خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۰ شماره ۲ تابستان ۹۲ (۱۱۱-۱۰۳)

مقاله پژوهشی

اثر نانوفیبر پلی اتر سولفان آمینه بر افزایش تکثیر و کاهش آپوپتوزیس سلول‌های خونساز خون بند ناف

فاطمه صباغی[۱]، کریم شمس اسنجان[۲]، علی‌اکبر موثق‌پور اکبری[۳]، ناصر امیری‌زاده[۴]، مهین نیکوگفتار[۴]، نادیا باقری[۵]، پروانه عباسی[۱]

چکیده

سابقه و هدف

خون بند ناف می‌تواند به عنوان یک منبع جایگزین مناسب سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک در پیوندهای آلوگرافت استفاده شود. این مطالعه با هدف بررسی این مطلب که آیا تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز در خارج از بدن قبل از پیوند و سپس تزریق آن‌ها به بدن، می‌تواند سبب بازیافت سریع‌تر سلول‌ها پس از پیوند با خون بند ناف گردد، انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. جداسازی و تخلیص سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف با روش MidiMACS انجام شد. سلول‌های تخلیص شده بر روی نانوفیبرهای پلی‌اتر سولفان(PS) آمینه و پلی کاپرولاکتون(PCL) aligned و random در مقایسه با محیط دو بعدی معمول کشت داده شد. هم‌چنین میزان آپوپتوز سلول‌های کشت داده شده بر روی نانوفیبر پلی سولفان آمینه هم‌زمان با محیط دو بعدی معمول نیز بررسی شد.

یافته‌ها

یافته‌های تحقیق نشان داد که نانوفیبر پلی سولفان آمینه، تاثیر مثبتی بر میزان تکثیر سلول‌های $CD34^+$ در مقایسه با محیط دو بعدی معمول دارد و باعث افزایش معنادار تکثیر سلولی می‌شود. در عین حال موجب کاهش میزان آپوپتوز سلولی می‌گردد. در حالی که نانوفیبرهای PCL (پلی‌کاپرولاکتون) در ۲ فرم aligned و random تاثیری بر افزایش میزان تکثیر سلولی ندارند.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که نانوفیبر PS آمینه باعث القای تکثیر سلول‌های $CD34^+$ می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد محیط نانوفیبر PS آمینه می‌تواند به عنوان یک استراتژی جهت افزایش سلول‌های $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف در محیط کشت آزمایشگاهی به کار گرفته شود.

کلمات کلیدی: خون بند ناف، سلول‌های بنیادی خونساز، آنتی‌ژن‌های CD34

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۱
تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۶

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات خون و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز ـ تبریز ـ ایران
۲- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون تبریز ـ تبریز ـ ایران ـ صندوق پستی: ۵۱۳۳۵
۳- PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات خون و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز ـ تبریز ـ ایران
۴- PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- دانشجوی PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

خون بند ناف به عنوان یک منبع جایگزین سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک در پیوندهای آلوگرافت جهت بیماران دارای انواع اختلالات بدخیم و غیر بدخیم معرفی شده است(۱). مشاهدات جدید نشان می‌دهد که علت تاخیر در بازسازی سلول‌ها پس از پیوند خون بند ناف، کافی نبودن سلول‌های بنیادی خون بند ناف در مقایسه با سایر منابع سلولی است به طوری که تعداد کم سلول‌های بنیادی، نقش مهمی در تاخیر بازسازی سلولی پس از پیوند خون بند ناف دارد(۲). در نتیجه، تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز در خارج از بدن قبل از پیوند و سپس تزریق آن‌ها به بدن با روشی ساده و مقرون به صرفه، قابل انجام است و می‌تواند سبب بازیافت سریع‌تر سلول‌ها پس از پیوند با خون بند ناف گردد(۳).

ریز محیط مغز استخوان، شبکه سه بعدی(3D) پیچیده‌ای از ماتریکس خارج سلولی(Extracellular Matrix، ECM) فراهم می‌آورد که به عنوان ریز محیط (Niche) سلول‌های بنیادی عمل کرده و اعمالی نظیر خودبازسازی، تکثیر، لانه گزینی و انتخاب سرنوشت سلولی را تنظیم می‌کند(۴). ثابت شده است که برخی مواد شیمیایی و نیز علایم توپوگرافیکی، بر روی میزان تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز(HSPC) و نیز افزایش سلول‌های $CD34^+$ تاثیر دارند(۷-۵).

