

کشت سه بعدی سلول‌های CD_{34}^{+} خون بند ناف روی داربست DBM پوششی یافته با سلول‌های بنیادی سوماتیک نامحدود (USSC)

نادر وظیفه‌شیران^۱، مسعود سلیمانی^{۲*}، یوسف مرتضوی^۳، سعید کاویانی^۴، حسن ابوالقاسمی^۵، مهین نیکوگفتار^۵

۱- کارشناس ارشد، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

۴- استاد، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

۵- دانشجوی دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۱۲/۱۲

پذیرش مقاله: ۸۹/۰۶/۳۰

چکیده

هدف: پیوند سلول‌های بنیادی خون بند ناف اغلب به علت دوز پایین سلول‌های CD_{34}^{+} دارای محدودیت‌هایی در بالغین است. برای غلبه بر این محدودیت، می‌بایست این سلول‌ها قبل از پیوند مورد تکثیر و ترازد قرار بگیرند. در این تحقیق، برای هدف مذکور از هم کشتی سلول‌های CD_{34}^{+} با منبع جدیدی از سلول‌های استرومال مزانشیمی یعنی سلول‌های بنیادی سوماتیک غیرمحدود شده روی داربست DBM استفاده شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا سلول‌های بنیادی سوماتیک غیرمحدود شده خون بند ناف انسانی جداسازی و بعد از تشکیل کلونی از نظر ریخت‌شناسی و ایمونولوژیکی شناسایی و تأیید شدند. سپس سلول‌های خون‌ساز خون بند ناف CD_{34}^{+} نیز از خون بند ناف تخلیص و از طریق هم کشتی دو سه‌بعدی با سلول‌های مغذی سلول‌های بنیادی سوماتیک غیرمحدود شده تکثیر شدند. بعد از ۳ هفته تکثیر، تعداد مشخص و مناسبی از سلول‌ها برای بررسی و کنترل فعالیت کلونی‌زایی و حفظ سلول‌های خون‌ساز اولیه مورد تجزیه و تحلیل سنجش کلونی، سنجش LTC-IC و فلوسایتومتری قرار گرفتند.

نتایج: تکثیر برون‌تنی سلول‌های خون‌ساز خون بند ناف، زمانی که با سلول‌های استرومال بنیادی سوماتیک غیرمحدود شده در حضور سیتوکین‌های تریایدی در شرایط دو‌بعدی و سه‌بعدی مورد هم کشتی قرار می‌گیرند، به‌طور مشخصی افزایش می‌یابد، به‌طوری که تعداد کلی سلول‌ها بعد از ۳ هفته کشت در شرایط مختلف دو‌بعدی و سه‌بعدی دارای افزایش مداوم و نمایی بود ولی فعالیت کلونی‌زایی و حفظ سلول‌های خون‌ساز اولیه تا دو هفته پایدار بوده و بعد از آن روند کاهشی داشت. درصد سلول‌های CD_{34}^{+} نیز طی ۳ هفته هم کشتی، کاهش مداوم و نمایی داشت.

نتیجه‌گیری: این نتایج بیانگر آن است که سلول‌های بنیادی سوماتیک غیرمحدود شده با تولید سیتوکین‌های خون‌ساز، ماتریکس خارج سلولی، مولکول‌های اتصال و ایجاد برهم‌کنش بین سلولی می‌توانند به‌عنوان لایه مغذی و پشتیبان مناسب برای هم کشتی و ترازد سلول‌های پیش‌ساز خون‌ساز خون بند ناف استفاده شوند.

کلیدواژگان: هم کشتی سه‌بعدی، تکثیر و ترازد سلولی، سلول‌های بنیادی خون بند ناف، داربست DBM.

