Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:42 +0330 on Monday February 10th 2020

ORIGINAL ARTICLE

Co-culture of Umbilical Cord-derived Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells on Protein-Coated poly-L-Lactic Acid Nanoscaffolds

Maryam Islami[1],
Masoud Soleimani[2],
Monireh Ajami[3],
Maryam Darvish[4,5]

[1] PhD in Medical Biotechnology, Dietary Supplements and Probiotic Research Center, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
[2] Associate Professor, Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3] PhD Student in Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[4] Molecular Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received June 2, 2019 ; Accepted November 17, 2019)

Abstract

Background and purpose: Umbilical cord blood (UCB) is a source of Hematopoietic stem cells (HSCs) and has received a lot of attention due to its availability, renewal capacity, proliferation rate, and differentiation potential. The main limitation of using these cells is their low quantity in one unite of UCB. To overcome this, HSCs co-culturing with UCB derived mesenchymal cells (MSCs) is a practical approach. The purpose of this study was the expansion of HSCs together with UCB derived MSCs on a three-dimensional poly L- lactic acid coated with fibronectin.

Materials and methods: In this experimental study, after isolation of CD133+ from UCB cells using MACS method, the purity of the isolated cells was carried out by flow cytometry. Then, the cells were seeded on PLLA scaffold coated with fibronectin in presence of mesenchymal cells (group I), the PLLA scaffold in presence of mesenchymal cells (group II), and PLLA scaffold (group III). The proliferation rate, colonization potential and bio-compatibility of the cells were studied using a hemocytometer, CFU assay, and MTT, respectively.

Results: The cells co-cuthured with PLLA-Fn scaffold (group I) had a higher proliferation rate of CD133 stemness marker compared to other groups. Also, the colonization of the cells and scaffold′s biocompatibility was significantly higher in this group compared to other groups. ($P < 0.05$).

Conclusion: The study proved that the optimal 3D culture system in PLLA scaffold coated with fibronectin co-cultured with MSCs could reproduce minimum differentiation of CD133 + cells.

Keywords: Hematopoietic stem cells, mesenchymal cells, Co-culture, umbilical cord blood, fibronectin

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 29 (181): 1-11 (Persian).

*** Corresponding Author: Maryam Darvish** - Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran (E-mail: Maryam_darvish@yahoo.com)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:42 +0330 on Monday February 10th 2020

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و نهم شماره 181 بهمن سال 1398 (11-1)

کشت توامان سلول های بنیادی خونساز و مزانشیمی مشتق شده از خون بند ناف بر روی داربست های نانوفیبری پلی ال لاکتیک اسید

مریم اسلامی[1]
مسعود سلیمانی[2]
منیره عجمی[3]
مریم درویش[4,5]

چکیده

سابقه و هدف: امروزه سلول های بنیادی خونساز (HSC) خون بند ناف به دلیل مزایایی چون، در دسترس بودن، توانایی خود نوسازی، تکثیر و تمایز بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. محدویت اصلی در استفاده از این سلول‌ها، تعداد کم آن ها در واحد حجم خون بند ناف می باشد. جهت غلبه بر این محدودیت، کشت توام سلول‌های خونساز و مزانشیمی (MSCs) مشتق از خون بند ناف یک راهکار کاربردی می باشد. این مطالعه با هدف تکثیر HSC خون بند ناف به صورت هم‌کشتی با سلول‌های مزانشیمی مشتق از خون بند ناف بر روی محیط سه بعدی پلی‌الاکتیک اسید پوشیده شده (PLLA) با پروتئین فیبرونکتین می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پس از جداسازی سلول های +CD133 با استفاده از تکنیک MACS، تایید خلوص سلول ها با استفاده از فلوسایتومتری انجام شد. سپس سلول ها بر روی بستر نانوالیاف PLLA کونژوگه با فیبرونکتین (PLLA-Fn) در حضور MSCs (گروه 1)، داربست نانوفیبری PLLA در حضور MSCs (گروه 2) و داربست PLLA (گروه 3) کشت داده شدند. میزان تکثیر، قدرت کلنی‌زایی و میزان زیست سازگاری سلول ها به ترتیب با استفاده از لام هموسیتومتر، تست سنجش کلنی (CFU assay) و تست MTT در گروه های نامبرده مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: سلول‌هایی که بر روی داربست PLLA-Fn به صورت توام با MSCs کشت شدند (گروه 1). میزان بیشتری از نشانگر بنیادینگی +CD133 را نسبت به گروه های دیگر دارا می باشند. همچنین قدرت کلنی‌زایی و میزان زیست سازگاری در این گروه در مقایسه با سایر گروه‌ها، افزایش معناداری به همراه داشت ($P < 0/05$).

استنتاج: نتایج این مطالعه، بهینه بودن سیستم کشت سه بعدی پوشش داده شده با فیبرونکتین به صورت هم کشتی با سلول های مزانشیمی را جهت تکثیر سلول‌های $CD133^+$ با حداقل میزان تمایز اثبات نمود.