جهت نیل به این هدف، محیط‌های کشت سلولی به گونه‌ای بهینه‌سازی شده‌اند تا خصوصیات فیزیولوژیکی این محیط‌های کشت آزمایشگاهی به محیط‌های بیولوژیکی زنده نزدیک شود. ECM و غشای پایه(Basement Membrane ، BM) هر دو تنظیم کننده اتصال سلولی، مهاجرت، ریخت‌زایی، آپوپتوزیس، تکثیر و تمایز هستند. ویژگی اصلی ECM و BM ، ساختار نانوفیبری آن‌هاست که به صورت شبکه سه بعدی(3D) و متخلخل می‌باشد. به همین دلیل ضروری است محیط‌های کشت سلولی تهیه شود تا خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سطوح رشد ECM و BM را تقلید کند و بتوان از آن‌ها جهت کشت سلول‌ها در آزمایشگاه استفاده کرد. به کارگیری این ویژگی‌ها به منظور ایجاد سیستم‌های سه بعدی(3D)، از لحاظ فیزیولوژیکی، مناسب سیستم‌های کشت سلول و در نهایت ترمیم بافت است(۸). اخیراً با استفاده از روش سه بعدی نساجی مانند Electrospinning ، بافت‌های فیبری پلی‌مریک تهیه شده که در مهندسی بافت و کشت سلول کاربرد دارند. مطالعه‌های بسیاری نشان داده است که در این داربست‌های فیبری؛ در عین حال که فنوتیپ سلولی حفظ می‌شود، پاسخ‌های سلولی مانند چسبندگی سلولی افزایش یافته و نیز منجر به تکثیر سریع سلولی می‌شود(۱۰، ۹، ۴). هم چنین مشاهده شده است HSPCs کشت داده شده بر سطح PS آمینه شده، در فقدان سایتوکاین‌های مکمل زنده نمی‌مانند که این امر نشان می‌دهد محیط نانوفیبر آمینه شده به تنهایی، جهت القای تکثیر کافی نیست و گروه‌های آمینی باند شده به سطح و هم چنین علایم توپوگرافی، به احتمال زیاد نقش حمایتی یا سینرژیتیک برای سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد(اضافه شده در محیط) دارند و بر روی تکثیر و تمایز HSPCs تاثیر می‌گذارند(۱۲، ۱۱، ۴). در این مطالعه اثر نانوفیبر PS آمینه بر میزان تکثیر و آپوپتوز سلول‌های $CD34^+$ و مقایسه آن با محیط دو بعدی معمول بررسی شد. در همین راستا اثر نانوفیبرهای aligned PCL (ردیفی) و random PCL (تصادفی) بر میزان تکثیر سلول‌های $CD34^+$ نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری خون بند ناف:

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. خون بند ناف پس از کسب رضایت‌نامه از مادران نوزادان، در لوله‌های استریل حاوی ضد انعقاد هپارین جمع‌آوری گردید، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل و در عرض ۴ ساعت جداسازی سلولی انجام شد.

جداسازی سلول‌های منونوکلئر و تخلیص سلول‌های $CD34^+$:

۳۰ mL خون بند ناف دارای ضد انعقاد هپارین با mL ۱۰ PBS ، حاوی BSA ۰/۵٪(تکنولوژیس)، Stem cell (کانادا، BC ، ونکوور) و EDTA ۲ mM و mL ۱۰-۷ از HES (Hydroxyethyl starch) (۱۰٪ HAES - steril ،

Archive of SID
www.SID.ir

Freeflex) مخلوط شد و به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه به همان حالت قرار داده تا گلبول‌های قرمز ته‌نشین شدند. سپس مایه‌رویی جمع‌آوری و سانتریفوژ شد. رسوب سلولی در حجم مشخصی از PBS حل شد و سلول‌های تک هسته‌ای بر روی فایکول(d:1/.077 g/mL ، GE Healthcare) و با استفاده از سانتریفوژ گرادیان غلظت جدا شد. سپس سلول‌ها با آنتی‌بادی CD34 Microbeads (آلمان) جهت تخلیص نشاندار شد و با روش positive selection و با استفاده از ستون LS جداسازی انجام شد. شمارش سلول‌های تخلیص شده با لام نئوبار و ارزیابی قابلیت حیات سلولی با استفاده از محلول تریپان بلو ۰/۴٪ (مرک) انجام شد.

تهیه نانوفیبر PS آمینه:

نانوفیبرهای پلی‌سولفان آمینه(با وزن مولکولی ۳۵۰۰۰ دالتون و قطر ۱۰۰- ۵۰ میکرون) و نانوفیبر الکترواسپان پلی‌کاپرولاکتون(به صورت aligned PCL و random PCL) از شرکت بن‌یاخته و به صورت آماده به عنوان هدیه دریافت شد. نانوفیبرها در اتانل ۷۰٪ استریل و در محلول PBS استریل تا زمان استفاده نگهداری شدند.

