

تاثیر آشیانه‌های جفتی شبیه‌سازی شده با داربست پلی لاکتیک اسید در تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز مشتق از بافت جفت انسانی

آزاده امیدخدا^۱، دکتر سعید کاویانی^۲، دکتر مسعود سلیمانی^۳، دکتر مهین نیکوگفتار^۴، دکتر امیرآشتی^۵، دکتر زهرا ذنوبی^۴،
دکتر لیلا ابراهیمی^۵

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی پزشکی، گروه هماتولوژی Kavyanie@yahoo.com

دریافت: ۹۳/۴/۸ پذیرش: ۹۳/۶/۸

چکیده

زمینه و هدف: اگرچه امروزه خون بندناف یکی از معمول‌ترین منابع سلول‌های بنیادی خونساز برای مصارف بالینی به شمار می‌آید اما میزان کم سلول‌های بنیادی خونساز موجود در آن، مهمترین فاکتور محدود کننده استفاده از این منبع سلولی در پیوند می‌باشد. پیوند توام سلول‌های بنیادی خونساز حاصل از بافت جفت با سلول‌های خون بندناف همان نمونه می‌تواند راهکار مناسبی برای افزایش این سلول‌ها باشد. در این مطالعه سعی شد آشیانه‌های جفتی با استفاده از داربست‌های نانو ساختار شبیه سازی و سلول‌های بنیادی خونساز مشتق از جفت در آن‌ها تکثیر شوند. **روش بررسی:** سلول‌های استرومایی مختلف به همراه سلول‌های بنیادی خونساز حاصل از بافت جفت بر روی داربست‌های نانو ساختار پلی لاکتیک اسید پوشیده شده با کلاژن کشت داده شدند. سپس میزان تکثیر سلول‌ها در این آشیانه‌ها ارزیابی شد. **نتایج:** تکثیر سلول‌ها در آشیانه تولید شده، با افزایش ۳/۶ برابری آن‌ها همراه بود اما پتانسیل کلون‌زایی سلول‌های تکثیر شده نسبت به قبل از تکثیر کاهش معناداری پیدا کرد ($P=0.0001$). درصد سلول‌های بنیادی خونساز نیز پس از تکثیر افزایش یافت اما این افزایش معنادار نبود ($P>0.05$).

نتیجه گیری: با توجه به کاهش پتانسیل کلون زایی سلول‌های بنیادی خونساز حاصل از بافت جفت پس از تکثیر، تکثیر سلول‌های بنیادی بخشی از جفت راهکار مناسبی نبوده و بایستی راه کارهای استخراج سلول‌های بنیادی خونساز تمامی بافت جفت با روش‌های ارزان و بدون کشت مدنظر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: جفت، سلول‌های بنیادی خونساز، آشیانه سلول‌های بنیادی خونساز، داربست‌های نانو ساختار

مقدمه

امروزه پیوند سلول‌های بنیادی خونساز، نقش موثری در درمان بیماری‌های مختلف به ویژه بدخیمی‌های خونی دارد. خون بندناف یکی از معمول‌ترین منابع سلول‌های بنیادی خونساز برای پیوند به شمار می‌آید اما میزان کم سلول‌های

۱- دانشجوی دکترای هماتولوژی و بانک خون، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- دکترای خون شناسی، دانشیار دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دکترای خون شناسی، استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه‌ی عالی پژوهشی طب انتقال خون، تهران

۴- متخصص زنان و زایمان، استادیار دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۵- دستیار زنان و زایمان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

بنیادی خونساز موجود در یک واحد خون بندناف، مهم‌ترین فاکتور محدود کننده‌ی استفاده از این منبع سلولی در پیوند به ویژه در بزرگسالان می‌باشد (۲ و ۱). به منظور حذف این محدودیت، تلاش‌های زیادی انجام شده است که از آن جمله می‌توان به روش‌های مختلف تکثیر این سلول‌ها در محیط کشت قبل از پیوند اشاره کرد (۵-۳). اگرچه دستورالعمل‌های مختلفی در این زمینه مورد استفاده قرار گرفته است اما هنوز هیچ کدام از آن‌ها به یک دستورالعمل کاربردی تبدیل نشده‌اند که شاید مهم‌ترین دلیل این موضوع عدم ایجاد شرایط مناسب کشت برای سلول‌های بنیادی خونساز در محیط کشت است. به عبارت دیگر محققان تاکنون نتوانسته‌اند شرایط و محیطی که سلول‌های بنیادی خونساز در بدن جهت تکثیر در اختیار دارند را در محیط کشت بازسازی کنند (۷ و ۶). خصوصیت خود نوسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز در بدن توسط ریز محیط مخصوصی به نام آشیانه تنظیم می‌گردد (۸). از مهم‌ترین اجزاء یک واحد آشیانه، می‌توان به سلول‌های استرومایی مختلف، ماتریکس بین سلولی بیشتر از جنس کلاژن و سلول‌های بنیادی خونساز در سطوح مختلف تمایزی اشاره کرد که در آن سلول‌های بنیادی خونساز در لابلای سلول‌های استرومایی و ماتریکس بین سلولی قرار گرفته‌اند (۹-۱۲). بنابراین با توجه به پیچیدگی‌های زیاد این سیستم، بازسازی آشیانه در محیط کشت جهت تکثیر موفق سلول‌های خونساز، به سادگی امکان پذیر نمی‌باشد. غیر از استراتژی تکثیر در محیط کشت، از دیگر راهکارهای افزایش تعداد سلول‌های بنیادی خونساز خون بند ناف، می‌توان به پیوند دو یا چند کیسه خون بند ناف اشاره کرد که اگر چه مشکل تعداد کم سلول را بر طرف خواهد کرد اما با مشکلات دیگری از جمله عدم تطابق کامل آنتی ژن‌های سازگار نسجی بین کیسه‌های پیوندی و گیرنده و افزایش امکان رد پیوند همراه می‌باشد (۱۴ و ۱۳). بنابراین افزایش تعداد سلول‌های مفید برای خونسازی در صورتی موفق خواهد بود که سلول‌های