واژه های کلیدی: سلول بنیادی خونساز، سلول بنیادی مزانشیمی، هم کشتی، خون بند ناف، فیبرونکتین

مقدمه

امروزه پیوند سلول های بنیادی به عنوان یک راهکار مناسب برای درمان بسیاری از ناهنجاری ها و بدخیمی‌ها مورد توجه قرار گرفته است. سلول‌های بنیادی خونساز Hematopoietic stem cells (HSCs)،

مولف مسئول: مریم درویش - اراک: دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی E-mail: Maryam_darvish@yahoo.com
1. دکترای زیست فناوری، مرکز تحقیقات پروبیوتیک و مکمل های غذایی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، البرز، ایران
2. دانشیار، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3. دانشجوی دکترای هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
4. مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
5. استادیار، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
تاریخ دریافت : 1398/3/12 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1398/3/12 تاریخ تصویب : 1398/8/26

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:42 +0330 on Monday February 10th 2020

سلول‌های بنیادی بزرگسالی می‌باشند که منابع آن‌ها در انسان از مغز استخوان، خون محیطی و خون بند ناف[1] می‌باشد(2،1).تا چندی پیش، خون بند ناف پس از تولد نوزاد به عنوان یک زباله بیولوژیک دور ریخته می‌شد و در این حالی است که خون بند ناف غنی از سلول‌های بنیادی خونساز و مزانشیمی می‌باشد(2). استفاده از HSCs خون بند ناف در مقایسه با سلول‌های بنیادی خونساز مغز استخوان دارای مزایایی مانند دسترسی آسان و جمع‌آوری بدون درد، عدم لزوم سازگاری آنتی‌ژن‌های سیستم HLA [2] نمونه خون بند ناف با سلول‌های بدن فرد گیرنده، حضور سلول‌های اولیه و نابالغ سلول‌های سیستم ایمنی در خون بند ناف و کاهش رد ایمونولوژیک پیوند نسبت به مغز استخوان می‌باشد (به‌طوری‌که حدود 60 درصد رد پیوند شدید در پیوندهای مغز استخوان، 10 درصد در پیوندهای خون بند ناف دیده شده است). همچنین قدرت تکثیر بیش‌تر سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز خون بند ناف نسبت به مغز استخوان و نارس بودن سلول‌های سیستم ایمنی، احتمال بروز واکنش GVHD [3] (واکنش جدی و مرگبار به دنبال پیوند مغز استخوان را در پی دارد که در این حالت سلول‌های ایمنی فرد دهنده پیوند به سلول‌های بدن میزبان حمله کرده و به بخش‌هایی از بدن میزبان آسیب وارد می‌سازند) را کاهش می‌دهد که سبب شده است در سال‌های اخیر خون بندناف به عنوان منبع ارزشمندی مورد توجه قرار گیرد(4،3). بنابراین، با توجه به محدود بودن حجم خون بند ناف و تعداد کم سلول‌های حاصل از آن، استفاده از خون بند ناف برای بالغین با محدودیت‌هایی مواجه است. جهت غلبه بر این محدودیت، استراتژی‌های مختلفی بکار گرفته شده که از جمله آن می‌توان به بکارگیری همزمان دو واحد خون بند ناف که دارای HLA یکسانی داشته باشند اشاره نمود. با این وجود احتمال یافتن همزمان دو فرد با HLA یکسان پایین می‌باشد و این احتمال نیز وجود دارد که با بکارگیری همزمان دو واحد خون بند ناف برای یک فرد بزرگسال کافی نباشد، لذا محققین به دنبال روش‌های دیگر در این زمینه بوده‌اند(5،2). تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی خونساز، راهکار دیگری جهت غلبه بر محدودیت تعداد سلول‌ها می‌باشد که به دو روش، کشت مایع و کشت به صورت هم کشتی با سلول‌های مزانشیمی انجام می‌شود. در کشت مایع سلول‌های بنیادی را در حضور مقادیر زیادی محیط کشت و فاکتورهای رشد مانند SCF[4]، FLT3 [5]و TPO[6] کشت می‌دهند. در کشت به صورت هم‌کشتی، سلول‌ها را در حضور سلول‌های مزانشیمی کشت داده و این سلول‌ها به‌عنوان یک لایه حفاظتی و حمایت‌کننده برای سلول‌های بنیادی خونساز عمل می‌کنند. سابقا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به عنوان لایه محافظتی مورد استفاده قرار می‌گرفتند(6،4). اشکال عمده این سلول‌ها به عنوان منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تهاجمی بودن روش جمع‌آوری آن‌ها در حین نمونه‌گیری، احتمال آلودگی ویروسی و همچنین کاهش تعداد و ظرفیت تکثیر و امکان وقوع تمایز با پیشرفت سن می‌باشد، بنابراین بررسی بیش‌تر برای یافتن منبع جایگزین مناسب که حاوی سلول‌هایی با قدرت تمایز و تکثیر بیش‌تر و احتمال خطر آلودگی ویروسی کم‌تری باشد حائز اهمیت می‌باشد(9-7). بند ناف منبعی غنی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده که در مقایسه با مغز استخوان قابل دسترس‌تر می‌باشد و جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی از آن ساده‌تر است. مزیت دیگر این منبع سلولی این است که میزان سلول‌های بنیادی مزانشیمی در آن فراوان‌تر از مغز استخوان است. بسیاری از کارآزمایی‌های بالینی بر روی سلول‌های بنیادی خون بند ناف در محیط‌های دو بعدی صورت گرفته است، اما از آن‌جا که در محیط کشت دو بعدی شبیه‌سازی نیچ (کنام) طبیعی سلول‌ها در مغز استخوان که دارای ساختار سه بعدی است امکان‌پذیر