کشت سلول‌های $CD34^+$:

۵۰۰۰ عدد از سلول‌های $CD34^+$ تخلیص شده در محیط بدون سرم Stem Spam (کانادا، BC ، ونکوور، استمسل تکنولوژیس) در حفره‌های پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه (TPP ، برلین ـ بیوکروم) بدون نانوفیبر، حاوی نانوفیبر PS آمینه، حاوی aligned PCL و حاوی random PCL در حضور سایتوکاین‌های SCF ، FLT3 و TPO (کانادا، BC ، ونکوور، استمسل تکنولوژیس) با غلظت ۱۰۰ ng/mL کشت داده شدند(۱۳). سلول‌ها جهت بررسی مقایسه میزان تکثیر سلولی و بررسی آپوپتوز سلولی به مدت ۷ روز در محیط نانوفیبر PS آمینه، محیط نانوفیبر aligned PCL و random PCL کشت داده شدند. هم‌زمان با محیط سه بعدی، سلول‌ها در محیط معمول به عنوان کنترل به مدت ۷ روز تکثیر شدند. شمارش سلولی در روز هفتم کشت با استفاده از لام نئوبار انجام شد.

فلوسایتومتری:

در روز هفتم تکثیر، سلول‌های کشت داده شده از محیط مختلف در ۱۰۰ µL سوسپانسیونه شدند. ۵۰µL از سوسپانسیون سلولی با ۱۰ µL از آنتی‌بادی CD34 PE مخلوط گردید و در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و در تاریکی انکوبه شد. سپس سلول‌ها یک بار با PBS (حاوی ۰/۵٪ BSA) شستشو داده شدند و در ۲۵۰ µL از PBS و ۲۵۰ µL پارافرمالدئید به حالت سوسپانسیون در آمدند. سپس با دستگاه فلوسایتومتری FACSCalibur شرکت بیکتون دیکنسون، میزان درصد جمعیت سلول‌های بیان‌کننده مارکر CD34 قرائت شد.

تعیین میزان آپوپتوز سلول‌های $CD34^+$ کشت داده شده بر روی نانوفیبر PS آمینه با استفاده از Annexin V:

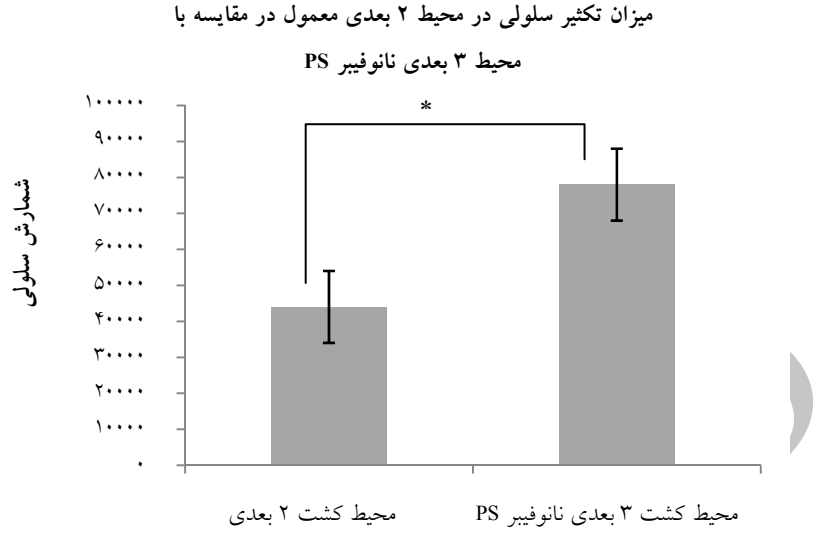
سلول‌های $CD34^+$ در محیط دو بعدی و محیط نانوفیبر PS آمینه جهت بررسی اثر نانوفیبر بر میزان آپوپتوز سلولی به مدت ۷ روز در محیط بدون سرم Stem spam (کانادا ، BC ، ونکوور، استمسل تکنولوژیس) و در حضور سایتوکاین‌های SCF ، FLT3 و TPO (کانادا، BC ، ونکوور، استمسل تکنولوژیس) با غلظت ۱۰۰ ng/mL کشت داده شدند. سلول‌ها در روز هفتم کشت جهت بررسی و مقایسه میزان آپوپتوز سلولی از هر دو محیط جمع‌آوری شدند. ۱۰µL از آنتی‌بادی Annexin V-FITC (میلتنی بیوتک) به تعداد 10^5 سلول اضافه و در تاریکی به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از یک بار شستشو، با فلوسیتومتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