سلول‌های بنیادی سوماتیک غیرمحدود شده

۱- مقدمه

پیوند مغز استخوان، اصطلاح عامی است که برای توصیف جمع‌آوری و پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز به کار می‌رود، اما اخیراً با طرح این مطلب که خون محیطی و خون بند ناف (Umbilical Cord Blood: UCB) نیز می‌تواند برای تأمین سلول‌های بنیادی مفید باشد، اصطلاح پیوند سلول‌های بنیادی به‌عنوان نام کلی این فرایند ترجیح داده می‌شود. سلول‌های بنیادی UCB در اواخر دوران جنینی به علت مهاجرت سلول‌های خون‌ساز از کبد (محل خون‌سازی دوران جنینی) به سمت مغز استخوان (محل خون‌سازی دوره بعد از تولد) در خون محیطی جنین و UCB وارد می‌شوند، از این‌رو، UCB می‌تواند منبع سالم و ایمنی از سلول‌های سلول‌های پیش‌ساز خون‌ساز (Hematopoietic Progenitor Cells: HPCs) باشد [۱]، از مزایای آن می‌توان به سهولت تهیه و دسترسی بالا به آن، ریسک پایین نمونه‌برداری و فقدان خطر برای مادران اهدا کننده، پایین بودن خطر انتقال عفونت‌ها [به‌ویژه سیتومگالوویروس (Cytomegalovirus: CMV) و اپشتین-بار ویروس (Epstein-Bar Virus: EBV)]، پایین بودن تعداد سلول‌های T و آلوآنتی‌ژن‌ها (Alloantigens)، داشتن سلول‌های T باکره و ناکارآمدی با مخزن TCR (T Cell Receptor) پلی‌کلونال (Polyclonal) [و نه مونوکلونال (Monoclonal)]، حساسیت بالا به القای تحمل، عدم نیاز به سازگاری کامل HLA (Human leukocyte Antigen) بین دهنده و گیرنده، پایین بودن سطح پاسخ سلول‌های B و T، کاهش رد پیوند ایمونولوژیک، داشتن تعداد بالایی از HPCs، سرعت بالای تکثیر سلول‌های آن در مقایسه با همتهای خود در مغز استخوان (Bone Marrow) و در نتیجه پتانسیل پیوندپذیری بیشتر آن اشاره نمود [۲].

استفاده از UCB دارای معایبی نیز هست. منابع UCB اغلب در کیسه‌های مخصوص انجماد فریز شده و بعدها مورد استفاده قرار می‌گیرند و نمونه‌های تازه تخلیص شده آن کمتر

مورد استفاده بالینی قرار می‌گیرد که ذوب مجدد آن‌ها و حذف محیط مخصوص فریز از مشکلات کاربردی آن محسوب شده و اغلب با ازدست رفتن تعداد محسوسی از سلول‌ها همراه است. از سوی دیگر؛ گاهی در کاربرد بالینی نمونه ذوب شده به دلیل کم بودن سلول‌های پیش‌ساز، جزئی از آن برای تکثیر در محیط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته و مابقی آن دست نخورده به بدن گیرنده پیوند تزریق می‌شود که فقدان تجربه کافی در خصوص تکثیر و پیوند سلول‌های خون‌ساز UCB، گران‌قیمت بودن فاکتورهای رشد و وجود احتمال انتقال بیماری‌های ژنتیکی ناشناخته پس از تزریق UCB از دیگر معایب UCB محسوب می‌شود. آلودگی UCB با سلول‌های مادری طی جمع‌آوری خون، عدم دسترسی مجدد به اهدا کننده UCB، منبع محدود و غیر قابل تکرار اهدا، در برداشتن مقادیر نسبتاً زیادی از ترومبوسیت (Thrombocyte) و پیش‌سازهای هسته‌دار، تعداد کم سلول‌های بنیادی در هر واحد اهدایی که باعث طولانی بودن مدت جایگزینی، کاهش پیوندپذیری و بهبود میزان نوتروفیلی و پلاکتی و افزایش استعداد ابتلا به عفونت‌های فرصت‌طلب می‌شود، نیز از دیگر محدودیت‌های UCB محسوب می‌شود [۵، ۶].