1. Umbilical cord blood
2. human leukocyte antigen
3. Graft Versus Host Disease
4. (Stem cell factor)
5. Fms-Like Tyrosine Kinase 3
6. Thrombopoietin

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:42 +0330 on Monday February 10th 2020

نمی‌باشد، این محیط برای مطالعه برهمکنش‌های سلولی مناسب نیست. لذا امروزه کشت سلول‌ها در محیط سه بعدی مورد توجه محققین می‌باشد. محیط سه بعدی با فراهم آوردن نسبت سطح به حجم بالا سطح تماس مناسبی را برای کشت و تکثیر سلول‌ها فراهم می‌آورد و شبیه سازی برهمکنش‌های سلولی مشابه نیچ طبیعی تا حدودی فراهم می‌شود. در این مطالعه، داربست پلی ال لاکتیک اسید (PLLA) استفاده شد که پلیمری سنتزی، زیست تخریب‌پذیر، زیست سازگار و متخلخل است. این پلیمر امروزه کاربردهای گسترده‌ای در عرصه‌های پزشکی و مهندسی بافت به عنوان سطح بستر مناسب جهت رشد و تکثیر انواع سلول‌های بنیادی یافته است. این مطالعه با هدف جداسازی سلول‌های بنیادی خونساز، و هم‌کشتی آن‌ها با سلول‌های مزانشیمی خون بند ناف بر روی داربست PLLA کونژوگه شده با فیبرونکتین، جهت شبیه‌سازی هر چه بیش‌تر نیچ طبیعی و ارزیابی میزان تکثیر آن‌ها، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع تجربی با کد اخلاق IR.Arakmu.ac.ir 1396.144 می‌باشد.

آماده سازی داربست

ساخت داربست PLLA به کمک فرآیند الکتروریسی (Electronic Diner Nano Sakhtar Asia) انجام شد. بدین منظور برای تهیه داربست پلی‌ال لاکتیک اسید 7 درصد، میزان 0/7 گرم پلی ال لاکتیک اسید در 9 میلی‌لیتر کلروفرم 9 درصد وزنی/ وزنی و 1 میلی لیتر محلول N,N دی متیل (DMF) (Sigma) در دمای اتاق با سرعت 100 دور در دقیقه روی همزن به مدت 4 ساعت حل و یکنواخت 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 22 کیلو ولت و فاصله نازل تا جمع کننده 23 سانتی‌متر تنظیم شده بود. سطح جمع کننده با ورقه‌ی نازک آلومینیومی پوشانده شد و الیاف بر روی پوشش آلومینیومی جمع‌آوری گردید.

کشت MSCs بر روی محیط کشت سه بعدی

بدین منظور MSC های مشتق از خون بند ناف انسان از مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته تهیه شد. 1×10^4 عدد MSC بر روی داربست PLLA پوشیده شده با فیبرونکتین انتقال و برای 5 روز در این وضعیت قرار داده شد و هر دو روز یک بار تعویض محیط با DMEM حاوی 10 درصد FBS (Gibco) انجام گرفت.

جداسازی وکشت HSCs بر روی محیط کشت 3 بعدی (3D)

نمونه‌های خون بندناف از مادران باردار که به روش طبیعی زایمان کرده بودند، بعد از گرفتن رضایت نامه کتبی تهیه گردید. به منظور جداسازی HSCs، بعد از جداسازی سلول‌های تک هسته ای با استفاده از هیدروکسی اتیل استارچ و استفاده از فایکول سلول‌های CD133+ با استفاده از تکنیک MACS جداسازی، و در ادامه با استفاده از فلوسایتومتری تایید شدند. سپس 5×10^4 عدد سلول CD133+ در محیط سه بعدی پوشیده شده با فیبرونکتین بصورت هم کشتی با MSCs همراه با محیط StemSpan™ (Stem cell technologies Inc) محتوی TPO، SCF، FLT-3 (سیگما) هر کدام با غلظت 100نانو گرم بر میلی‌لیتر کشت داده شدند. این شرایط برای دو گروه دیگر، محیط سه بعدی با حضور سلول‌های مزانشیمی و محیط سه بعدی نیز انجام شد. محیط‌ها هر 2 روز یک بار تعویض گردید.