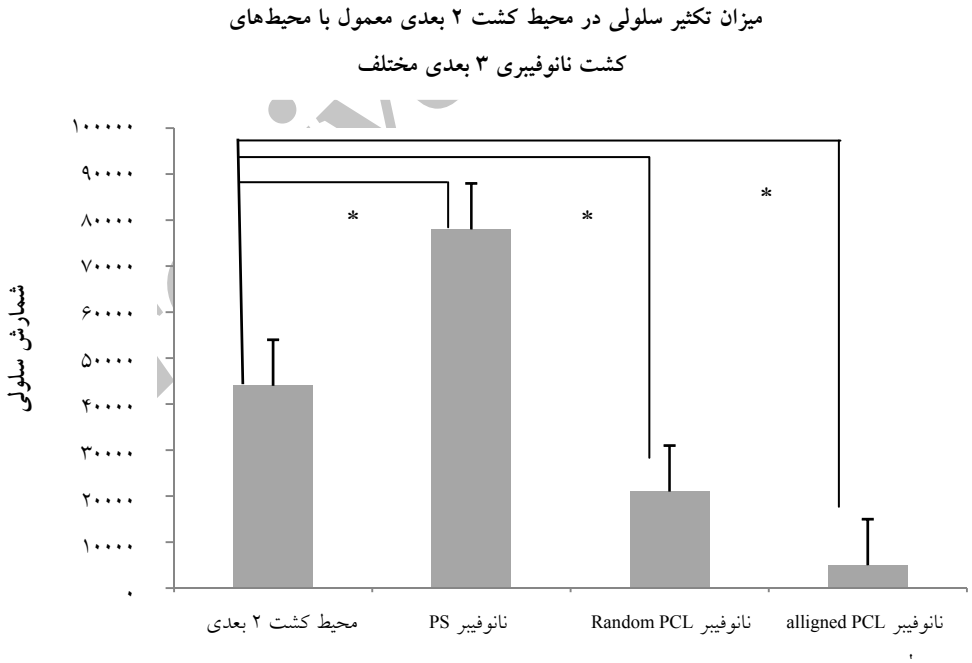
تعداد سلول‌ها بعد از یک هفته در محیط PS آمینه ۶۴۴۱ ± ۷۱۲۰۰ و در محیط ۲ بعدی معمولی ۲۵۰۳ ± ۳۸۷۴۰ بود که میانگین نسبت میزان تکثیر سلولی محیط سه بعدی نسبت به محیط دو بعدی ۱/۸۳ برابر محاسبه شد و افزایش معناداری را نشان داد(p= ۰/۰۰۰۵) (نمودار ۱).

میزان تکثیر سلول‌های $CD34^+$ در محیط دو بعدی در مقایسه با محیط‌های سه بعدی نانوفیبر PS آمینه

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۱: مقایسه میزان تکثیر سلولی(Fold expansion) سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف در روز هفتم تکثیر در محیط دو بعدی و سه بعدی(نانوفیبر PS آمینه). * نشان‌دهنده اختلاف معنادار ۰/۰۰۰۵ =p است.

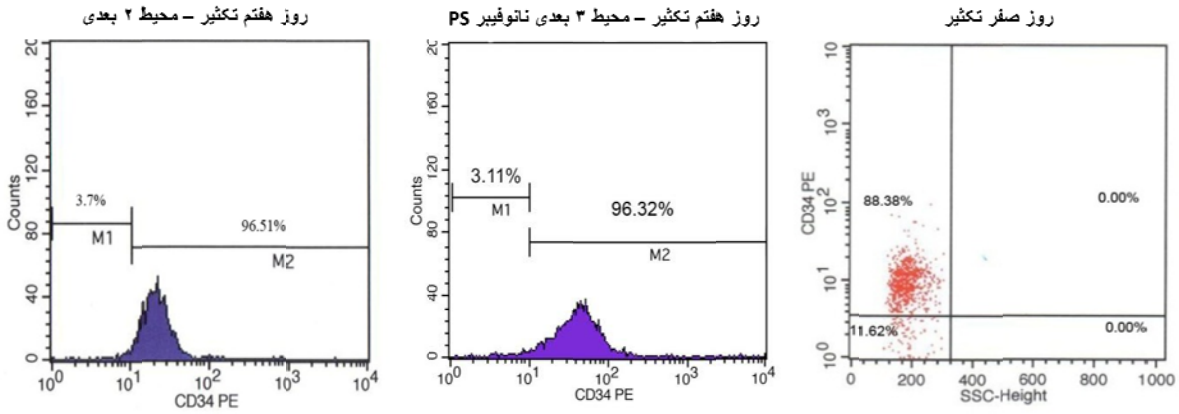


نمودار ۲: مقایسه میزان تکثیر سلولی(Fold expansion) سلول‌های +CD34 خون بند ناف در روز هفتم تکثیر در محیط دو بعدی و نانوفیبرهای aligned PCL ، random PCL و PS آمینه. * نشان‌دهنده اختلاف معنادار ۰/۰۰۰۵ =p است.

aligned PCL و random PCL به صورت نمودار نشان داده شده است(نمودار ۲). میانگین شمارش سلولی در نانوفیبر aligned PCL و نانوفیبر random PCL به ترتیب ۲۸۰۳ ± ۵۱۴۰ و ۵۵۲۹ ± ۲۱۸۰۰ بود. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که میزان تکثیر سلول‌های $CD34^+$ پس از ۷ روز در محیط‌های سه بعدی(aligned PCL و random PCL) در مقایسه با محیط دو بعدی کاهش یافته است.