اضافه شده از همان منبعی باشند که خون بندناف از آن به دست آمده است. یکی از منابعی که می‌تواند به عنوان منبع مکمل سلول‌های خون بندناف مورد توجه قرار گیرد، بافت جفت می‌باشد. بافت پارانشیم جفت دارای بافت همبند متراکم بوده و مملو از عروق می‌باشد. هرچند که مطالعات کمی مبنی بر وجود سلول‌های خونساز در بافت جفت وجود دارد اما وجود این سلول‌ها در جفت موش (۱۵) و اخیراً در جفت انسان مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶ و ۱۷). ما نیز در مطالعه‌ی قبلی خود امکان جدا سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های بنیادی خونساز را از بافت جفت نشان دادیم (۱۸). استفاده از تمامی سلول‌های بنیادی خونساز یک بافت جفت کامل به دلیل حجم زیاد آن مستلزم روش‌های پرهزینه و زمان بر می‌باشد. در صورت تکثیر موفق این سلول‌ها، نیاز به جدا سازی سلول‌های خونساز از تمامی بافت جفت از بین خواهد رفت. از آنجایی که بهترین حالت تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز در حضور آشیانه‌ی آن‌ها صورت می‌گیرد، در این مطالعه سعی شد ابتدا آشیانه‌های جفتی سلول‌های بنیادی خونساز در محیط کشت شبیه سازی شوند و سپس سلول‌های بنیادی خونساز مشتق از بافت جفت در این آشیانه‌ها تکثیر شوند. برای ساخت چنین آشیانه‌ای داربست پلی‌لاکتیک اسید (PLLA) پوشش داده شده با کلاژن به همراه تمام سلول‌های استرومایی و خونساز حاصل از هضم آنزیمی قسمت کوچکی از بافت جفت بدون انتخاب سلولی خاص، مورد استفاده قرار گرفتند و تکثیر کمی و کیفی سلول‌ها در این آشیانه‌های جفتی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

ساخت داربست: محلول پلی‌لاکتیک اسید با حل کردن پلی لاکتیک اسید ایزومر L در حلال کلروفرم و هم زدن با سرعت ملایم در دمای اتاق به مدت دو ساعت حاصل شده و سپس حلال DMF به آن اضافه شده و محلول یکنواخت با

۷ پس از کشت تحت آزمایش MTT قرار گرفتند. برای انجام این تست ابتدا محیط روی داریست‌ها برداشت شد و محلول MTT به نسبت ۱ به ۱۰ با محیط بدون سرم مخلوط و به داریست اضافه شد، سپس پلیت حاوی داریست در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. پس از سپری شدن زمان مورد نظر، محیط روی داریست‌ها برداشت شده، بلورهای فرمازان تشکیل شده بر روی داریست‌ها با DMSO حل و در دستگاه الیزا ریدر با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

جداسازی سلول از بافت جفت: در این مطالعه که به صورت تجربی انجام گرفت، بافت جفت اهدایی از ۵ دهنده مورد بررسی قرار گرفت. این نمونه‌ها از بیمارستان میلاد و مهدیه و با گرفتن رضایت نام‌هی کتبی تهیه گردید. استفاده از این نمونه‌ها به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس رسید. مقدار ۲۰ گرم از بافت جفت در شرایط کاملاً استریل گرفته شده و در لوله فالكون حاوی PBS و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین ریخته شد. از این بافت میزان ۵ گرم جدا شده، با تیغ به قطعات خیلی ریز تقسیم شده، سه بار با PBS شسته شده و به آن ۵۰ میلی‌لیتر کلاژن از تیپ IV به میزان ۰/۱ درصد (وزنی حجمی) اضافه گردید. این محلول به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس محلول فوق از گاز پنبه‌ای عبور داده شده و سوسپانسیون عبوری، ۲ بار با PBS شسته شد (آنزیم و سایر مواد از شرکت GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA تهیه شد). پس از شستشو، به منظور حذف یاخته‌های سرخ از سوسپانسیون سلولی، از بافر لیز کننده‌ی یاخته‌های سرخ استفاده گردید. بعد از این مرحله توده‌ی سلولی سفید رنگ به دست آمد که طبق نتایج مطالعه‌ی قبلی ما (۱۸)، حاوی سلول‌های بنیادی خونساز و استرومایی بود.

شمارش سلولی: برای شمارش سلولی و تعیین درصد سلول‌های زنده، از رنگ تریپان بلو استفاده گردید. به این

غلظت ۴ درصد تهیه شد. در طی الکتروریسی از اختلاف پتانسیل ۲۰ کیلوولت به سر سوزن سرنگ‌ها استفاده شده و شدت جریان جرمی محلول پلیمری ۴ میلی‌لیتر در ساعت و شدت جریان h ثابت نگه داشته شد. کلیه‌ی آزمایشات در دمای بین ۲۵ تا ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. در مرحله‌ی بعد سطح نانوالیاف تحت فرایند پلاسمای اکسیژن قرار گرفته و سپس مقداری از آن با قرار دادن داریست به مدت ۲۴ ساعت در کلاژن نوع اول، سطح داریست با این ماده آغشته شد.

میکروسکوپ الکترونی: جهت بررسی ساختار نانوالیاف و نیز ارزیابی شکل و مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده روی داریست‌ها، از دستگاه میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. داریست‌های حاوی سلول، در محلول گلتارآلدئید ۲/۵ درصد به مدت یک ساعت تثبیت شده و جهت آگیری از داریست، از شیب فزاینده‌ی اتانول استفاده شد و از روش پوشش‌دهی با پلاتین، سطح نمونه‌ها رسانا گردید. میکروسکوپ الکترونی مورد استفاده در پروژه‌ی حاضر، دستگاه Philips مدل XL30 از کشور آلمان است. به منظور ارزیابی قطر نانوالیاف تولیدی، تصاویر میکروسکوپ الکترونی با استفاده از نرم‌افزار آنالیز تصویر مورد بررسی و تحلیل قرار گرفتند.

