جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خون
دوره ۱۰ شماره ۲ تابستان ۹۲ (۱۲۱-۱۱۲)

مقاله پژوهشی

مطالعه پتانسیل تکثیری و تمایزی سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف تکثیر شده در بیوراکتور سوسپانسیونی مجهز به همزن رفت و برگشتی

نیلوفر شایان اصل[۱]، مرضیه ابراهیمی[۲]، بهاره بیکی[۳]، احسان جان زمین[۴]، پوریا بنی اردلان[۵]

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی خون بند ناف، با تعداد بالای سلول، کاندیداهای مناسبی برای پیوند در بیماری‌های خوش‌خیم و بدخیم می‌باشند. اما اکثراً تعداد محدودی دارند بنابراین تکثیر این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه با بیوراکتور سوسپانسیونی همزن‌دار انجام شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه کاربردی، سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف به میزان $۱/۰۷ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر در حجم ۲۰۶ میلی‌لیتر در بیوراکتور سوسپانسیونی با همزن رفت و برگشتی و گروهی دیگر با همان تعداد در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت داخل فلاسک کشت داده شدند. دوره کشت هر دو گروه ۱۴ روز به طول انجامید. در روزهای ۰ ، ۳ ، ۷ و ۱۴ ، نمونه‌گیری انجام شده و سلول‌ها مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته‌ها

در ابتدای کشت، سلول‌های تمایز یافته حذف(روز ۳) و سپس تا هفته دوم، افزایش یافتند(به ترتیب در بیوراکتور از $۰/۴۲ \times ۱۰^{۶}$ در هر میلی‌لیتر به $۱/۲ \times ۱۰^{۶}$ و در کشت استاتیک از $۰/۶ \times ۱۰^{۶}$ به $۲/۹ \times ۱۰^{۶}$ رسیدند). سلول‌های $CD34^{+}$ پس از ۱۴ روز، در بیوراکتور ۶/۸۶ برابر و در کشت استاتیک ۱/۰۷ برابر بود و نیز قدرت تشکیل کلنی در بیوراکتور به طور معناداری افزایش داشت.

نتیجه گیری

سلول‌های بنیادی خونساز در این بیوراکتور با حفظ خواص بنیادی تکثیر می‌یابند. با این وجود، احتمالاً به دلیل افزایش استرس برشی(Shear stress) در محیط، تعداد کل سلول‌ها افزایش نمی‌یابد و نیازمند مطالعه‌های بیشتر می‌باشد.

کلمات کلیدی: خون بند ناف، سلول‌های بنیادی خون‌ساز ، بیوراکتور

تاریخ دریافت : ۹۱/۲/۳۱
تاریخ پذیرش : ۹۱/۶/۲۹

۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ـ گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی ـ پژوهشکده فناوری و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی ـ مرکز تحقیقات علوم سلولی پژوهشگاه رویان ـ تهران ـ ایران

۲- مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی ـ استادیار گروه زیست پزشکی ترمیمی ـ پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی ـ مرکز تحقیقات علوم سلولی ـ پژوهشگاه رویان ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵

۳- کارشناس ارشد زیست‌شناسی تکوینی ـ گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی ـ پژوهشکده فناوری و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی ـ مرکز تحقیقات علوم سلولی پژوهشگاه رویان ـ تهران ـ ایران

۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی ـ پژوهشکده فناوری و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی ـ مرکز تحقیقات علوم سلولی پژوهشگاه رویان ـ تهران ـ ایران

۵- کارشناس بیوتکنولوژی ـ گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی ـ پژوهشکده فناوری و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی ـ مرکز تحقیقات علوم سلولی پژوهشگاه رویان ـ تهران ـ ایران

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

سلول‌های بنیادی خونساز(HSCs)که توان خود نوزایی (S.R = Self Renewal) و پتانسیل بالایی در تبدیل به سلول‌های خونی و غیر خونی دارند، از جمله کاندیدهای مناسب برای درمان بسیاری از بیماری‌های خونی چون لوسمی، تالاسمی، کم خونی‌های مادرزادی، نقص‌های سیستم خونساز و سیستم ایمنی، بیماری‌های غیر خونی چون آلزایمر، آسیب‌های مغزی ـ نخاعی و سایر بیماری‌ها می‌باشند(۱). این سلول‌ها در مغز استخوان، خون محیطی، کبد جنینی و خون بند ناف یافت می‌شوند(۲). از میان تمامی منابع ذکر شده، خون بند ناف به دلیل سهولت جمع‌آوری، عدم وجود خطر برای فرد دهنده، کاهش رد ایمونوژنیک و GVHD (Graft Versus Host Disease) در فرد گیرنده و عدم آلودگی به ویروس‌های CMV و EBV نسبت به سایر منابع بهتر است(۵-۳). با این وجود محدودیت عمده این خون، تعداد کم سلول‌ها است که معمولاً پاسخگوی نیاز افراد بالغ نیست(۷، ۶). به عبارتی برای درمان مناسب، تعداد حداقل $۱۰^{۷}$ × ۳-۱ از سلول هسته‌دار به ازای هر کیلو وزن بدن مورد نیاز است(۸). امروزه استفاده از روش‌هایی چون پیوند ۲ واحد خون بند ناف و یا ازدیاد سلول‌ها با روش‌های تکثیر سلولی(*Ex vivo* Expansion) بر این مشکل غلبه کرده‌اند(۱۰، ۹).