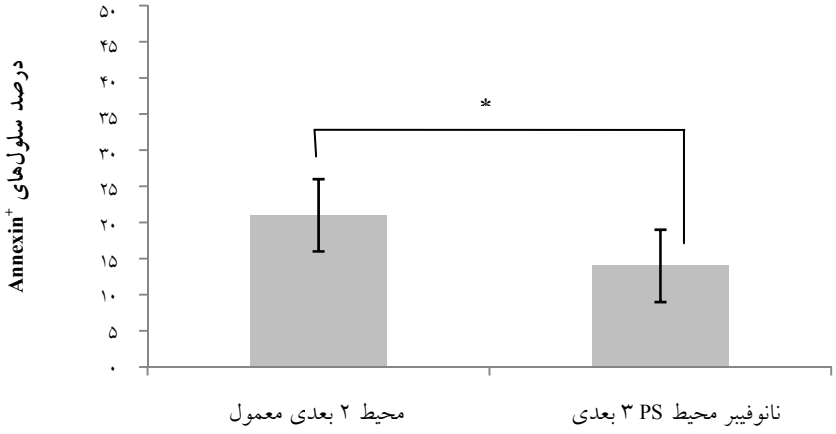
تعداد سلول‌ها در محیط نانوفیبر aligned PCL در

www.SID.ir



نمودار ۳: نمودار میزان سلول‌های بیان‌کننده مارکر $CD34^+$: الف- نمودار میزان سلول‌های بیان‌کننده مارکر $CD34^+$ در روز صفر تکثیر، ب ـ نمودار میزان سلول‌های بیان‌کننده مارکر $CD34^+$ در روز هفتم تکثیر در محیط دو بعدی، ج- نمودار میزان سلول‌های بیان‌کننده مارکر $CD34^+$ در روز هفتم تکثیر در محیط نانوفیبر PS آمینه

میزان درصد آپوپتوز در روز هفتم تکثیر ـ محیط دو بعدی و محیط نانوفیبر PS آمینه



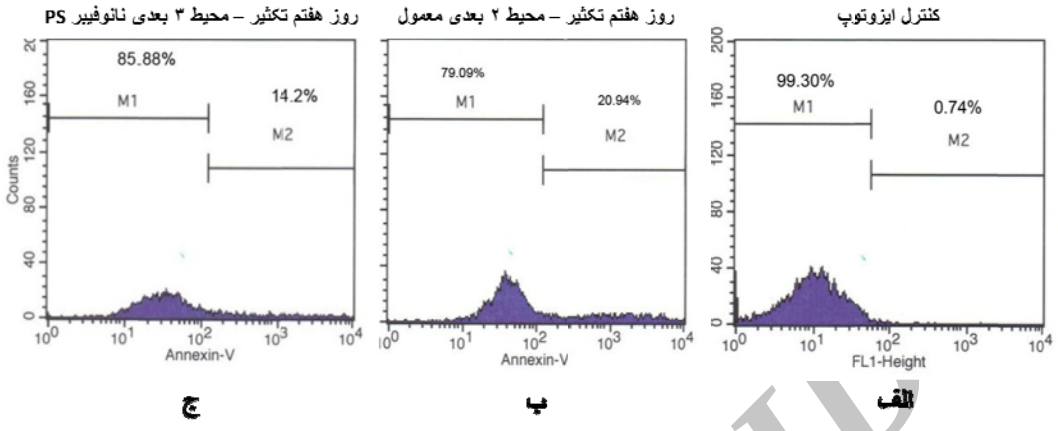
نمودار ۴: مقایسه میزان آپوپتوز سلول‌های $CD34^+$ در محیط دو بعدی و محیط نانوفیبر PS آمینه در روز ۷ تکثیر(* نشان‌دهنده اختلاف معنادار با ۰/۰۰۱ >p است).

مقایسه با روز اول کشت کاهش نشان داد و به صورت معناداری نسبت به محیط ۲ بعدی معمول کمتر بود(p= ۰/۰۰۰۴). در محیط random PCL هر چند نسبت به تعداد سلول‌های اولیه کشت افزایش داشت ولی نسبت به محیط دو بعدی به صورت معناداری کمتر بود (p= ۰/۰۰۰۰۴).