طیف‌سنجی مادون قرمز: به منظور بررسی کلاژن‌دار شدن PLLA، از دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز مدل Equinox 55 ساخت شرکت بروکر (از کشور آلمان) استفاده شد. صفحات نازک از نانوالیاف تهیه شده، پس از حلال‌زدایی با استفاده از آون خلا، به عنوان نمونه مورد آنالیز قرار گرفتند.

MTT: بررسی تغییرات در تعداد سلول‌های زنده و فعال با روش MTT صورت گرفت. به این ترتیب که سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از جفت، بر روی داریست‌های پوشیده شده با کلاژن کشت داده شده، در روزهای ۱، ۳، ۵ و

ترتیب که سلول و رنگ به میزان مساوی با یکدیگر مخلوط شده، سپس به کمک لام هماسیتومتر، تعداد کل سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده شمارش گردید.

کشت سلول در فلاسک کشت و بر روی داربست‌های نانو ساختار: مخلوط سلول‌های جفت به دست آمده از کلاژناز شمارش شدند و سپس تعداد 2×10^5 سلول در چاهک‌های پلیت ۴ خانه و یا بر روی صفحات داربست پوشیده شده با کلاژن که در کف پلیت ۴ خانه قرار داده شده بود، کاشته شدند. محیط کشت مورد استفاده، محیط Stem Spand (Stem Cell Technology, USA) به همراه فاکتورهای رشد SCF, TPO, FLT3 Ligand با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود. تعویض محیط هر سه روز یک بار انجام شد و تا ۱۵ روز ادامه یافت. مبنای تعداد اولیه سلول‌های خونساز درصدی از 2×10^5 سلول اولیه بود که بعد از گذشت ۲۴ ساعت در کشت به صورت غیر چسبیده باقی ماندند.

فلوسایتومتری: به منظور بررسی درصد سلول‌های بنیادی خونساز، سوسپانسیون سلولی به دست آمده از سلول‌های حاصل از جفت و سلول‌های استخراج شده از داربست در ۵۰ میکرولیتر آلبومین سرم گاوی تهیه و سپس به هر یک از لوله‌ها، ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی مورد نظر و یا آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل اضافه شد. این مارکرها شامل CD34 کوئزوگه با PE (Phyco Erythrin) و CD38 کوئزوگه با FITC (Fluorescein Iso Thio Cyanate) بود. همچنین از آنتی‌بادی FITC-IgG1 و PE-IgG1 به عنوان کنترل ایزوتایپ استفاده گردید. (تمامی آنتی‌بادی‌ها از شرکت eBioscience, San Diego, CA, USA تهیه شد).

سپس این لوله‌ها در دمای یخچال به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و بعد از سانتریفیوژ و دور ریختن مایع رویی، در محلول پارافرم آلدئید ۱ درصد فیکس و در نهایت توسط دستگاه فلوسایتومتری (پارتک، آلمان) مورد ارزیابی قرار

گرفتند. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار Flow Max انجام شد. **کلون‌زایی:** به منظور بررسی وجود سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک با پتانسیل تولید رده‌های مختلف خونی، کلون‌زایی سلول‌های حاصل از جفت، بلافاصله بعد از جداسازی و همچنین سلول‌های استخراج شده از داربست پس از ۱۵ روز بررسی شد. به این ترتیب که تعداد 2×10^5 سلول با ۱ میلی‌لیتر محیط نیمه جامد متیل سلولز (Methocult H4435, Stem cell technology, USA) مخلوط و در دمای اتاق به درون چاهک‌های ۳۵ میلی‌متر مربع ریخته شدند و برای ۱۴ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 درصد قرار گرفتند. پس از این زمان کلونی‌های حاصل از جفت به کمک میکروسکوپ لوپ (نیکون، ژاپن) بررسی و شمارش شدند. برای بررسی کلون‌زایی و نیز مارکرهای سطحی سلول‌ها بر روی داربست، علاوه بر جمع‌آوری مایع روی اسکفولد، اقدام به استخراج سلول‌ها از داربست گردید. اگرچه سلول‌های بنیادی خونساز غیر چسبیده هستند اما از آنجایی که امکان نفوذ آنها در لابه لای داربست در عرض ۱۵ روز وجود دارد، برای جداکردن سلول‌هایی که احتمالاً در لابه لای داربست قرار گرفته بودند، چندین بار پیتاژ صورت گرفت. سپس کل سلول‌های به دست آمده برای فلوسایتومتری و تعیین کلون‌زایی استفاده گردید.

آنالیز آماری: به منظور مقایسه‌ی گروه کنترل و داربست از نظر میزان تکثیر سلول‌ها، پتانسیل کلونی‌زایی، مارکرهای سطحی، از آزمون T زوج استفاده گردید. اختلاف $P < 0.05$ معنادار محسوب شد.