از جمله محدودیت‌های کشت استاتیک می‌توان به عدم یکنواختی در توزیع مواد غذایی و گازها در مایع کشت، محدودیت در کنترل O_2 ، pH و متابولیت‌ها و باز بودن شرایط کشت اشاره نمود(۱۱). امروزه با استفاده از بیوراکتورها می‌توان به ازدیاد کنترل شده سلول ها با کمترین دست‌ورزی اقدام نمود.

عملکرد بیوراکتورها با توجه به نوع سلول‌ها و شکل بیوراکتور و همزن آن متفاوت است و به منظور ازدیاد سلول‌های غیر چسبنده(از جمله HSC ها)، از بیوراکتور سوسپانسیونی همزن‌دار از نوع چرخشی (Stirrer) استفاده می‌شود(۱۲). در این نوع بیوراکتورها، همزن در یک سطح افقی حرکت چرخشی داشته و جریان دورانی را در محیط کشت ایجاد می‌نماید که منجر به افزایش استرس برشی(Shear Stress) می‌شود (۱۵-۱۳).

در این مطالعه به منظور کاهش استرس بر سلول‌ها، از یک بیوراکتور سوسپانسیونی مجهز به همزن مغناطیسی با حرکت رفت و برگشتی استفاده گردید تا اثر تغییر همزن در افزایش تعداد سلول‌ها، پتانسیل تشکیل کلنی و نیز بیان ژن‌های بنیادینگی نیز مورد بررسی قرار گیرد. همچنین سلول‌ها در کشت استاتیک و بیوراکتور با یکدیگر نیز مقایسه شدند.

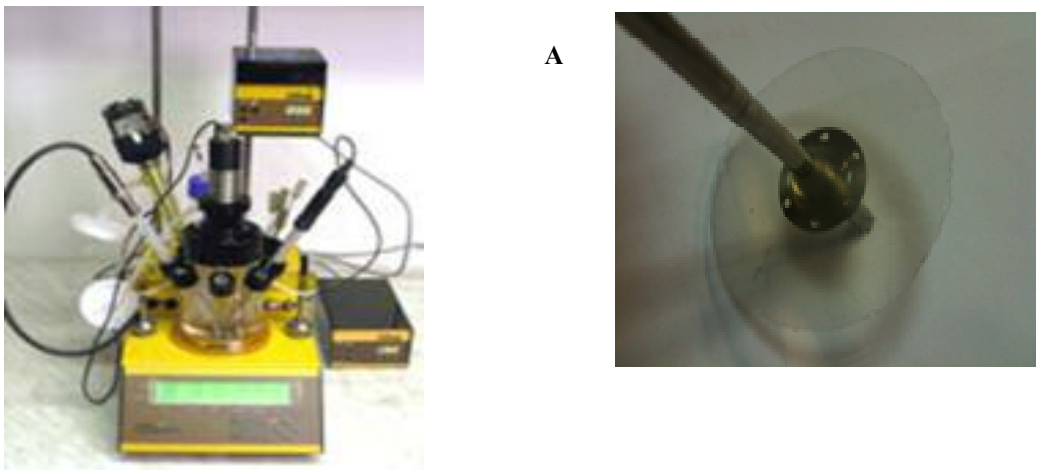
مواد و روش‌ها

۱- جداسازی و کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف:

مطالعه انجام شده از نوع کاربردی بود. واحدهای خون بند ناف از بانک عمومی خون بند ناف رویان تهیه گردید. اهداکنندگان خون بند ناف، مادران سالم(بر اساس پرسشنامه پزشکی فاقد بیماری‌های زمینه‌ای و ژنتیکی و بر اساس آزمایش‌های سرولوژی، عاری از بیماری‌های ویروسی CMV ، HTLV I/II ، HBV ، HCV ، HIV و سیفلیس) با دوره حاملگی کامل بودند. به منظور حذف گلبول‌های قرمز، هر ۵ میلی‌لیتر خون کامل با ۱ میلی‌لیتر هیدروکسی اتیل استارچ(آلمان – GmbH) مخلوط و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف (UCB-MNC) با استفاده از شیب غلظت لنفودکس(دیاگنوستیکا) جدا گردید(۱۶). سلول‌های جدا شده توسط محیط حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو(Fetal Bovin Serum)(گیبکو) شستشو داده شدند و تعداد و میزان سلول‌های زنده (Viability) با استفاده از لام نئوبار و تریپان بلو ۰/۴٪ تعیین گردید.

تعداد $۱۰^{۶}$×۱سلول در میلی‌لیتر، به محیط کشت IMDM شامل FBS (۱۰٪)، ال‌گلوتامین(آلمان، گیبکو)(۲ mM) و پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (آلمان، گیبکو)(۱۰۰ ng/mL/۱۰۰ U/mL) اضافه گردید. سپس به محیط کشت Flt3L و SCF هر کدام به میزان ۱۵۰ ng/mL G-CSF و GM-CSF به میزان ۱۵ ng/mL ، اینترلوکین ۳ و TPO به میزان ۱۰ ng/mL و EPO به میزان ۳۰ ng/mL (همه از شرکت R&D آمریکا) اضافه و کشت به مدت ۱۴ روز انجام گرفت.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