بر اساس نتایج به دست آمده، میزان بیان مارکر CD34 در روز صفر تکثیر(بلافاصله پس از جداسازی از ستون) ۸۸/۳۸٪ و در روز هفتم تکثیر در محیط دو بعدی و محیط نانوفیبر PS آمینه به ترتیب ۹۶/۵۱٪ و ۹۶/۳۲٪ بود. مقایسه محیط دو بعدی و محیط نانوفیبر در روز هفتم کشت نشان می‌دهد که از نظر میزان سلول‌های بیان‌کننده مارکر $CD34^+$ فاقد اختلاف معنادار می‌باشد(نمودار ۳).

نتایج مربوط به میزان آپوپتوز سلول‌هایCD34 مثبت در محیط دو بعدی و محیط نانوفیبر PS آمینه با استفاده از آنتی‌بادی Annexin V ، در نمودار آمده است(نمودار ۴).

www.SID.ir



نمودار ۵: نمودارهای مربوط به میزان آپوپتوز سلول‌های $CD34^+$ در روزهای هفتم در محیط دو بعدی و مقایسه آن با محیط سه بعدی(نانوفیبر PS): الف) نمودار مربوط به کنترل ایزوتوپ، ب) نمودار میزان درصد آپوپتوز سلول‌های $CD34^+$ در روز هفتم تکثیر در محیط دو بعدی، ج) نمودار میزان درصدآپوپتوز سلول‌های $CD34^+$ در روز هفتم تکثیر در محیط نانوفیبر PS آمینه

میانگین آپوپتوزیس در محیط ۲ بعدی ۱/۱ ± ۲۰/۸ درصد و در محیط دارای نانوفیبر PS آمینه ۱/۹ ± ۱۳/۸ درصد بود. مقایسه میزان آپوپتوز در محیط دو بعدی معمول و محیط دارای نانوفیبر PS آمینه نشان می‌دهد که میزان آپوپتوز سلولی در محیط نانوفیبر PS آمینه کمتر از محیط دو بعدی است و تفاوت آن‌ها معنادار است(p=۰/۰۰۱)(نمودارهای ۴ و ۵).

بحث

خون بند ناف به عنوان یک منبع جایگزین مناسب سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک در پیوندهای آلوگرافت جهت بیمارانی که اهداکننده خویشاوند یا غیر خویشاوند سازگار از نظر HLA ندارند و دارای انواع اختلالات بدخیم و غیر بدخیم می‌باشند، معرفی شده است(۱). با این وجود استفاده از خون بند ناف در بیماران بالغ به علت وجود تعداد ناکافی سلول‌های بنیادی اولیه موجود در یک یا حتی دو واحد خون بند ناف، محدود شده است(۱۴). در مطالعه حاضر به منظور ایجاد دستورالعمل کاربردی جهت تکثیر خارج از بدن سلول‌های $CD34^+$ ، از نانوفیبر PS آمینه استفاده شد. علت انتخاب نانوفیبر PS ، ویژگی‌های مثبت آن به عنوان ساختار حمایت‌کننده از تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی است(۱۵). هم چنین اثر نانوفیبر aligned PCL و random PCL در میزان تکثیر سلول‌های $CD34^+$ ارزیابی شد. در این تحقیق میانگین سلول‌های $CD34^+$ تخلیص شده با ستون در روز صفر تکثیر، ۸۸/۳۸٪ بود که این میزان در مطالعه‌های مختلف به صورت ۹۲٪ و ۶۶٪ گزارش شده است(۱۷، ۱۶). نتایج تکثیر سلولی حاکی از آن بود که سلول‌های $CD34^+$ در محیط نانوفیبر PS آمینه، قدرت تکثیر بالاتری نسبت به محیط دو بعدی دارند. این اختلاف از نظر آماری معنادار بود(نمودار ۲). نتایج این تحقیق مشابه مطالعه‌های انجام شده در این زمینه می‌باشد(۹، ۶). بنابراین نانوفیبر PS آمینه می‌تواند باعث تکثیر بیشتر سلول‌های بنیادی شود.

هم چنین مقایسه میزان بیان مارکر CD34 در محیط دو بعدی و محیط نانوفیبر PS آمینه در روز هفتم کشت نسبت به سلول‌های روز صفر تکثیر نشان داد که این سلول‌ها در هر دو محیط فقط تکثیر یافته و با توجه به سایتوکاین‌های افزوده شده در محیط، تمایزی را نشان ندادند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عامل اصلی در انتخاب سرنوشت سلولی از جمله تکثیر، سایتوکاین‌های موجود در محیط می‌باشد و نانوفیبر PS آمینه به تنهایی نقشی در تعیین سرنوشت سلولی ندارد و تنها باعث تشدید اثر سایتوکاین‌ها بر سلول‌ها می‌شود. نتایج ارزیابی مقایسه بر روی نانوفیبر aligned PCL و random PCL با محیط دو