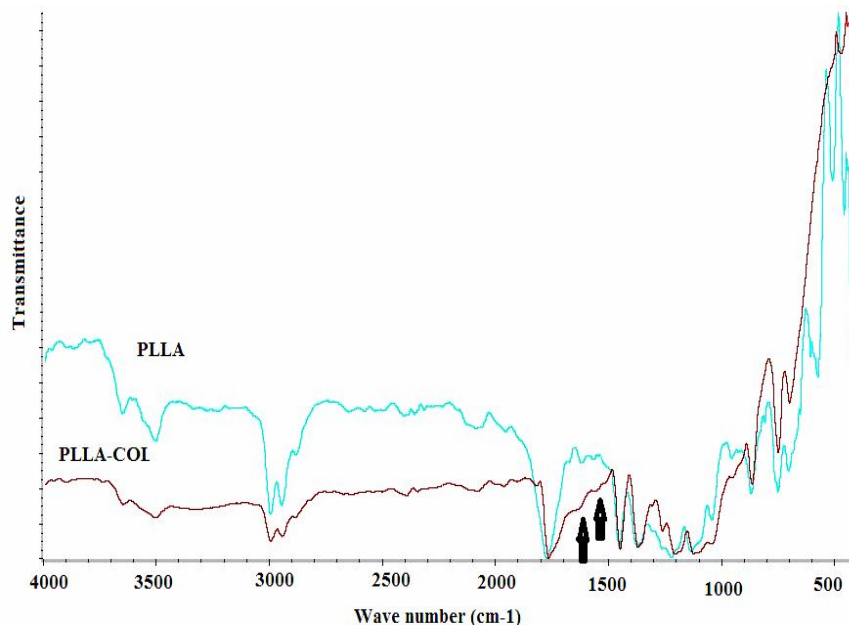
یافته‌ها

ویژگی نانو ساختار PLLA پوشیده با کلاژن برای کشت:

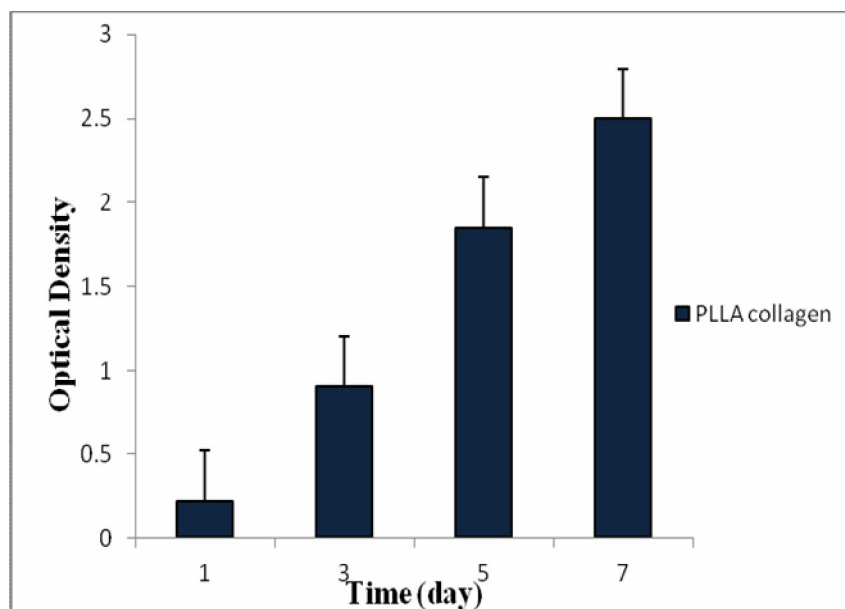
داربست‌های PLLA بافته شده به روش الکتروسی قبل از استفاده از نظر قطر الیاف، زیست سازگاری و همچنین وجود کلاژن بر روی آن مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد

سانتی متر در بازه ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی متر، از طریق وجود باندهای آمید یک و سه که به ترتیب در ۱۶۳۳ و ۱۵۳۱ بر سانتی متر آشکار شدند، مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱).

این الیاف با قطر میانگین 873 ± 98 نانومتر بوده و فاقد هر گونه بیدی بودند. همچنین وجود کلاژن بر روی نانوساختار با استفاده از دستگاه طیف سنجی مادون قرمز، با دقت دو بر



شکل ۱: منحنی طیف سنجی مادون قرمز نانو ساختار پلی لاکتیک/اسید و پلی لاکتیک/اسید با پوشش کلاژن. پیکان ها باندهای آمید یک و سه که به ترتیب در ۱۶۳۳ و ۱۵۳۱ بر سانتی متر آشکار می شوند را نشان می دهند.

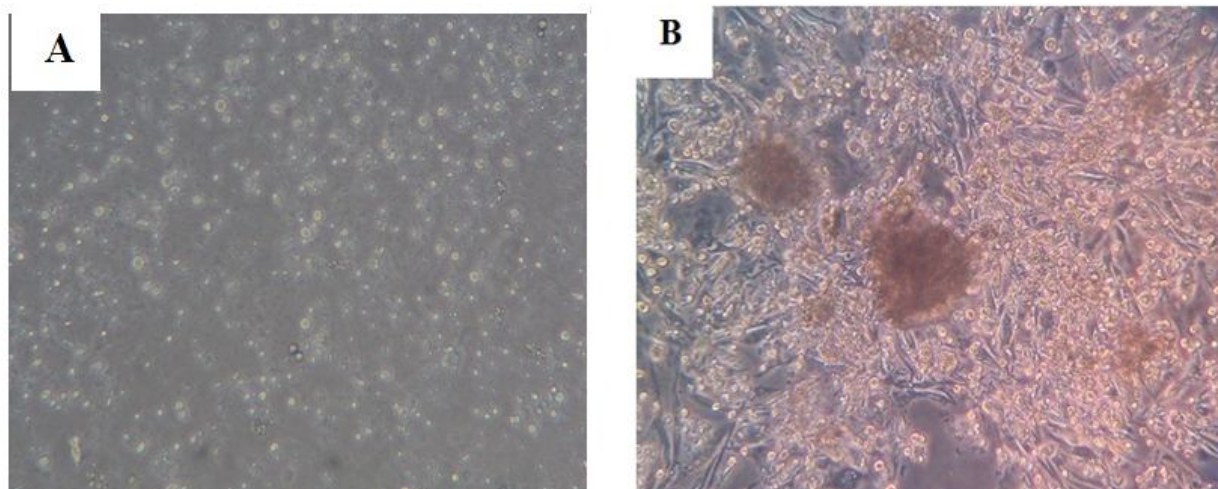


شکل ۲: میزان تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی حاصل از جفت در فلاسک کشت و بر روی نانو ساختار پلی لاکتیک/اسید با پوشش کلاژن در طول یک کشت ۷ روزه توسط روش MTT.