شمارش سلولی

برای بررسی میزان تکثیر سلول‌ها از هموسیتومتر استفاده شد. سلول‌ها با استفاده از تریپان بلو رنگ‌آمیزی و درصد سلول‌های زنده محاسبه شدند شمارش سلولی در روزهای 3 و 7 انجام گرفت.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:42 +0330 on Monday February 10th 2020

تست سنجش کلنی

به منظور بررسی پتانسیل کلنی زایی سلول‌های کشت شده در روز 7، حدود 10^4 سلول به حدود 2 میلی‌لیتر محیط Methocult افزوده شد و با استفاده از ورتکس کاملا مخلوط گردید. مخلوط حاصل در پتری‌دیش 35 میلی‌لیتری ریخته شد و سپس این پلیت همراه با دو پلیت حاوی آب دیونیزه در یک پلیت 100 میلی‌لیتری به مدت 7 روز در انکوباتور 37 درجه‌ی سانتی‌گراد و CO2 5 درصد نگهداری گردید. با استفاده از میکروسکوپ معکوس کلنی‌های حاصل بررسی و شمارش شدند. نسبت کلنی‌های روز صفر به کلنی‌های روز 7 در گروه‌های مورد مطالعه 2D بررسی گردید. (در این تست میزان کلنی‌های گرانولوسیت مونوسیت GM و پیش‌ساز آن‌ها GEMM معین می‌گردد).

آزمون MTT

بررسی تغییرات در تعداد سلول‌های زنده و فعال با روش MTT صورت گرفت. در این روش، ابتدا تعداد 3000 سلول در هر یک از چاهک‌های حاوی داربست کشت داده شد تا سلول‌ها به مدت 7 روز تکثیر شده و به حالت پایدار خود درآیند. در ادامه پس از گذشت 3، 5، و 7 روز انکوباسیون محیط کشت رویی دور ریخته شد. به هر چاهک 200 میکرو لیتر محیط کشت حاوی 0/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول MTT اضافه گردید و به مدت 2 تا 4 ساعت در انکوباتور CO2 در 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. کریستال‌های فورمازان قبل از رنگ سنجی DMSO به حالت محلول درآمد. در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج 570 نانومتر قرائت گردید و به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول‌ها محاسبه شد.

ارزیابی داربست‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی(SEM)

برای ارزیابی ساختار داربست سلولی، بررسی میزان تکثیر و اتصال سلول‌ها، داربست سلولی از روز صفر به عنوان یک کنترل و روز 7 داربست پوشیده شده با فیبرونکتین برای SEM آماده شد. برای این منظور، نخست سطح داربست‌های حاوی سلول با فسفات شستشو داده شدند و سپس در گلوتارالدئید 2/5 درصد به مدت 1 ساعت فیکس شدند. سپس به منظور حذف رطوبت و دهیدراته نمودن، داربست‌ها در شیب غلظت الکل قرار داده، و خشک شدند. سطح نمونه‌ها با ضخامتی حدود 12 نانومتر طلا پوشش داده شدند. نمونه‌های پوشش دار با استفاده از SEM مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی تست‌ها سه بار تکرار شدند. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار (PRISM V 5.0 analytical Software) GraphPad و روش آماری ANOVAs one-way انجام گرفت. در ادامه از تست تعقیبی Bonferroni's post hoc test استفاده شد.

یافته ها

شمارش سلول‌های +CD133 کشت شده بر روی داربست‌های سه بعدی (3D)

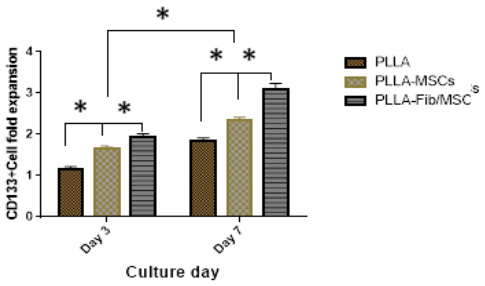
شمارش سلول‌ها در گروه‌های فوق در روزهای 3 و 7 انجام گرفت. میانگین سلول‌های شمارش شده در این روزها در داربست PLLA ای کوکونژوگه با فیبرونکتین به‌صورت هم کشتی با سلول‌های مزانشیمی (گروه 1)، داربست PLLA به‌صورت هم کشتی با سلول‌های مزانشیمی (گروه 2) و داربست PLLA (گروه 3) در روز 7 به ترتیب و 3/2 ، 2/4 و 1/8 برابر و در روز 3 نیز به ترتیب 1/9 و 1/6 و 1/1 برابر افزایش نسبت به روز صفر نشان دادند (تصویر شماره 1).

کلنی زایی

به منظور تعیین قدرت کلنی‌زایی +CD133 ها، 7 روز پس از کشت، آزمون سنجش کلنی (CFU) بر روی سلول‌های کشت شده انجام شد. تعداد کل کلنی در گروه 1 نسبت به دو گروه دیگر بیش‌تر بود. همچنین

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:42 +0330 on Monday February 10th 2020

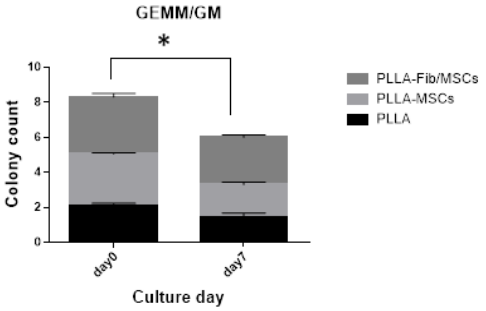
نسبت کلنی‌های CFU-GEMM/CFU-GM که بیانگر تعداد بیش‌تر سلول‌های پرتوان پیش‌ساز رده‌های میلوئیدی نسبت به بقیه‌ی کلنی‌ها می‌باشد نیز به همین منوال بوده است (تصویر شماره 2). همچنین جدول شماره 1 نشان داد که در هر 3 گروه مورد مطالعه، تعداد کلنی GEMM پس از 7 روز در مقایسه با سایر کلنی‌ها (CFU- GM,CFU-G, CFU-M) بیش‌تر می‌باشند.