www.SID.ir

بعدی معمول نشان داد که این نانوفیبرها نمی‌توانند باعث افزایش تکثیر سلولی همانند نانوفیبر PS آمینه شوند. همان طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، تعداد سلول‌های کشت داده شده بر روی نانوفیبر aligned PCL پس از ۳ روز کشت نسبت به سلول‌های اولیه کاهش نشان داد. در نتیجه احتمالاً نانوفیبر aligned PCL اثر منفی بر روی تکثیر سلولی داشته و باعث مرگ سلول‌ها می‌شود. در یافته‌های این تحقیق، اثر نانوفیبر random PCL بر روی تکثیر سلولی با افزایش تعداد کمی سلول همراه بود. این یافته نشان می‌دهد که نانوفیبر random PCL اگر چه باعث افزایش تعداد سلول‌ها نسبت به سلول‌های اولیه شده‌اند اما در مقایسه با محیط دو بعدی، از افزایش کمی در تکثیر و تعداد سلولی برخوردار هستند. البته برای این پدیده توجیه قابل قبولی نداریم.

میزان آپوپتوز سلول‌های $CD34^+$ محیط نانوفیبر PS آمینه نسبت به محیط دو بعدی در نمودارهای ۴ و ۵ نشان داده شده است که این میزان در محیط نانوفیبر PS آمینه نسبت به محیط دو بعدی به صورت معناداری کاهش نشان داد. احتمال دارد نانوفیبر PS با مکانیسم‌های ناشناخته‌ای نظیر افزایش القای بیان ژن‌های ضد آپوپتوز و یا مکانیسم‌های ضد آپوپتوز دیگر باعث کاهش میزان آپوپتوز در سلول‌های $CD34^+$ می‌شود. نتایج مربوط به نانوفیبرهای PCL متضاد با نتایج نانوفیبر PS آمینه به دست آمد، به طوری که میزان تکثیر سلولی در محیط نانوفیبر aligned PCL و random PCL ، در مقایسه با محیط دو بعدی کاهش نشان داده است. داده‌های ما نشان می‌دهند، علی‌رغم این که نانوفیبر PS آمینه می‌تواند باعث افزایش تکثیر سلولی شود، نانوفیبر aligned PCL و random PCL اثر منفی بر روی تکثیر سلولی داشته و موجب کاهش تعداد سلول‌های کشت داده شده می‌شوند.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نانوفیبر PS آمینه باعث القای تکثیر سلول‌های $CD34^+$ می‌شود. بنابراین با توجه به مطالعه‌های مختلف در زمینه رسیدن به تکثیر بهینه سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک در خارج از بدن در محیط‌های کشت سه بعدی، به نظر می‌رسد محیط نانوفیبر PS آمینه می‌تواند به عنوان یک استراتژی جهت افزایش سلول‌های $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف در محیط کشت آزمایشگاهی به کار گرفته شود. تزریق سلول‌های $CD34^+$ تکثیر شده در محیط کشت نانوفیبر PS آمینه می‌تواند در حین پیوند سلول‌های بنیادی نابالغ اتولوگ خون بند ناف، موجب افزایش تعداد سلول‌های بنیادی خونساز و کاهش مدت زمان بازیافت سلول‌ها پس از پیوند و در نتیجه کاهش میزان مرگ و میر ناشی از تعداد کم سلول‌های بنیادی گردد. در عین حال نانوفیبر PCL تاثیری بر افزایش سلول‌های $CD34^+$ ندارد و نمی‌توان از آن به عنوان محیط سه بعدی مناسب در تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز استفاده کرد.

Archive of SID

References:

1- Frassoni F, Podesta M, Maccario R, Giorgiani G, Rossi G, Zecca M, *et al*. Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir compared with bone marrow transplantation. Blood 2003; 102(3): 1138-41.
2- Ignatz M, Sola-Visner M, Rimsza LM, Fuchs D, Shuster JJ, Li XM, *et al*. Umbilical cord blood produces small megakaryocytes after transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2007; 13(2): 145-50.
3- Pick M, Eldor A, Grisaru D, Zander AR, Shenhav M, Deutsch VR. *Ex vivo* expansion of megakaryocyte progenitors from cryopreserved umbilical cord blood. A potential source of megakaryocytes for transplantation. Exp Hematol 2002; 30(9): 1079-87.
4- Chua KN, Chai C, Lee PC, Tang YN, Ramakrishna S, Leong KW, *et al*. Surface-aminated electrospun nanofibers enhance adhesion and expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. Biomaterials 2006; 27(36): 6043-51.
5- LaIuppa JA, McAdams TA, Papoutsakis ET, Miller WM. Culture materials affect *ex vivo* expansion of hematopoietic progenitor cells. J Biomed Mater Res 1997; 36(3): 347-59.
6- Li Y, Ma T, Kniss DA, Yang ST, Lasky LC. Human cord cell hematopoiesis in three-dimensional nonwoven fibrous matrices: in vitro simulation of the marrow microenvironment. J Hematother Stem Cell Res 2001; 10(3): 355-68.