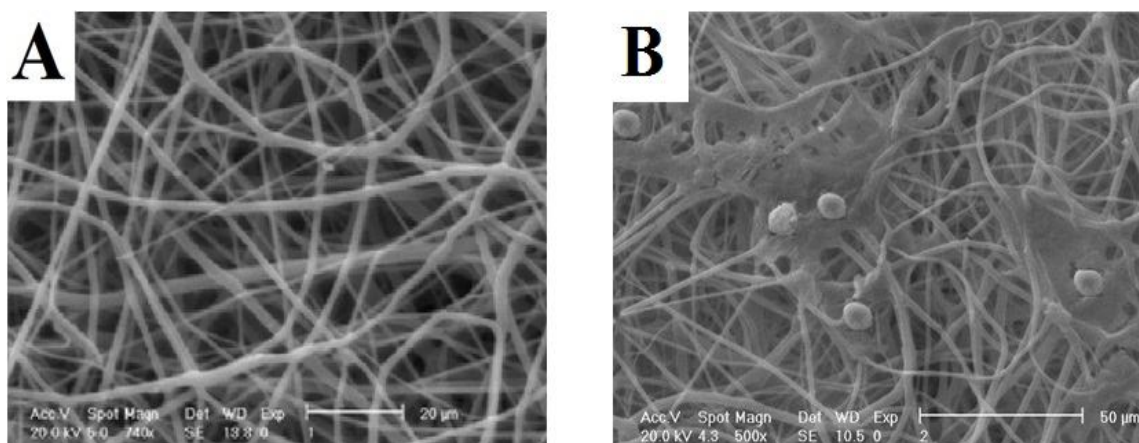
به منظور بررسی سازگار بودن داربست با سلول و عدم وجود اثرات توکسیک در آن، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از جفت بر روی این داربست‌ها کشت داده شدند. زیست‌سازگاری داربست‌ها از طریق آزمایش میزان فعالیت متابولیکی میتوکندریایی توسط روش MTT که نشان‌دهنده ی رشد و تکثیر سلول‌ها می‌باشد مشخص گردید. نتایج این آزمایش، حاکی از رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی داربست در روزهای مختلف کشت بود (شکل ۲).

افزایش میزان تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز حاصل از جفت بر روی داربست: نتایج بررسی سرعت تکثیر سلول‌های خونساز بر روی داربست و همچنین در کف فلاسک در عرض ۱۵ روز کشت، حاکی از آن بود که سلول‌های بنیادی خونساز ابتدا در هر دو گروه در فاز خاموشی بوده و بعد از گذشت تقریباً ۱۰ روز شروع به تکثیر می‌کنند. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود، در فاز تکثیری سلول‌های چسبنده و غیر چسبنده در کنار هم تکثیر می‌شوند. در حقیقت سلول‌های

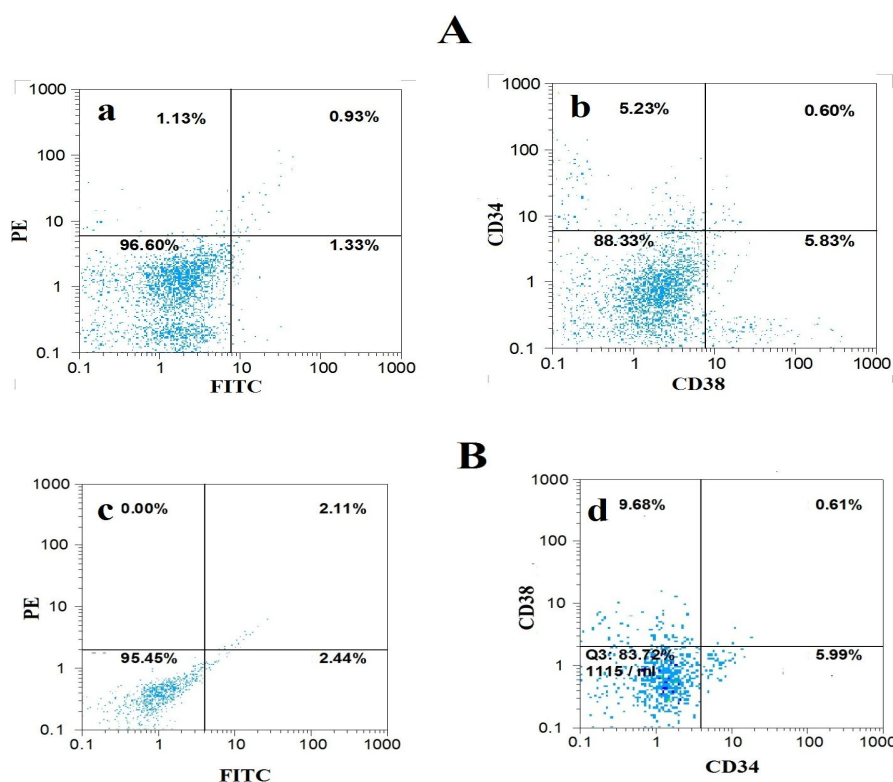
چسبنده قسمتی را تشکیل داده‌اند که سلول‌های خونساز غیر چسبنده روی آن‌ها قرار گرفته‌اند. نتایج شمارش سلولی با لام هماسیتومتر، نشان از تکثیر ۳/۶ برابری سلول‌های خونساز بر روی داربست‌ها با پوشش کلاژن و تکثیر ۲/۸ برابری در کف فلاسک پس از ۱۵ روز کشت داشت. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده قدرت تکثیر سلول‌های خونی بر روی داربست تایید شد. پایش کینتیک تکثیر و رشد سلول‌های کشت داده شده سلول‌های جفت بر روی نانوساختار هم که توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی صورت گرفت نشان داد که در روز ۱۵ دو نوع سلول مختلف بر روی داربست‌ها دیده می‌شود. سلول‌هایی استرومایی که دارای شکلی چند وجهی و کشیده بوده و به خوبی به سطح نانو ساختار متصل بودند و جمعیت دیگری که سلول‌های بنیادی خونساز هستند، به شکل کروی بوده و بر روی سلول‌های استرومایی قرار گرفته بودند (شکل ۴).