شکل ۱: A : همزن fish tail به کار رفته در بیوراکتور. B : بیوراکتور سوسپانسیونی

در کشت استاتیک، سلول‌ها در حجم ۲ میلی‌لیتر به پلیت ۶ خانه منتقل و در انکوباتور با دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO_2 کشت شدند. در طول ۱۴ روز، ۳ بار تعویض محیط انجام شد. در کشت با استفاده از بیوراکتور، سلول‌ها در حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر در بیوراکتور سوسپانسیونی با ظرفیت ۵۰۰ میلی‌لیتر، با قابلیت کنترل pH، O_2 و دما کشت داده شدند(دستگاه MINIFOR، شرکت لامبدا، سوئیس). در این سیستم از همزن صفحه‌ای(fish tail disc) با حرکت بالا و پایین با سرعت ۱ Hz استفاده گردید(شکل ۱). کنترل دما و pH به ترتیب بر روی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۷/۲(با دقت ۰/۱) تنظیم شد. کنترل O_2 حل شده در محیط با سنسور دیگری انجام گردید. تنظیم pH و O_2 از طریق وارد کردن گاز CO_2 و O_2 در محیط صورت گرفت. تعویض محیط در هر دو گروه به صورت هفتگی انجام شد و برای آنالیز سلول‌ها، نمونه‌برداری در روزهای ۰، ۳، ۷ و ۱۴ انجام گرفت.

بررسی ایمونوفنوتیپ سلول‌ها:

به منظور بررسی ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های کشت‌یافته، در هر دو روش تعداد 10^6 سلول مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های Mouse IgG1 Isotype Control-FITC (فارمین‌ژن)، Mouse IgG1 Isotype Control-RPE (داکو) و Mouse IgG1 Isotype Control-PE-Cy5 (بیوساینس) هم‌زمان به ۱۰۵ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر PBS در لوله پلی‌استیرن به عنوان ایزوتایپ کنترل سه رنگ و ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های Mouse Anti Human CD34-FITC (فارمین‌ژن)، Mouse Anti Human CD38-PE-Cy5 (بیوساینس) و Mouse Anti Human CD 90-RPE (داکو) به همان تعداد سلول در لوله‌ای دیگر به عنوان آزمایش سه رنگ اضافه شد. در لوله پلی‌استیرن دیگری نیز به 10^5 سلول، ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های Mouse IgG1 Isotype Control-PE-Cy5 , Mouse IgG1 Isotype Control-PE (eBioscience 12-4015) به عنوان کنترل دو رنگ و ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های Mouse Anti Human CD 34-FITC Human ، Mouse Anti CD 133-PE (ebioscience 12-1338-73) به این تعداد سلول در لوله بعدی به عنوان آزمایش دو رنگ به طور هم زمان اضافه شد. جهت تصحیح میزان هم‌پوشانی رنگ‌های فلورسنس در دستگاه فلوسایتومتر نیز ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های CD38-PE.Cy5، CD133-PE، CD90-RPE و CD34-FITC به 10^5 سلول در چهار لوله جداگانه به صورت تک رنگ اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و اتاق تاریک، ۱ میلی‌لیتر از محلول PBS جهت شستشو به لوله‌ها اضافه گردید و پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ در ۱۵۰۰ دور بر دقیقه، محلول رویی جدا و به رسوب سلولی حاصل ۳۰۰ میکرولیتر محلول PBS اضافه شد. نمونه‌های آماده شده در دستگاه فلوسایتومتری BD (آمریکا، بکتون دیکینسون) FACS

Calibur در طول موج ۴۸۸ نانومتر، با فیلترهای nm BP ۵۳۰/۳۰ برای FITC ، nm BP ۵۸۵/۴۲ برای PE و nm LP ۶۷۰ برای PE-Cy5 به وسیله نرم‌افزار BD Cell Quest Pro مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

سنجش پتانسیل تمایزی با استفاده از روش سنجش کلنی در محیط نیمه جامد:

به منظور مقایسه پتانسیل تکثیری سلول‌های کشت شده در دو گروه استاتیک و بیوراکتور، تعداد ۱×۱۰^{۴} سلول در روزهای نمونه‌گیری شمارش و در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت متوکالت(Stem Cell ، Methocult ۴۴۳۶ ، کانادا، ونکوور، تکنولوژیست) در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد. نتایج رشد کلنی‌ها پس از ۱۴ روز با شمارش کلنی و تشخیص نوع آن مورد ارزیابی قرار گرفت. تشخیص نوع کلونی با استفاده از راهنمای شرکت استم سل انجام شد.

بررسی بیان ژن‌های بنیادینگی توسط RT-PCR:

بیان ۵ ژن مربوط به بنیادینگی(Thy-1 ، AC133 ، CD34 ، c-kit و ABCG2) با آزمایش RT-PCR بررسی شدند؛ به این علت که باقی ماندن سلول‌های بنیادی بدون تمایز و تغییر در کشت، بسیار حایز اهمیت است. ابتدا RNA از سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف در روزهای ۱، ۷، ۳ و ۱۴ با استفاده از ماده RNX (سیناژن) طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده، استخراج شد. برای ساخت cDNA از کیت فرمنتاز(آلمان) استفاده گردید. انجام RT-PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده با برنامه ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۴ دقیقه سپس ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه(۳۰ سیکل)، و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول این واکنش روی ژل ۲٪ آگاروز برده شد و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید مشاهده و بررسی گردید.