www.SID.ir

7- Feng Q, Chai C, Jiang XS, Leong KW, Mao HQ. Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin. J Biomed Mater Res A 2006; 78(4): 781-91.
8- Schindler M, Nur-E-Kamal A, Ahmed I, Kamal J, Liu HY, Amor N, *et al*. Living in three dimensions: 3D nanostructured environments for cell culture and regenerative medicine. Cell Biochem Biophys 2006; 45(2): 215-27.
9- Das H, Abdulhameed N, Joseph M, Sakthivel R, Mao HQ, Pompili VJ. *Ex vivo* nanofiber expansion and genetic modification of human cord blood-derived progenitor/stem cells enhances vasculogenesis. Cell Transplant 2009; 18(3): 305-18.
10- Lee CH, Shin HJ, Cho IH, Kang YM, Kim IA, Park KD, *et al*. Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. Biomaterials 2005; 26(11): 1261-70.
11- Eridani S, Mazza U, Massaro P, La Targia ML, Maiolo AT, Mosca A. Cytokine effect on *ex vivo* expansion of haemopoietic stem cells from different human sources. Biotherapy 1998; 11(4): 291-6.
12- Heike T, Nakahata T. *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. Biochim Biophys Acta 2002; 1592(3): 313-21.
13- Nikougoftar Zarif M, Soleimani M, Abolghasemi H, Amirizade N, Abroun S, Kaviani S. The High Yield Expansion and Megakaryocytic Differentiation of Human Umbilical Cord Blood CD133(+) Cells. Cell J 2011; 13(3): 173-8
14- Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY, McAfee S, Dey BR, Attar E, *et al*. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. Biol Blood Marrow Transplant 2007; 13(1): 82-9.
15- Shabani I, Haddadi-Asl V, Seyedjafari E, Babaeijandaghi F, Soleimani M. Improved infiltration of stem cells on electrospun nanofibers. Biochem Biophys Res Commun 2009; 382(1): 129-33.
16- Kusadasi N, Koevoet JL, van Soest PL, Ploemacher RE. Stromal support augments extended long-term *ex vivo* expansion of hemopoietic progenitor cells. Leukemia 2001; 15(9): 1347-58.
17- Ranjbaran R. Expansion of CD34+ umbilical cord blood in 3 dimentional culture media on mescenchymal stem cell coated scaffold [dissertation]. Tehran: Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine; 2009. [Farsi]

Archive of SID

www.SID.ir

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2013; 10(2): 103-111

Original Article

Proliferation promoting and apoptosis inhibiting effect of aminated PS nanofibers on cord blood hematopoietic stem cells

Sabaghi F.[1], Shams Asanjan K.[2,3], Movasaghpour Akbari A.A.[1], Amirizadeh N.[2], Nikougoftar M.[2], Bagheri N.[2], Abbasi P.[1]

[1]*Hematology Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*
[2]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
[3]*Tabriz Educational Regional Blood Transfusion Center, Tabriz, Iran*

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives

Umbilical cord blood is a promising alternative source of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Although the use of UCB for transplantation has plentiful advantages in comparison with other cell sources, the low number of HSPCs led to cell delayed recovery. Therefore, *ex vivo* expansion of HSPC before transfusion could induce faster cell recovery.

Materials and Methods

CD34 positive cells were positively enriched using MidiMACS system and cultured on aminated PS nanofibers, aligned PCLs, and random PCLs. Cell expansion and quantification of cell apoptosis were carried out in expanded cell populations in different conditions by the flowcytometric method.

Results

Microscopic and flowcytometric analysis revealed the differentiation of $CD133^+$ cord blood hematopoietic stem cells to erythroid lineage. Flow cytometry showed that both of the PPARγ agonists were able to diminish Transferrin receptor and glycophorin A positive cell population significantly. The inhibitory effect of PPARγ agonists on erythroid differentiation was dose-dependent. The inhibitory effect of Troglitazone on colonies formation of Erythroid was markedly higher than Bicaline.

Conclusions

This study demonstrated that aminated PS nanofibers has positive effects on the expansion of $CD34^+$ cells compared to 2D culture system by increasing cell expansion and cell apopotosis inhibition. However, aligned and random PCL nanofibers did not show supportive effects on cell proliferation.

Key words: Cord Blood, Hematopoietic Stem Cells, CD34 Antigens

Received: 13 Oct 2011
Accepted: 7 Oct 2012

Correspondence: Shams Asanjan K., PhD of Hematology and Blood Banking. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 51335, Tabriz , Iran. Tel: (+98411) 2871515; Fax: (+98411) 2871515
E-mail: *k.shams@ibto.ir*

www.SID.ir