شکل ۳. کشت سلول‌های حاصل از جفت در محیط دو بعدی (A). سلول‌های جفت در فاز خاموشی (B). سلول‌های جفت در فاز تکثیر، در این فاز سلول‌های بنیادی خونساز در کنار سلول‌های بنیادی مزانشیمی دیده می‌شوند. کشت سلول‌های جفت در محیط *stem span* به همراه فاکتورهای رشد *SCF, TPO, FLT3Ligand* صورت گرفته است.



شکل ۴: مورفولوژی سلول‌های بنیادی بر روی نانوساختار (A)، نانوساختار پلی لاکتیک اسید با پوشش کلاژن بدون سلول (B)، سلول‌های جفت کشت داده شده بر روی پلی لاکتیک اسید با پوشش کلاژن پس از ۱۵ روز. در این شکل دو جمعیت سلولی دیده شد. یک جمعیت سلولی با شکل کروی که سلول‌های بنیادی خونساز هستند و دیگری سلول‌هایی که دارای شکلی معمول چند وجهی و کشیده که به خوبی به سطح پلی لاکتیک اسید متصل شده و بین داربست را تا حدودی پوشانیده‌اند، سلول‌های استرومایی هستند. از آنجاییکه مدتی سلول‌ها در فاز خاموشی بودند، زمان ۱۵ روز زمان کافی برای پوشاندن تمام سطح داربست نبوده است.



شکل ۵: درصد بیان مارکرهاي سطحي $CD34^+ CD38^-$ و $CD34^+$ بر روی سلول‌های بافت جفت قبل از تکثیر (A) و پس از تکثیر (B) بر روی نانوساختار پلی لاکتیک اسید پوشیده شده با کلاژن. (A-a) کنترل منفی قبل از تکثیر، (A-b) نمونه قبل از تکثیر، (B-c) کنترل منفی پس از تکثیر، (B-d) نمونه پس از تکثیر

کاهش قدرت کلونی‌زایی سلول‌های حاصل از جفت پس از تکثیر بر روی داربست: نتایج حاصل از تشکیل کلونی‌های مختلف خونساز نشان داد که فراوانی سلول‌های با پتانسیل کلونی‌زایی پس از تکثیر، در دو گروه کنترل (فلاسک کشت) و داربست با کاهش معناداری نسبت به قبل از تکثیر همراه می‌باشد ($P < 0.0001$). تعداد کلونی‌های خونساز قبل از کشت 41 ± 2 بود در حالی که پس از تکثیر بر روی داربست پوشیده شده با کلاژن تعداد آن‌ها به $20 \pm 2/8$ و در فلاسک به $12 \pm 1/5$ رسید به عبارت دیگر تکثیر با کاهش کلونی‌زایی همراه بوده است. همچنین بررسی مارکرهای سلول‌های بنیادی خونساز پس از تکثیر نشان داد که درصد سلول‌های $CD34^+$ و سلول‌های $CD38^-$ ، به ترتیب $6/32 \pm 0/4$ و $5/6 \pm 0/5$ در گروه داربست و $6/21 \pm 0/4$ و $5/2 \pm 0/3$ در گروه کنترل می‌باشد. با توجه به این که در صد این سلول‌ها قبل از کشت، $6/02 \pm 0/6$ و $4/78 \pm 0/6$ بوده است، درصد سلول‌های بنیادی خونساز عملکردی در هر دو گروه در مقایسه با درصد آن‌ها قبل از کشت افزایش دارد اما این افزایش معنادار نمی‌باشد ($P > 0/05$). طبق شکل ۵ که در آن نتایج یک نمونه از ۵ نمونه انجام شده دیده می‌شود، بیان مارکرهای $CD34^+$ و $CD38^-$ بر روی سلول‌های بنیادی حاصل از جفت قبل از تکثیر، شکل (A-b) به ترتیب $5/83$ و $5/23$ درصد و بیان این مارکرها پس از تکثیر شکل (B-d)، به ترتیب $6/6$ و $5/9$ درصد می‌باشد.

بحث

نتایج این مطالعه که به بررسی کارایی آشیانه‌های شبیه‌سازی شده از نانو الیاف سه بعدی پوشیده شده با کلاژن و سلول‌های استرومایی مختلف، در تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز پرداخت، نشان داد که اگرچه تکثیر در آشیانه تولید شده، سبب افزایش $3/6$ برابری تعداد این سلول‌ها می‌شود اما