آنالیز آماری:

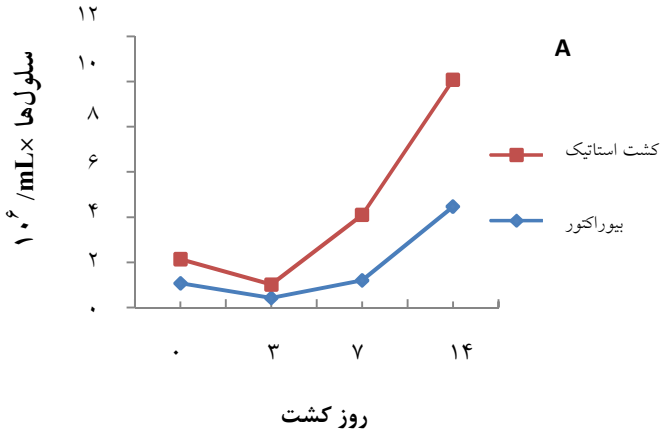
به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ استفاده گردید و نتایج سه آزمایش بر اساس روش student t-test با میزان $p \leq ۰/۰۵$ معنادار گزارش شد.

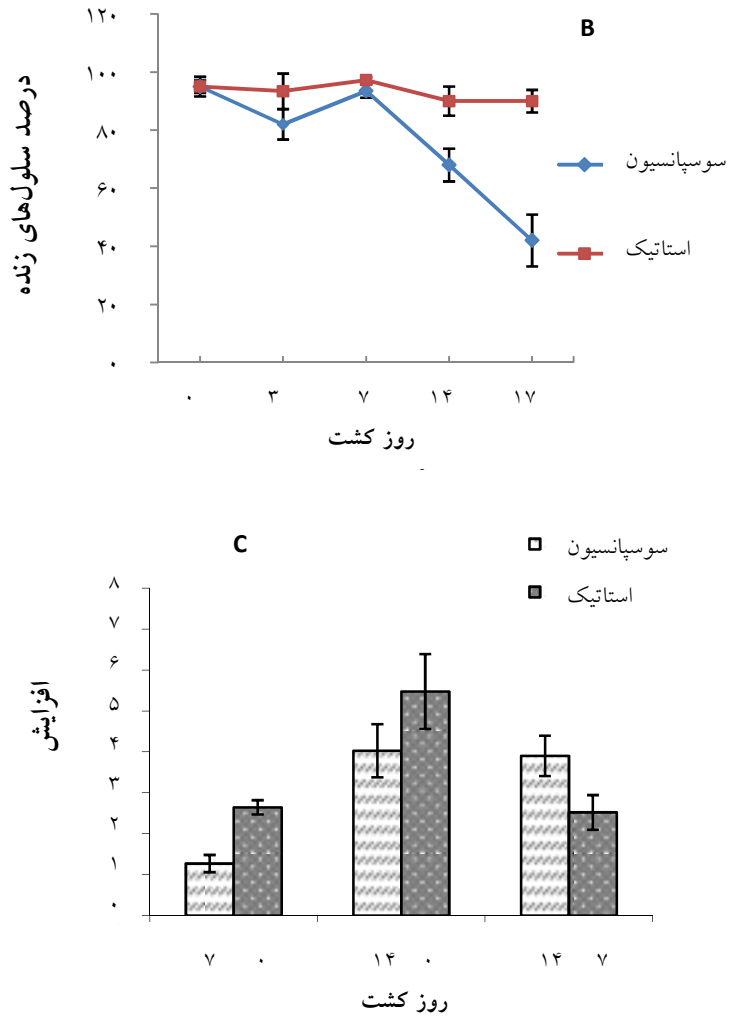
یافته‌ها

کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف به دو روش استاتیک و بیوراکتور:

برای مقایسه تعداد سلول در بیوراکتور و کشت استاتیک در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ ، شمارش دستی انجام شد. مشاهدات میکروسکوپی و نتایج شمارش سلولی نشان داد که تا روز سوم، کاهش تعداد سلول‌ها در هر دو روش کشت اتفاق می‌افتد که ممکن است مربوط به از بین رفتن سلول‌های تمایز یافته موجود در خون باشد. سپس در روزهای ۷ و ۱۴ تعداد سلول‌ها افزایش یافت که این افزایش در کشت استاتیک چشمگیر بود($p \leq ۰/۰۵$)(شکل ۲A).

میزان سلول‌های زنده طبق نمودار B در شکل ۲ در روزهای مختلف کشت در هر دو سیستم یکسان نبود و در





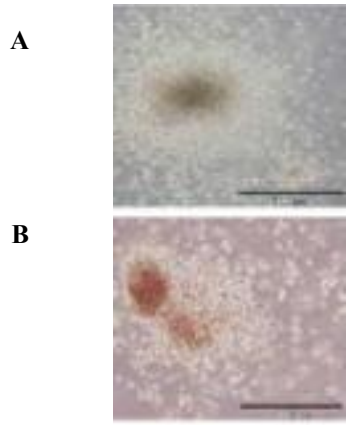
شکل ۲: شمارش سلول‌های کشت شده در هر دو سیستم سوسپانسیونی و استاتیک(A)، نمایش درصد سلول‌های زنده در حالت کشت سوسپانسیونی و استاتیک(B) و نسبت رشد سلول‌ها در روزهای ۷ و ۱۴ به روز اول(C) نشان داده شده‌اند. نتایج نشان داد که تعداد سلول‌ها در گروه استاتیک طی ۱۴ روز کشت افزایش معناداری داشتند($p\leq ۰/۰۳$) در حالی که در هفته دوم نسبت به هفته اول، کشت سوسپانسیونی در مقایسه با حالت استاتیک افزایش سلول معنادار بود($p\leq ۰/۰۱$).

