. *Stem Cells.* 2002; 20: 183-89.

8- Lu J, Aggarvval R, Pompili VJ, Das H. A novel technology for hematopoietic stem cell expansion using combination of nanofiber and growth factors. *Recent Pat Nanotechnol.* 2010; 4: 125-35.

9- Liu HC, Lee IC, Wang JH, Yang SH, Young TH. Preparation of plla membranes with different morphologies for culture of ligament cells. *Biomatericals.* 2004; 25: 4047-56.

10- Ma Z, C Gao, J Shen. Surface modification of poly-L-lactic acid (PLLA) membrane by grafting acrylamide: an effective way to improve cytocompatibility for chondrocytes. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2003; 14: 13-25.

11- Islami M, Mortazavi Y, Soleimani M, Nadri S. In vitro expansion of CD 133+ cells derived from umbilical cord blood in poly-L-lactic acid(PLLA) scaffold coated with fibronectin and collagen. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46: 1025-33.

12- Mokhtari S, Baptisat P, Vyas D, et al. A new approach to expand cord blood derived hematopoietic stem cells, using bioengineered human fetal liver tissue 3D-constructs. *Blood.* 2015. 126: 3097.

13- Mansourizadeh F, Asadi A, Oryan SH, Nematollahzadeh A, Dodel M, Asghavi M. PLLA/HA Nano composite scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue

engineering. *Molecular Biol Res Communicat.* 2013; 2: 1-10.

14- Dubey G, Mequanint K. Conjugation of fibronectin onto three-dimensional porous scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia.* 2011; **7**: 1114-25.

15- Colombo E, Calcaterra F, Cappelletti M, Marilio D, Dell Bella S, et al. Comparison of fibronectin and collagen in supporting the isolation and expansion of endothelial progenitor cells from human adult peripheral blood. *PLoS One.* 2013; 8: e66734.

16- Walasek MA, Van OSR, De Haan G. Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. *Ann N Y Acad Sci.* 2012. 1266: 138-50.

17- Carletti E, Motta A, Migliaresi C. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *Methods Mol Biol.* 2011. 695: 17-39.

18- Serebriiskii I, Castell-Cros R, Lamb A Golemis EA, Cukierman E, et al. Fibroblast-derived 3D matrix differentially regulates the growth and drug-responsiveness of human cancer cells. *Matrix biol.* 2008; 27: 573-85.

19- Celebi B, Mantovani D, Pineault N, Effects of extracellular matrix proteins on the growth of haematopoietic progenitor cells. *Biomed Mater.* 2011; 6: 055011.

20- Connor NS, Aubin JE, Sodek J, Independent expression of type I collagen and fibronectinby normal fibroblast-like cells. *J Cell Sci*. 1983; 63: 233-44.

21- Klamer S, Voermans C. The role of novel and known extracellular matrix and adhesion molecules in the homeostatic and regenerative bone marrow microenvironment. *Cell Adh Migr.* 2014; 8: 563-77.

22- Liu H, Lin J, Roy K. Effect of 3D scaffold and dynamic culture condition on the global gene expression profile of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials.* 2006; 27: 5978-89.

23- Zheng Li, Zhen XU,Yingjun Liu, Wan R, Gao CH. Multifunctional non-woven fabrics of interfused graphene fibres. *Nature Communicate.* 2016; **7**: 13684.

24- Chua KN, Char C, Lee PC, et al. Surface-aminated electrospun nanofibers enhance adhesion and expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Biomaterials.* 2006; 27: 6043-51.

25- Mc Carthy J, Turley EA. Effects of extracellular matrix components on cell locomotion. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4: 619-37.

26- Hernandez T, Esparza M, Perez AB, et al. A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J Leukoc Biol*. 2006; 79: 46-58.

Ex Vivo Expansion of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells on Collagen- Fibronectin Coated Electrospun Nano Scaffold

Islami M[1], Mortazavi Y[1,2], Soleimani M[3], Soleimanifar F[4], Nadri S[1], Hosseinzadeh S[5], Darvish M[6]

[1]Dept of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[2]Cancer Gene Therapy Research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[3]Dept.of Hematology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

[4]Dietary and Supplements Probiotic Research Center, Alborz University of Medical Sciences, Karaj Iran

[5]Dept. of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Shahidbeheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[6]Dept. of Medical Biotechnology, Fculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Corresponding Author: Mortazavi Y, Dept of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

E-mail: youmort@yahoo.com

Received: 19 Sep 2017 **Accepted:** 28 Apr 2018

***Background and Objective*:** Umbilical Cord blood (UCB) hematopoietic stem cell (HSC) transplantation is a therapeutic approach for the treatment of malignant and non-malignant hematologic disorders due to ease of collection, lack of risk for donors and lower levels of infection. Moreover, it is considered a good alternative for bone marrow HSC transplantation. The main limitation of their use is insufficient amount of HSCs due to low volume of blood collected from umbilical cord. A possible solution to overcome this limitation may be the in vitro expansion of these cells on 3D nanofiber scaffolds, with the goal of natural niche's topography and chemistry mimicking.

Materials and Methods: In this study, MACS isolated CD133+ cells were confirmed via flow cytometry and then cultured in three conditions: 2-dimensional culture (2D), 3D PLLA scaffold and collagen-fibronectin coated PLLA scaffold.

Results: Comparison between three aforementioned groups showed that collagen-fibronectin coated scaffold had the highest expansion level CD133+ cells, while also having the highest clonogenic capacity and biocompatibility.

Conclusion: The results of this study showed that the protein coating of 3D PLLA scaffold with collagen-fibronectin provides a suitable system for the expansion of cells with minimal differentiation in vitro.

Keywords: CD133+, Cord blood, PLLA, 3D Culture, Hematopoietic Stem Cells