همان‌طوری که اشاره شد، UCB در مقایسه با مغز استخوان بالغین، تعداد پیش‌سازهای خون‌ساز بیشتری دارد که پاسخ تکثیری و تعداد سلول‌های LTC-IC (Long Term Culture-Initiating Cell) بالایی را در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) و ظرفیت پیوند و نوسازی میلوپیدی و لنفوییدی بیشتری را در شرایط درون‌بدنی (In vivo) فراهم می‌آورد ولی ازسوی دیگر؛ تعداد کل سلول‌هایی که از UCB به‌دست می‌آید در مقایسه با نمونه مغزاستخوان و خون محیطی رهاسازی شده با Granulocyte Colony Stimulating Factor- G-CSF (Mobilized Peripheral Blood: G-CSF-MPB) در

سطح کمتری بوده و چون دوز ایده‌آل سلول‌های هسته‌دار برای تزریق به گیرنده $10^6 \times 3/7$ به ازای هر کیلوگرم است، بنابراین اغلب بیماران پیوند شده با UCB را کودکان تشکیل می‌دهند و در استفاده از UCB برای بالغین محدودیت وجود دارد [۱، ۴]. از این‌رو برای غلبه بر این مشکلات چندین راه کار ارایه شده است: ۱- پیوند همزمان چندین واحد UCB که با خطر افزایش آلوایمونیزاسیون (Alloimmunization) و بیماری پیوند علیه میزبان (Graft Versus Host Disease: GVHD) همراه است. ۲- تزریق همزمان سلول‌های UCB به همراه سلول‌های استرومال (Stromal Cells) مغز استخوان خود بیمار یا اهدا کننده دیگر که این روش به‌ویژه بعد از شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی با دوز بالا که باعث آسیب به سلول‌های استرومال مغز استخوان می‌شود، از اهمیت بیشتری برخوردار است. سلول‌های استرومال از طریق ایجاد میکرومحیط سه‌بعدی، تولید و ترشح ماتریکس خارج سلولی و فاکتورهای رشد و ایجاد برهم‌کنش سلولی و مولکولی نقش اساسی در حمایت از خون‌سازی، حفظ و بقای پیوند و کاهش دوره بهبود داشته و بدین ترتیب باعث افزایش فعالیت خون‌سازی و ایجاد سطح بالاتری از سلول‌های با فنوتیپ و ژنوتیپ دهنده در خون گیرنده می‌شوند. ۳- راه حل سوم تکثیر برون‌تن یا Ex vivo سلول‌های $CD34^+$ UCB و سپس تزریق محصول تکثیرشده به بدن گیرنده است که در این تحقیق از روش مذکور استفاده شده است. تکثیر پیش از پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز باعث رسیدن تعداد سلول‌ها به دوز مناسب بالغین شده و بدین ترتیب محدودیت استفاده از UCB برای پیوند بالغین را از بین می‌برد که البته در این زمینه نیز چندین برنامه وجود دارد: الف- روش‌های کشت معمولی دوبعدی با یا بدون سیتوکین‌های اگزوژن (Exogenous) ب- روش‌های هم کشتی با سلول‌های استرومال با یا بدون سیتوکین‌های اگزوژن که این برنامه خود از چهار سیستم تشکیل می‌شود: ۱- سیستم کشت دکستر (Dexter Culture) در فلاسک‌های دوبعدی و روی سلول‌های استرومال مغز استخوان در حضور هیدروکورتیزون

(Hydrocortizone) و سرم اسبی، ۲- سیستم کشت با افزودن ترکیبی از سیتوکین‌های عامل در مرحله ابتدایی [FMS- FLT-3) (3) like tyrosine kinase SCF (Stem Cell Factor) TPO (Thrombopoietin)] و سیتوکین‌های تکثیر دهنده (ایترلوکین-۳ (Interleukin-3: IL-3)، EPO (Erythropoietin)، ... به محیط حاوی سلول‌های استرومال ۳- سیستم کشت جدا شده با غشای تراوا (Membrane Separated Coculture) و ۴- سیستم هم کشتی سه‌بعدی [۸، ۲۳] که در این تحقیق، از روش هم کشتی سه‌بعدی استفاده شده است.