کشت سوسپانسیونی از روز ۱۴ به بعد سلول‌های زنده کاهش داشتند(شکل B ۲). بعد از ۱۴ روز کشت، تعداد سلول‌های $CD34^+$ در بیوراکتور نسبت به کشت استاتیک افزایش بیشتری یافت که به ترتیب ۶/۸۶ برابر در بیوراکتور و ۱/۰۷ برابر در استاتیک بود. با این وجود تعداد کل سلول‌های هسته‌دار تا روز چهاردهم در کشت استاتیک ۵/۲۵ برابر و در بیوراکتور ۴/۳ برابر شده بود. نتایج نشان داد که نسبت تعداد سلول‌ها در هفته دوم کشت، در بیوراکتور(۳/۹۸ برابر) در مقایسه با کشت استاتیک(۲/۲۳ برابر) افزایش معناداری داشت($p\leq ۰/۰۱$)(شکل C ۲).

۱- بررسی تمایز سلول‌ها در کشت استاتیک و بیوراکتور:

بررسی پتانسیل کلنی‌زایی سلول‌های تک هسته‌ای کشت شده توسط بیوراکتور:

به منظور بررسی توان ایجاد کلنی در روزهای مختلف کشت، از آزمایش سنجش کلنی بر روی محیط نیمه جامد استفاده شد(شکل۳). در روز ۷ و ۱۴ توان کلنی‌زایی



شکل ۳: نتایج سنجش کلنی پس از گذشت ۱۴ روز را نشان می‌دهد که عکس A کلنی ماکروفاژی(CFU-GM) و عکس B کلنی میکس (CFU- GEMM) هستند.

جدول ۱: این جدول نشان می‌دهد که پتانسیل کلنی‌زایی در کشت سوسپانسیونی در مقایسه با حالت استاتیک، میزان بیشتری دارد.

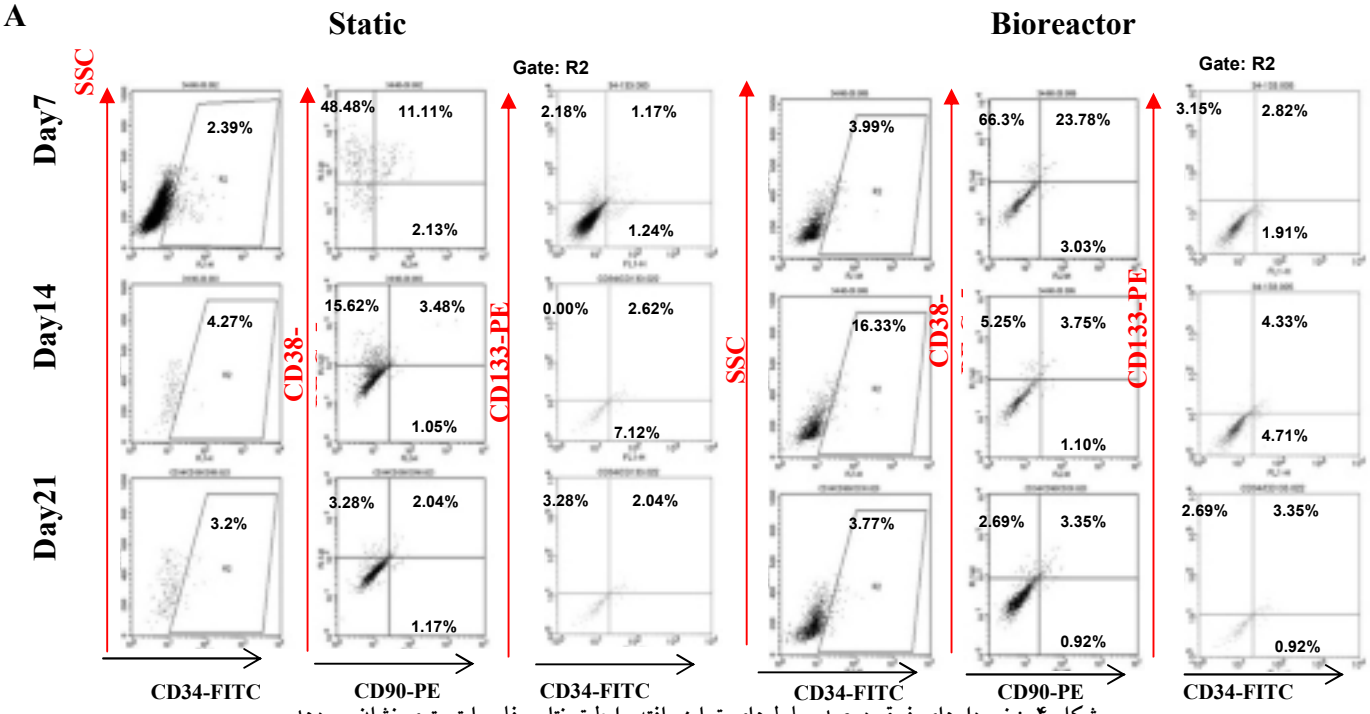
کلنی	میانگین ± انحراف معیار		p value
	استاتیک	سوسپانسیون	
CFU-GM	۱۶ ± ۳/۴۵	۲۱ ± ۲/۳۴	۰/۱۰
CFU-GMM	۱ ± ۰/۰۳	۱۰ ± ۴/۵	۰/۰۲
CFC	۱۷ ± ۳/۶۵	۳۰ ± ۲/۳	۰/۰۰۶۴

سلول‌های داخل بیوراکتور بیشتر از کشت استاتیک است($p\leq$ ۰/۰۱). در حالت کلی با افزایش مدت کشت به ۱۴ روز، در هر دو گروه پتانسیل کلنی‌زایی سلول‌های تحت کشت کاهش یافت و هم‌چنین در هر دو کشت، کلونی اریتروییدی مشاهده نشد($p\leq$ ۰/۰۳)(جدول ۱).