سلول‌های تکثیر شده در این شرایط توانایی تشکیل کلونی‌های خونساز به مراتب کمتری را نسبت به سلول‌های اولیه استخراج شده از بافت جفت دارا می‌باشند. به عبارت دیگر پتانسیل کلونی‌زایی، به عنوان مهم‌ترین نشانه‌ی عملکردی بودن این سلول‌ها کاهش معناداری پیدا کرد و تکثیر سلول‌های جفت با از بین رفتن عملکرد این سلول‌ها همراه بود. در طول سالیان گذشته، تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز همواره چالش برانگیز بوده است. از آنجایی که تکثیر این سلول‌ها در محیط دو بعدی کشت با از دست دادن قدرت خود نوسازی و چند قوگی سلول‌ها همراه بوده و حفظ این خصوصیات در بدن توسط آشیانه کنترل می‌گردد لذا این امر محققان را بر آن داشت که با الهام از آشیانه‌های سلول‌های بنیادی خونساز موجود در مغز استخوان، به شبیه‌سازی ساختار آشیانه در محیط آزمایشگاه پردازند. آشیانه‌ی طبیعی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ادیپوسیتی، اندوتلیالی و پریشیتی تشکیل شده است که به صورت تودرتویی در هم پیچیده شده و با ترشح سایتوکاین‌ها و ماتریکس‌های بین سلولی فضای سه بعدی مناسبی را برای رشد و تکثیر سلول‌های خونساز فراهم می‌کنند (۱۲ و ۱۱). بنابراین محققین سعی کردند سیستمی را مدنظر قرار دهند که هم اجزای سلولی و هم اجزای غیر سلولی آشیانه را بازسازی کند. برای رسیدن به این منظور از کشت بر روی ساختار سه بعدی داربست استفاده گردید تا این ساختار با سازماندهی اجزای سلولی و غیر سلولی آشیانه، مدلی نزدیک به آشیانه‌ی واقعی را ایجاد نماید (۲۰ و ۱۹). ساختارهای سه بعدی مختلفی برای تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز بندگانف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در دو مطالعه‌ی جداگانه از کلاژن ژل برای تکثیر سلول‌های $CD34^+$ بندگانف استفاده شد. در یکی از این مطالعات اگرچه تکثیر در محیط سه بعدی با کاهش سلول‌های $CD34^+$ همراه بود اما تعداد کلون‌های خونساز افزایش داشت (۲۱). در مطالعه‌ی دیگر

حداکثر شبیه‌سازی آشیانه جفت صورت بگیرد اما سیستم پرفیوژن که غلظت اکسیژن، PH و محیط کشت را در تمام دوران کشت ثابت نگه می‌دارد (۲۵) و شرایط محیط کشت را کنترل و پایش می‌کند، وجود نداشت. همچنین از دلایل دیگر می‌توان به این نکته اشاره کرد که ورود سلول‌ها به فاز تکثیر یا تمایز در محیط بدن وابسته به شرایط خاصی می‌باشد که پیام‌های حاصل از این شرایط توسط سیستم پاراکرائنی و عصبی به سلول مورد نظر انتقال می‌یابد. اما در آشیانه‌های طراحی شده امکان بازسازی این سیستم‌ها وجود نداشت. در تایید این موضوع می‌توان به این نکته اشاره کرد که طبق نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر، سلول‌های بنیادی خونساز جفت در ابتدای کشت مدتی در فاز خاموشی هستند و پس از گذشت این زمان وارد فاز تکثیری می‌شوند (۲۳) که این امر خود می‌تواند نشان دهنده تفاوت‌های موجود در دو محیط In Vivo باشد.

نتایج حاصل از مطالعه‌ی قبلی ما نشان از آن داشت که تعداد کلونی‌های خونساز تشکیل شده از ۱ گرم سلول‌های حاصل از جفت قبل از کشت، 92 ± 22 می‌باشد (۱۸). از آنجایی که تعداد کلونی‌های تشکیل شده از ۱ میلی‌لیتر خون بندناف در حدود سه برابر این تعداد می‌باشد (۵) و با توجه به اینکه وزن بافت جفت در حدود سه برابر میزان خون بندناف می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که اگر سلول‌های تک هسته‌ای تمامی بافت جفت جدا سازی شده و به همراه خون بندناف همان جفت پیوند شود، احتمالاً فراوانی کم سلول‌های بنیادی خونساز خون بندناف جبران می‌شود و نیاز به تکثیر سلول‌های حاصل از جفت را از بین می‌برد.

نتیجه‌گیری

با توجه به کاهش پتانسیل کلون‌زایی سلول‌های بنیادی خونساز حاصل از بافت جفت پس از تکثیر، تکثیر سلول‌های بنیادی بخشی از جفت راهکار مناسبی نبوده و بایستی راه

مشخص شد که استفاده از کلاژن به عنوان محیط سه بعدی به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سبب افزایش سلول‌های $CD34+$ عملکردی خون بندناف می‌شود (۲۲). این افزایش سلول‌های $CD34+$ عملکردی در مطالعه‌ای که توسط بلانکو و همکارانش بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون بندناف در مجاور نانوساختار PU و PLGA صورت گرفت نیز دیده شده است (۲۳). وئترا و همکارانش نیز نشان دادند که فیبرین، PCL و PLLA ساختارهای سه بعدی مناسبی جهت تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز بندناف می‌باشند (۲۴). برخلاف مطالعات فوق که تکثیر خون بندناف را در داربست‌های مختلف بررسی کرده‌اند و افزایش سلول‌های بنیادی خونساز عملکردی را در محیط‌های سه بعدی نسبت به محیط دو بعدی گزارش کرده‌اند، در این مطالعه نیز تکثیر سلول‌های حاصل از جفت در محیط سه بعدی مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه در این مطالعه تکثیر سلول‌های بنیادی بافت جفت موفقیت آمیز بود ولی این تکثیر همراه با حفظ عملکرد این سلول‌ها نبود. به عبارت دیگر می‌توان گفت که اگرچه در این مطالعه سعی شد تا آشیانه‌ی سلول‌های بنیادی خونساز به طور نسبی بازسازی شود، یعنی از نانو ساختار به عنوان محیط سه بعدی، از کلاژن به عنوان مهم‌ترین جزء ماتریکس خارج سلولی و از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان مهم‌ترین سلول استرومایی تشکیل دهنده‌ی آشیانه برای تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز استفاده شود، اما علی‌رغم همه این تدابیر توانایی کلون سازی به‌عنوان اصلی‌ترین خصوصیت این سلول‌ها برای پیوند کاهش پیدا کرد. این امر می‌تواند به دلایل مختلف باشد از جمله آنکه منبع سلول‌های بنیادی خونساز در مطالعه‌ی ما متفاوت با منبع مطالعات قبلی در این زمینه بوده است. همچنین در یک آشیانه‌ی طبیعی عوامل مختلفی وجود دارد که شبیه سازی همه‌ی آنها در محیط کشت امکان‌پذیر نخواهد بود برای مثال در این مطالعه اگرچه سعی شد تا

جفت با روش‌های ارزان و بدون کشت مدنظر قرار گیرد.