تصویر شماره 1: مقایسه میزان افزایش سلول ها در محیط 2 بعدی و 3 بعدی در روز سه و روز هفت P<0/05

جدول شماره 1: نسبت کلنی های روز صفر به کلنی های روز 7 در 2D و 3D

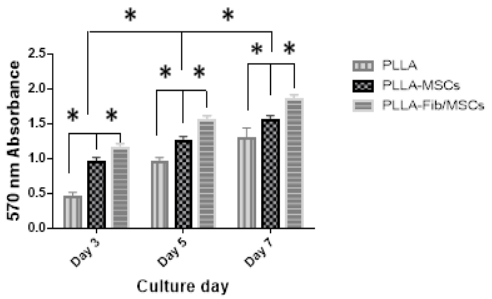
نسبت کلنی های روز صفر به کلنی های روز 7 در 2D و 3D			
انواع کلنی	داربست PLLA	داربست به صورت کوکالچر با MSCs	داربست پوشیده شده با فیبرونکتین بصورت کوکالچر باMSCs
CFU-GEMM	2/08	3/03	3/3
CFU-GM	1/47	1/43	1/8
CFU-G	1/4	1/32	1/6
CFU-M	1/9	1/28	1/5



تصویر شماره 2: مقایسه قدرت کلنی زایی سلول های کشت شده بر روی محیط 2D و 3D و نسبت کلنی های GEMM/GM در روز صفر و هفت، P<0/05

تست MTT

با توجه به تصویر شماره 3، زیست سازگاری داربست‌ها از طریق تست MTT اندازه‌گیری می‌شود. در این سنجش، میزان فعالیت متابولیکی میتوکندریایی که نشان‌دهنده‌ی رشد و تکثیر سلول‌ها می‌باشد، اندازه‌گیری شد. نتایج این آزمایش، حاکی از رشد و تکثیر سلول‌ها بر روی داربست‌ها در روزهای 3، 5 و 7 بود. در گروه 1 افزایش بیش‌تری مشاهده گردید که بیانگر سازگاری سلول‌ها و فراهم بودن شرایط تکثیر برای سلول‌ها در این گروه است (P<0/05).

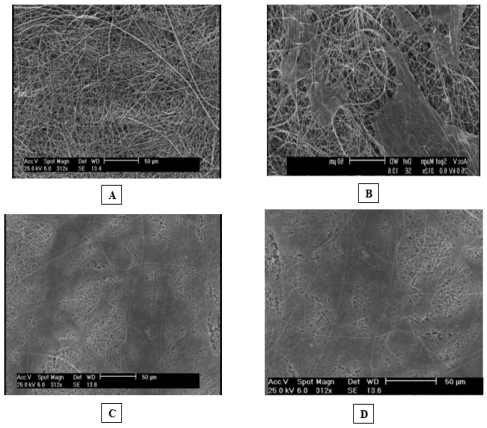


تصویر شماره 3: تست MTT سلول‌های کشت شده بر روی داربست‌های 3D و 2D، P<0/05

ارزیابی خواص فیزیکی داربست با استفاده از میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM)

بررسی خصوصیات فیزیکی حاصل از SEM نشان داد که داربست PLLA دارای ساختاری متخلخل، یکنواخت با حفره‌های مرتبط به هم هستند (تصویر شماره 4-A). این ویژگی استفاده از آن‌ها در جهت مهندسی بافت مناسب می‌سازد. همچنین حفره و تخلخل‌های موجود در این نوع داربست که در مقیاس نانو هستند باعث می‌شود نسبت سطح به حجم در این مقیاس افزایش یافته و به همین نسبت قدرت اتصال سلول‌ها به هم افزایش یابد. تصاویر به‌دست آمده از SEM نشان‌دهنده تکثیر بهتر سلول‌ها در گروه A می‌باشد (تصویر شماره 4- B-D).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:42 +0330 on Monday February 10th 2020



تصویر شماره 4: A: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM). داربست نانو الیاف PLLA قبل از گسترش سلول، B: کشت سلول های +CD133 بر روی داربست PLLA پوشیده شده با فیبرونکتین بصورت هم کشتی با MSCs در روز 7 (از آنجایی که مدتی سلول ها در فاز خاموشی بودند، زمان7 روز زمان کافی برای پوشاندن تمام سطح داربست نبوده است)، C: کشت سلول های +CD133 بر روی داربست PLLA در حضور سلول های مزانشیمی، D: کشت سلول های +CD133 بر روی داربست PLLA در حضور سلول های مزانشیمی در روز 7.