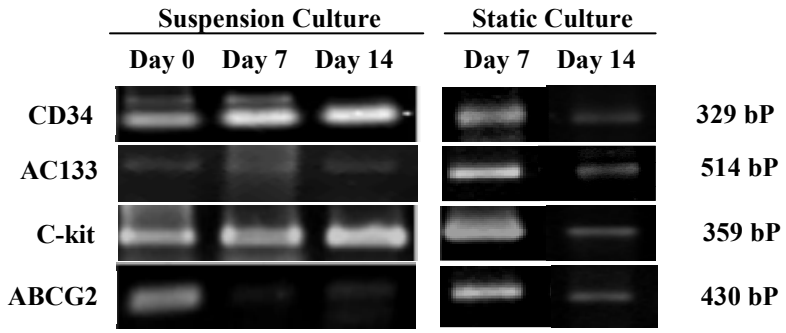
۲ـ بررسی فنوتیپ سلول‌های تک هسته‌ای کشت شده به دو روش استاتیک و بیوراکتور:

برای ارزیابی تمایز سلول‌ها به رده‌های میلوئیدی و لنفوئیدی، درصد سلول‌های 38^+، 90^-، $CD34^+$ و $CD133^+$، $CD34^+$ به ترتیب به عنوان شاخص‌های رده لنفوئیدی و میلوئیدی با دستگاه فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بیوراکتور سبب افزایش سلول‌های 38^+، 90^-، $CD34^+$ به نسبت ۱۱/۶ و ۱۵/۳ برابر در روزهای ۱۴ و ۲۱ گردید؛ در حالی‌که در کشت استاتیک، این افزایش ۴/۸ و ۲/۴ برابر بود. بر خلاف این گروه، جمعیت لنفوئیدی کاهش پیدا کردند که روند این کاهش در بیوراکتور بیشتر بود(شکل ۴).

جمعیت $CD133^+$، $CD34^+$، 38^+، 90^-، $CD34^+$ بعد از ۷ و ۱۴ روز، افزایش داشتند.



شکل ۴ : نمودارهای فوق درصد سلول‌های تمایز یافته را طبق نتایج فلوسایتومتری نشان می‌دهد.



شکل ۵: بیان ژن‌ها را در روزهای مختلف نشان می‌دهد. بر طبق آن بیان ژن‌های CD34 و C-kit تا روز چهاردهم در کشت سوسپانسیونی بیان بیشتری نسبت به کشت استاتیک نشان دادند.

بیان ژن در سلول‌های تک هسته‌ای کشت شده:

در سلول‌های تک هسته‌ای کشت شده به هر دو روش بیوراکتور و استاتیک، بیان ۴ ژن به نام‌های CD34 ، C-kit، ABCG2 و CD133 که مربوط به بنیادینگی سلول‌های خونی می‌باشند، با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

با بررسی این ژن‌ها، تاثیر مدت کشت بر سلول‌های بنیادی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از بیان ژن‌ها در روزهای ۷، ۳، ۰ و ۱۴ از کشت، نشان داد که بیان این ژن‌ها پس از ۱۴ روز، در کشت استاتیک کاهش یافت، اما در بیوراکتور تنها بیان ژن ABCG2 کاهش نشان داد. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از RT-PCR ، خواص بنیادینگی سلول‌های خونساز در کشت با بیوراکتور بهتر از حالت استاتیک حفظ می‌شوند(شکل ۵).

بحث

با توجه به تعداد کم سلول‌های بنیادی خونساز در یک واحد خون بند ناف، کشت و تکثیر این سلول‌ها در بیوراکتور به صورت وسیع و در مقادیر زیاد یکی از بهترین راه حل‌ها می‌باشد؛ و مطالعه‌هایی هم در این باره وجود دارد(۱۸-۱۶). هم چنین استفاده از انواع مختلف بیوراکتورها برای کشت انواع سلول‌ها در مطالعه‌های بسیاری گزارش شده است. از جمله آن‌ها به کار بردن بیوراکتور Rotating wall vessel ، Perfusion chamber ، Perfusion fixed bed و Stirred tank bioreactor بوده است(۲۳-۱۹). که از بین آن‌ها با توجه به ویژگی‌های سلول‌های بنیادی خونی و حساسیت آن‌ها به نظر می‌رسد که برای کشت این سلول‌ها، بیوراکتور سوسپانسیونی مناسب باشد(۲۴). چرا که در این نوع بیوراکتورها، کنترل اکسیژن و pH صورت می‌گیرد و فضای کافی و محیطی یکنواخت برای سلول فراهم می‌شود(۲۷-۲۵).

هم زن به کار رفته در بیوراکتورهای سوسپانسیونی، مغناطیسی با حرکت دوار می‌باشد اما در این مطالعه هم‌زن با حرکت رفت و برگشتی(بالا و پایین) با سرعت ۱ Hz انتخاب شده است که تاکنون مطالعه‌ای با این شرایط گزارش نشده است.