کارهای استخراج سلول‌های بنیادی خونساز تمامی بافت

References

- 1- Delaney C, Gutman JA, Appelbaum FR. Cord blood transplantation for hematological malignancies: conditioning regimens, double cord transplant and infectious complications. *Br J Haematol*. 2009; 147: 207-16.
- 2- Escalon MP, Komanduri KV. Cord blood transplantation: evolving strategies to improve engraftment and immune reconstitution. *Curr Opin Oncol*. 2010; 22: 122-9.
- 3- 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: 11-23.
- 4- Tung SS, Parmar S, Robinson SN, De Lima M, Shpall EJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood for transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010; 23: 245-57.
- 5- Devin SM, Lazarus HM, Emerson SG. Clinical application of hematopoietic stem cells expansion: current status and future prospects. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 31: 241-52.
- 6- Shpall EJ, Quinones R, Giller R, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002; 8: 368-76.
- 7- Yao CL, Chu IM, Hsieh TB, Hwang SM. A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells

- derived from umbilical cord blood mononuclear cells. *Exp Hematol*. 2004; 32: 720-7.
- 8- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978; 4: 7-25.
 - 9- Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the cross roads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011; 12: 49-60.
 - 10- Ugarte F, Forsberg EC. Haematopoietic stem cell niches: new insights inspire new questions. *EMBO J*. 2013; 32: 2535-47.
 - 11- Frenette PS1, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31: 285-316.
 - 12- Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and hematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010; 466: 829-34.
 - 13- Sideri A, Neokleous N, Brunet De La Grange P, et al. An overview of the progress on double umbilical cord blood transplantation. *Haematologica*. 2011; 96: 1213-20.
 - 14- Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*. 2005; 105: 1343-7.

- 15- Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH, Mikkola HK. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell*. 2005; 8: 365-75.
- 16- Barcena A, Kapidzic M, Muench MO, et al. The human placenta is a hematopoietic organ during the embryonic and fetal periods of development. *Dev Biol*. 2009; 327: 24-33.
- 17- Serikov V, Hounshell C, Larkin S, et al. Human term placenta as a source of hematopoietic cells. *Exp Biol Med*. 2009; 234: 813-23.
- 18- Omidkhoda A, Kaviani S, Soleimani M, et al. Isolation and characterization of hematopoietic and mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue. *Sci J Iran Blood Transfus Organ*. 2014; 11: 4-11.
- 19- Ehring B, Biber K, Upton TM, et al. Expansion of HPCs from cord blood in a novel 3D matrix. *Cytotherapy*. 2003; 5: 490-9.
- 20- Di Maggio N1, Piccinini E, Jaworski M, Trumpp A, Wendt DJ, Martin I. Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems. *Biomaterials*. 2011; 32: 321-9.
- 21- Oswald J, Steudel C, Salchert K, et al. Gene expression profiling of CD34+ hematopoietic cells expanded in a collagen I matrix. *Stem Cells*. 2006; 24: 494-500.
- 22- Leisten I, Kramann R, Ventura Ferreira MS, et al. 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. *Biomaterials*. 2012; 33: 1736-47.
- 23- Mortera-Blanco T, Mantalaris A, Bismarck A, Aqel N, Panoskaltsis N. Long-term cytokine-free expansion of cord blood mononuclear cells in three-dimensional scaffolds. *Biomaterials*. 2011; 32: 9263-70.
- 24- Ferreira MS, Schneider RK, Wagner W, et al. Two-dimensional polymer-based cultures expand cord blood-derived hematopoietic stem cells and support engraftment of NSG Mice. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013; 19: 25-38.
- 25- Xue C1, Kwek KY, Chan JK, Chen Q, Lim1 M. The hollow fiber bioreactor as a stroma-supported, serum-free ex vivo expansion platform for human umbilical cord blood cells. *Biotechnol J*. In press.

The Effect of Mimicking the Niche of Placenta with PLLA Scaffold on Expansion of Hematopoietic Stem Cells Derived from Human Placenta

Omidkhoda A¹, Kaviani S¹, Soleimani M¹, Nikougoftar M², Atashi A¹, Zonoubi Z³, Ebrahimi L³

¹Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

³Faculty of Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

Corresponding Author: Kaviani S, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

E-Mail: Kavyanie@yahoo.com

Received: 29 Jun 2014 **Accepted:** 30 Aug 2014

Background and Objective: Nowadays, although umbilical cord blood is a commonly used source of hematopoietic stem cell, its low frequency of these cells is the main factor limiting its clinical application. The transplantation of hematopoietic stem cells derived from placenta tissue along with umbilical cord blood cells of the same sample may be an appropriate approach to solve this problem. In this study, we tried to mimic the niche of placenta by nano fiber scaffold in order to expand the hematopoietic stem cells derived from placenta tissue.

Materials and Methods: Different stromal cells along with hematopoietic stem cells derived from placenta tissue were seeded on nano fiber scaffold produced from PLLA coated with collagen. Then, the rate of proliferation in these niches was studied.

Results: The expansion in the mimicked niche associated with 3.6 fold increase in the number of cells but the capacity of forming colonies decreased significantly ($P < 0.0001$). Also, the percentage of hematopoietic stem cells increased. Nevertheless, the differences were not statistically significant ($P > 0.05$).

Conclusion: Due to a decreased capacity in forming colonies of hematopoietic stem cells derived from placenta, the expansion of stem cells from a part of placenta is not an appropriate solution and other approaches such as isolation of hematopoietic stem cells from the whole placenta tissue should be considered.

Keywords: Placenta, Hematopoietic stem cells, Stem cells niche, Nano fiber scaffold