بحث

کشت سلولی در محیط‌های دو بعدی، یکی از روش‌های متداول تکثیر HSCs می‌باشد. در این روش، سلول‌ها اتصال ضعیفی به کف پلیت دارند که علت آن تا حدودی به بارهای آزاد الکتریکی کف پلیت که هنگام ساخت به آن القاء می‌شود، مربوط می‌شود(1،3). در این شرایط، سلول‌ها علاوه بر اتصال کف پلیت تمایل بیش‌تری به کناره‌های پلیت نشان می‌دهند، بنابراین غلظت کانونی بالاتری از فاکتورهای پاراکرین به‌دلیل تراکم بالای سلولی شکل می‌گیرد. در این شرایط سیگنالینگ بین سلولی، غلظت عوامل پاراکرین و اتصال سلولی محدود بوده و تفاوت‌های بسیار زیادی با شرایط in vivo نشان می‌دهد(3،15-10). در محیط کشت سه بعدی (3D) به علت شبیه‌سازی فضای سلولی و برهمکنش‌های سلولی با جایگاه طبیعی سلول‌ها در موجود زنده و شبیه‌سازی آرایش ترکیبات سلولی و غیر سلولی در مقیاس نانو متر و میکرومتر در ماتریکس خارج سلولی (ECM) (که بستری با لیگاندهای ویژه را برای حمایت و چسبندگی سلول‌ها فراهم می‌کند) پیام‌هایی را بصورت سیگنال‌های داخل سلولی ایجاد نموده و بر بیان ژن‌ها و رشد و تکثیر سلول‌ها تاثیر مثبت می‌گذارد(16). همچنین بر تنظیم تکثیر و عملکرد سلولی به کمک فاکتورهای رشد متنوع موثر خواهد بود. در این مطالعه نیز با بکارگیری داربست نانوفیبری پوشیده شده با فیبرونکتین در حضور سلول‌های مزانشیمی، ساختار سه بعدی و ماتریکس خارج سلولی تا حد زیادی شبیه‌سازی شد و شرایط رشد بهتری در گروهی که سلول‌ها در حضور سلول‌های مزانشیمی بر روی داربست پوشیده شده با فیبرونکتین کشت شدند نسبت به بقیه گروه‌ها پس از 7 روز مشاهده شد. در واقع طراحی داربست سه بعدی و حضور فیبرونکتین در سطح داربست و سلول‌های مزانشیمی بر رشد و تکثیر سلول‌ها تاثیرگذار می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط Serebriiskii و همکاران در سال 2008 انجام شد، نشان داده شد که فیبروبلاست‌های کشت داده شده بر روی محیط سه بعدی در مقایسه با کشت‌های دو بعدی (2D) سریعتر تکثیر شده و مهاجرت می‌کنند(16).

در مطالعه دیگری که توسط Ferrira و همکاران در سال 2013 انجام گرفت، مشاهده شد که فیبرین، PCL و PLLA ساختارهای سه بعدی مناسبی جهت تکثیر HSCs می‌باشند(17). همچنین در مطالعه‌ای دیگر که توسط میرزایی و همکاران انجام شد، مشخص گردید که نانوفیبرهای PVDF بستر مناسبی برای تکثیر سلول‌های iPS می‌باشد(18).

در مطالعه دیگری که توسط دکتر درویش و همکاران صورت گرفت، اهمیت حضور سلول‌های مزانشیمی در تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که اهمیت سلول‌های مزانشیمی به‌خاطر مواد مترشحه از آن‌ها می‌باشد که کنام

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:42 +0330 on Monday February 10th 2020

سلول‌های بنیادی خونساز را شبیه‌سازی کرده و حضور آن‌ها یک ریز محیط مناسب برای کنترل بلوغ و حیات سلول‌های خونساز فراهم می‌آورد(19). در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که استفاده از کلاژن به عنوان محیط سه بعدی به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سبب افزایش سلول‌های خونساز خون بندناف می‌شود(22-20).

در مطالعه اسلامی و همکاران در سال 2018، اهمیت کونژوگه نمودن داربست‌ها و مقایسه تکثیر سلول‌ها بر روی داربست PLLA پوشیده شده با فیبرونکتین مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه مزبور گروه‌هایی که بر محیط کشت سه بعدی فیبرونکتین دار تکثیر پیدا کرده بودند تکثیر سلولی بیش‌تری در مقایسه با محیط کشت دو بعدی نشان دادند و تفاوت بین گروه‌های سه بعدی و دو بعدی معنا دار بود. این مساله به علت شبیه‌سازی بهتر از نیچ طبیعی سلول‌های +CD133 در محیط کشت سه بعدی کونژوگه شده با فیبرنکتین می‌باشد(23). در مطالعه‌ای دیگر که توسط این گروه انجام گرفت مشاهده شد که پوشش‌دار کردن داربست سه بعدی PLLA با کلاژن- فیبرونکتین، سیستم مناسبی را به منظور تکثیر سلول‌ها با حداقل تمایز در محیط خارج از بدن فراهم می‌آورد. این مساله احتمالا به‌دلیل شبیه‌سازی بهینه ماتریکس خارج سلولی به علت حضور توام این دو پروتئین است که در حفظ بنیادینگی سلول‌ها به طرز موثرتری عمل می‌کند(24).