سلول‌های MNC به دلیل داشتن سلول‌های خونی پیش‌ساز و تمایز یافته، محیط را شبیه *in vivo* می‌سازند و به این ترتیب فاکتورهای رشد درونی را در محیط کشت خواهیم داشت که سبب تقویت تکثیر سلول‌های بنیادی مورد نظر می‌گردد(۲۸). با این فرض سلول‌های $CD34^+$ که نقش مهمی را در پیوند ایفا می‌کنند، توان تکثیر بیشتری خواهند یافت. در طی کشت ۱۴ روزه، هر چند که تعداد سلول‌های استاتیک بیشتر بود اما پتانسیل کلنی‌زایی و تعداد سلول‌های بنیادی خونی و بیان ژن‌های بنیادینگی در کشت استاتیک پایین‌تر بود. در مطالعه‌های قبلی تعداد سلول‌های حاصل بیشتر از این مطالعه بوده اما در بررسی‌های کیفی مانند سنجش کلنی، کیفیت پایین بوده که نشان از تمایز یافتن سلول‌ها در کشت می‌باشد(۲۹). در هفته دوم رشد سلول‌ها در بیوراکتور افزایش یافت در صورتی که این افزایش در کشت استاتیک در هفته اول اتفاق افتاد و در

ادامه دچار کاهش شد. شرایط pH و O_2 و shear استرس و هم چنین نوع هم‌زن انتخاب شده می‌تواند در روند تکثیر و تمایز تاثیرگذار باشد. هم‌زن با حرکت بالا و پایین رونده فشار هیدرودینامیکی به سلول‌ها وارد می‌کند که می‌تواند علت مرگ سلول‌های تمایز یافته باشد؛ سطح اکسیژن محلول در محیط کشت نیز قادر است سبب مرگ سلولی یا مهار رشد یا تمایز به سمت رده‌های نامطلوب گردد. در نهایت می‌توان ذکر کرد با این که میزان تکثیر در بیوراکتور کافی نبود اما سلول‌های $CD34^{+}90^{+}38^{-}$ در این سیستم افزایش یافت و سنجش کلنی نیز نتایج بهتری نسبت به کشت استاتیک نشان داد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه کشت سلول‌های تک هسته‌ای از خون بند ناف در بیوراکتور سوسپانسیونی هم‌زن‌دار در حضور سایتوکاین‌های مختلف انجام گرفت. با این روش انتظار می‌رود که سلول‌های پیش‌ساز خونی که مقاوم‌ترند، باقی مانده و تکثیر شوند، چون این سلول‌ها برای پیوند به بیماران بسیار ضروری هستند و نقش اصلی را در موفقیت پیوند خواهند داشت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات آقایان دکتر احمد وثوق معاون پشتیبانی و امور تخصصی پژوهشگاه رویان، دکتر حسین بهاروند مدیر گروه سلول‌های بنیادی و دکتر عبدالحسین شاهوردی معاون پژوهشی و آموزشی پژوهشگاه رویان که زمینه انجام این پروژه را در پژوهشگاه رویان فراهم کردند، کمال تشکر را داریم. هم چنین از آقای فاضل سامانی کارشناس آزمایشگاه فلوسیتومتری، خانم صمدیان کارشناس آزمایشگاه مولکولی و کارکنان بخش سلول درمانی رویان که در اجرای پروژه ما را یاری نمودند، سپاسگزاریم.

References:

1- Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. Stem Cells 1998; 16(3): 153-65.
2- Apperley JF. Umbilical cord blood progenitor cell transplantation. The International Conference Workshop on Cord Blood Transplantation, Indianapolis, November 1993. Bone Marrow Transplant 1994; 14(2): 187-96.
3- Rubinstein P. Why cord blood? Hum Immunol 2006; 67(6): 398-404.
4- Cohen Y, Kreiser D, Mayorov M, Nagler A. Unrelated and related cord blood banking and hematopoietic graft engineering. Cell Tissue Bank 2003; 4(1): 29-35.
5- Varadi G, Elchalal U, Brautbar C, Nagler A. Human umbilical cord blood for hematopoietic progenitor cells transplantation. Leuk Lymphoma 1995; 20(1-2): 51-8.
6- Petropoulou AD, Rocha V. Risk factors and options to improve engraftment in unrelated cord blood transplantation. Stem Cells Int 2011; 2011: 610514.
7- Sideri A, Neokleous N, Brunet De La Grange P, Guerton B, Le Bousse Kerdilles MC, Uzan G, *et al*. An overview of the progress on double umbilical cord blood transplantation. Haematologica 2011; 96(8): 1213-20.
8- Guerra-Marquez A, Novelo-Garza B, Malagón-Martínez A, Limon-Flores A, Luna-Bautista F, Juan-Shum L, *et al*. Cord blood banking and transplantation at the Mexican Institute of Social Security: the first 5 years. Transfusion 2011; 51(2): 328-32.
9- Brunstein CG, Laughlin MJ. Extending cord blood transplant to adults: dealing with problems and results overall. Semin Hematol 2010; 47(1): 86-96.
10- 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(2): 245-57.
11- Chisti Y, Moo-Young M. Bioreactors. In: Meyers RA, editor. Encyclopedia of Physical Science and Technology. New York: Academic Press; 2001. p. 247-51.
12- Rodrigues CA, Fernandes TG, Diogo MM, da Silva CL, Cabral JM. Stem cell cultivation in bioreactors. Biotechnol Adv 2011; 29(6): 815-29.
13- Andrade-Zaldívar H, Santos L, De León Rodríguez A. Expansion of human hematopoietic stem cells for transplantation: trends and perspectives. Cytotechnology 2008; 56(3): 151-60.
14- Yang S, Cai H, Jin H, Tan WS. Hematopoietic reconstitution of CD34+ cells grown in static and stirred culture systems in NOD/SCID mice. Biotechnol Lett 2008; 30(1): 61-5.
15- Zandstra PW, Eaves CJ, Piret JM. Expansion of hematopoietic progenitor cell populations in stirred suspension bioreactors of normal human bone marrow cells. Biotechnology (N Y) 1994; 12(9): 909-14.
16- da Silva CL, Gonçalves R, Lemos F, Lemos MA, Zanjani ED, Almeida-Porada G, *et al*. Modelling of *ex vivo* expansion/maintenance of hematopoietic stem cells. Bioprocess Biosyst Eng 2003; 25(6): 365-9.
17- Luni C, Zagallo M, Albania L, Piccoli M, Pozzobon M, De Coppi P, *et al*. Design of a stirred multiwell bioreactor for expansion of CD34(+) umbilical cord blood cells in hypoxic conditions. Biotechnol Prog 2011; 27(4): 1154-62.

18- Cormier JT, zur Nieden NI, Rancourt DE, Kallos MS. Expansion of undifferentiated murine embryonic stem cells as aggregates in suspension culture bioreactors. Tissue Eng 2006; 12(11): 3233-45.
19- Liu Y, Liu T, Fan X, Ma X, Cui Z. *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood in rotating wall vessel. J Biotechnol 2006; 124(3): 592-601.
20- Koller MR, Bender JG, Miller WM, Papoutsakis ET. Expansion of primitive human hematopoietic progenitors in a perfusion bioreactor system with IL-3, IL-6, and stem cell factor. Biotechnology (N Y) 1993; 11(3): 358-63.
21- Meissner P, Schröder B, Herfurth C, Biselli M. Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells. Cytotechnology 1999; 30(1-3): 227-34.
22- Collins PC, Miller WM, Papoutsakis ET. Stirred culture of peripheral and cord blood hematopoietic cells offers advantages over traditional static systems for clinically relevant applications. Biotechnol Bioeng 1998; 59(5): 534-43.
23- Zweigerdt R, Olmer R, Singh H, Haverich A, Martin U. Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture. Nat Protoc 2011; 6(5): 689-700.
24- Kwon J, Kim BS, Kim MJ, Park HW. Suspension culture of hematopoietic stem cells in stirred bioreactors. Biotechnol Lett 2003; 25(2): 179-82.
25- Bliem R, Konopitzky K, Katinger H. Industrial animal cell reactor systems: aspects of selection and evaluation. Adv Biochem Eng Biotechnol 1991; 44: 1-26.
26- Kowalczyk M, Waldron K, Kresnowati P, Danquah MK. Process challenges relating to hematopoietic stem cell cultivation in bioreactors. J Ind Microbiol Biotechnol 2011; 38(7): 761-7.
27- Rodrigues CA, Fernandes TG, Diogo MM, da Silva CL, Cabral JM. Stem cell cultivation in bioreactors. Biotechnol Adv 2011; 29(6): 815-29.
28- Koller MR, Emerson SG, Palsson BO. Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. Blood 1993; 82(2): 378-84.
29- Schroeder M, Niebruegge S, Werner A, Willbold E, Burg M, Ruediger M, *et al*. Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control. Biotechnol Bioeng 2005; 92(7): 920-33.

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2013; 10(2): 112-121

Original Article

Evaluation of expansion and differentiation of cord blood hematopoietic cells expanded in suspension bioreactor with vertical agitation

Shayan Asl N.[1], Ebrahimi M.[1,2], Beiki B.[2], Janzamin E.[1], Bani Ardalan P.[2]

[1]*Department of Regenerative Medicine at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran*
[2]*Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Umblical cord blood (UCB) hematopoietic stem cells having high cell counts are suitable candidates for benign and malignant disease transplantation but often UCBs have low counts. In this study, *ex vivo* expansion of these cells was performed using suspension bioreactor with vertical agitation.

Materials and Methods

UCB Mononuclear cells were cultured with 1.07×10^6 cells/ml density in total 206 ml of culture medium in the suspension bioreactor with vertical agitator; and the static group with same density was cultured in T-flasks for 14 days. At the days 0, 3, 7 and 14 of culture, sampling was performed for further analysis.

Results

During the 3 days of culture, differentiated cells were lost and then the number of cells increased again from 0.42×10^6 cells/ml up to 1.2×10^6 cells/ml and from 0.6×10^6 up to 2.9×10^6 in bioreactor and static culture, respectively. The percentage of $CD34^+$ cells and colony forming potential significantly increased in bioreactor.

Conclusions

Hematopoietic stem cells in the bioreactor while retaining their self-potential are expanded. However, due to the increasing shear stress in the environment, the total number of cells did not increase. Therefore, further studies are required.

Key words: Cord Blood, Hematopoietic Stem Cells, Bioreactors

Received: 20 May 2012
Accepted:19 Sep 2012

Correspondence: Ebrahimi M., PhD of Immunology. Assistant Professor of Department of Regenerative Biomedicine at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR. P.O.Box: 19395-4644, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 23562000; Fax: (+9821) 22413790
E-mail: *mebrahimi@royaninstitute.org*