در این مطالعه، بررسی نتایج حاصل از انجام تست MTT نیز نشان داد که سلول‌های تکثیر یافته در گروه 1، پس از 7 روز، زیست سازگاری بیش‌تری را نسبت به روز 5 و 3 نسبت به دو گروه دیگر نشان دادند و افزایش میزان جذب نوری سلول‌ها در روز 7 نشان‌دهنده تکثیر بیش‌تر سلول‌ها بود. همچنین مشاهده شد که میزان جذب نوری سلول‌های کشت شده بر روی داربست فیبرونکتین‌دار شده به صورت هم کشتی با سلول های مزانشیمی افزایش بیش‌تری را در مقایسه با دو گروه دیگر دارد. در واقع میزان جذب نوری در ارتباط با فعالیت میتوکندری‌ها می‌باشد. از آن‌جا که فعالیت میتوکندریایی در سلول‌های زنده به‌صورت پایدار است، افزایش یا کاهش تعداد سلول‌های زنده به صورت خطی با فعالیت میتوکندری در ارتباط می‌باشد. همچنین با توجه به جدول شماره 1 مشاهده شد که تعداد کلنی GEMM پس از 7 روز در هر سه محیط نسبت به سایر کلنی‌ها (CFU-GM,CFU-G, CFU-M,CFU-E) بیش‌تر می‌باشند. مطالعات قبلی نیز نشان دادند که کلنی‌های CFU-GM در UCB کم‌تر از مغز استخوان هستند در حالی که کلنی‌های GEMM در UCB، بیش‌تر از BM هستند. بنابراین، سلول‌های UCB نسبت به BM ابتدایی ترند، چون کلنی‌های GEMM مولد سایر رده‌های سلول‌های خونی می‌باشند و بنابراین سلول‌های خونساز مواد این کلنی‌ها نسبت به سلول‌های خونساز BM تمایز نیافته‌تر می‌باشند که نتایج حاصل از این مطالعه نیز ابتدایی بودن HSCs خون بند ناف را تایید کرد(28-25). مقایسه افزایش تعداد سلول‌ها در محیط دو بعدی و سه بعدی نشان می‌دهد در نبود سلول‌های مزانشیمی و عدم حضور فیبرونکتین تعداد سلول‌ها در محیط سه بعدی به مراتب بیش‌تر از محیط دو بعدی می‌باشد که نشان‌دهنده اهمیت توپوگرافی سطح بستر می‌باشد. تعداد بیش‌تر سلول‌ها درگروهی که سطح داربست با فیبرونکتین پوشیده شده، نشان‌دهنده اهمیت شیمی سطح بستر است که حضور فیبرونکتین تداعی‌کننده بهتری برای ریز محیط مغز استخوان می‌باشد.

در این مطالعه کشت سلول‌های +CD133 جدا شده از خون بند ناف بر روی داربست PLLA پوشانده شده با فیبرونکتین به صورت هم کشتی با MSCs انجام شد که هدف از آن، به کارگیری نقش حمایتی MSCs در تکثیر سلول‌های +CD133 می‌باشد، به نحوی که حداقل تمایز در این سلول ها رخ دهد. همچنین جهت شبیه‌سازی هر چه بیش‌تر ماتریکس خارج سلولی سطح داربست با فیبرونکتین پوشانده شد و نشان داده شد که

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:42 +0330 on Monday February 10th 2020

بکارگیری این سیستم سبب افزایش در تعداد سلول‌ها، قدرت کلنی‌زایی و زیست سازگاری در مقایسه با محیط کشت دو بعدی می‌گردد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر طرح مصوب مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی اراک می‌باشد که بدین وسیله از حمایت این مرکز قدردانی می‌گردد.

References

1. Eskandari F, Allahverdi A, Nasiri H, Azad M, Kalantari N, Soleimani M, et al. Nanofiber expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem. Iran J Ped Hematol Oncol 2015; 5(4): 170-178.
2. Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, Mcmannis JD, Karandish S, et al. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Bone Marrow Transplant 2006; 37(4): 359-366.
3. Mousavi SH, Abroun S, Soleimani M, Mowla SJ. Expansion of human cord blood hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional Nanoscaffold coated with Fibronectin. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2015; 9(2): 72-79.
4. Mokhtari S, Baptista P, Vyas D, Jordan Freeman C, Moran E, Brovold M, et al. new approach to expand cord blood derived hematopoietic stem cells, using bioengineered human fetal liver tissue 3d-constructs. Blood 2015; 126(23): 30-97.
5. Mansourizadeh F, Asadi A, Oryan S, Nematollahzadeh A, Dodel M, Asghari M, et al. PLLA/HA Nano composite scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. Molecular Biology Research Communications 2013; 2(1-2): 1-10.
6. Atashi A, Isalmi M, Mortazavi Y, Soleimani M. Homing Genes Expression in Fucosyltransferase VI-Treated Umbilical Cord Blood CD133+ Cells which Expanded on Protein-Coated Nanoscaffolds.Molecular Biotechnolgy 2018; 60(7): 455-467.
7. Weeks S, Kulkarni A, Smith H, Whittall C, Yang Y, Middleton J. The effects of chemokine, adhesion and extracellular matrix molecules on binding of mesenchymal stromal cells to poly (l-lactic acid). Cytotherapy 2012; 14(9): 1080-1088.
8. Bari S, Seah KK, Poon Z, Cheung AM, Fan X, Ong SY, etal. Expansion and homing of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells for clinical transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2015; 21(6): 1008-1019.
9. Solali S, Kaviani S, Soleimani M, Zonubi Z. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. Koomesh 2015; 16(4): 505-511 (Persian).
10. Aqmasheh S, Shamsasanjan K, Akbarzadehlaleh P, Pashoutan Sarvar D, Timari H. Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. Adv Pharm Bull 2017; 7(2): 165-177.
11. Wang LJ, Zhang YP, Wang JF, Wu YF, Xiang Y, Xie CG, et al. Biological characteristics of mesenchymal stem cells in human umbilical cord blood and their supporting capacities in ex vivo expansion of CD34+ hematopoietic stem cells. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 2005; 26(2): 65-68 (Chinese).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:42 +0330 on Monday February 10th 2020

12. Jiang J, Papoutsakis ET. Stem-cell niche based comparative analysis of chemical and nano-mechanical material properties impacting ex vivo expansion and differentiation of hematopoietic and mesenchymal stem cells. Adv Healthc Mater 2013; 2(1): 25-42.
13. Perucca S, Di Palma A, Piccaluga PP, Gemelli C, Zoratti E, Bassi G, et al. Mesenchymal stromal cells (MSCs) induce ex vivo proliferation and erythroid commitment of cord blood haematopoietic stem cells (CB-CD34+cells). Plos ONE 2017; 12(2): e0172430.
14. Lo Iacono M, Anzalone R, La Rocca G, Baiamonte E, Maggio A, Acuto S. Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells as a Feeder Layer for the Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: A Review. Stem Cell Reviews and Reports 2017; 13(1): 35-49.
15. Zhang Y, Chai C, Jiang XS, Teoh SH, Leong KW. Co-culture of umbilical cord blood CD34+ cells with human mesenchymal stem cells. Tissue Eng 2006; 12(8): 2161-2170.
16. Serebriiskii I. Castelló-Cros R, Lamb A, Golemis EA, Cukierman E. Fibroblast-derived 3D matrix differentially regulates the growth anddrug-responsiveness of human cancer cells. Matrix Biol 2008; 27(6): 573-585.
17. Ferreira MS, Schneider RK, Wagner W, Jahnen-Dechent W, Labude N, Bovi M, 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(1): 25-38.
18. Mirzaei A, Moghadam AS, Abazari MF, Nejati F, Torabinejad S, Kaabi M, et al. Comparison of osteogenic differentiation potential of induced pluripotent stem cells on 2D and 3D polyvinylidene fluoride scaffolds. J Cell Physiol 2019; 234(10):17854-17862.
19. Darvish M, Payandeh Z, Soleimanifar F, Taheri B, Soleimani M, Islami M. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells application in hematopoietic stem cells expansion on nanofiber three-dimensional scaffold. J Cell Biochem 2019; 120(7): 12018-12026.
20. Celebi B, Mantovani D, Pineault N. Effects of extracellular matrix proteins on the growth of haematopoietic progenitor cells. Biomed Mater 2011; 6(5): 055011.
21. Connor NS, Aubin JE, Sodek J. Independent expression of type I collagen and fibronectin by normal fibroblast-like cells. J Cell Sci 1983; 63: 233-244.
22. Leisten I, Kramann R, Ventura Ferreira MS, Bovi M, Neuss S, Ziegler P, 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(6): 1736-1747.
23. Islami M, Mortazavi Y, Soleimani M, Soleimanifar F, Nadri S, Hosseinzadeh S, et al. Ex Vivo Expansion of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells on Collagen- Fibronectin Coated Electrospun Nano Scaffold. J Adv Med Biomed Res 2018; 26(117): 32-43.
24. 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 and collagen. Artificial cells, Artif Cells Nanomed Biotechnol 2017; 46(5): 1025-1033.
25. Colombo E, Calcaterra F, Cappelletti M, Mavilio D, Della Bella S. Comparison of fibronectin and collagen in supporting the

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:42 +0330 on Monday February 10th 2020

isolation and expansion of endothelial progenitor cells from human adult peripheral blood. PLoS ONE 2013; 8(6): 1-9.

26. Koestenbauer S, Zisch A, Dohr G, Zech NH. Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood. Cell Transplant 2009; 18(10): 1059-1068.
27. Jing D, Fonseca AV, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, et al. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells -modeling the niche compartments in vitro. Haematologica 2010; 95(9): 542-550.
28. Tan J, Liu T, Hou L, Meng W, Wang Y, Zhi W, etal. Maintenance and expansion of hematopoietic stem/progenitor cells in biomimetic osteoblast niche. Cytotechnology 2010; 62(5): 439-448.