تماس بین سلول‌های استرومال و خون‌ساز در سیستم کشت دکستر دوبعدی بوده، حال آن‌که تماس درون‌بدنی آن‌ها در مغز استخوان در یک ساختمان و پیکربندی سه‌بعدی صورت می‌گیرد که این امر می‌تواند یکی از دلایل ممکن برای خون‌سازی غیرطبیعی در سیستم کشت دکستر باشد. در این مطالعه هدف از تکثیر در شرایط کشت سه‌بعدی، افزایش نسبت سطح به حجم لایه مغذی سلول‌های استرومال، افزایش تأثیر سلول‌های استرومال در واحد حجم و تقلید شرایط فیزیکی، سلولی و میکرومحیط موجود در بدن بود. همچنین برای نزدیک‌تر کردن شرایط برون‌تنی به شرایط درون‌بدنی و امکان استفاده بالینی، از یک طرف از محیط کشت فاقد سرم و از طرفی دیگر از داربست (Demineralized Bone Matrix) DBM (تولید شده در مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی ایران) با منشأ استخوان انسانی و سلول استرومال بنیادی سوماتیک غیرمحدود شده (Unrestricted Somatic Stem Cells: USSC) با منشأ UCB انسان استفاده شد تا هرگونه شرایط با محدودیت اخلاقی از شرایط برون‌تنی مورد مطالعه حذف شود. بدین ترتیب اهداف این مطالعه شامل موارد زیر بود:

- ۱- تکثیر و افزایش تعداد سلول‌های $CD34^+$ UCB
- ۲- استفاده همزمان از سلول‌های استرومال به‌عنوان سلول‌های پشتیبان خون‌ساز
- ۳- عدم استفاده از فاکتورهای خون‌ساز اگزوژن گران‌قیمت
- ۴- تقلید شرایط سه‌بعدی مغز استخوان در محیط کشت برون‌تنی

۲- مواد و روشها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه

UCB طی زایمان طبیعی با سیستم بسته جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از اخذ فرم دریافت رضایت تحقیق از مادران بخش زایمان، به میزان متوسط ۸۰-۱۵۰ میلی‌لیتر در کیسه‌های اهدای خون جمع‌آوری شد که البته قبل از نمونه‌گیری می‌بایست حجم اولیه ماده ضد انعقاد درون کیسه (۶۳ سی‌سی برای حدود ۴۵۰ سی‌سی خون به نسبت ۱ به ۷) برای این مقدار تنظیم شود (۲۰-۲۹ سی‌سی از ماده ضد انعقاد مانده و حدود ۳۵ سی‌سی آن حذف می‌شود). جمع‌آوری نمونه UCB در بیمارستان شریعتی تهران به صورت روزمره برای ذخیره‌سازی در بانک سلول‌های بنیادی بند ناف انجام می‌گیرد که استاندارد این مرکز برای ذخیره‌سازی برای مصارف بالینی و پیوند آلونژیک (Allogenic)، حجم بالای ۸۰ میلی‌لیتر به شرط شمارش سلولی بالای $10^7 \times 35$ لکوسیت در هر کیسه است که در این مطالعه نمونه‌هایی که با این دو معیار مطابقت نداشت، بعد از کسب اجازه کتبی از مرکز، برای به‌کارگیری در تحقیقات زیر استفاده شد.

۲-۲- تخلیص سلولی و استحصال سلول‌های USSC

برای این منظور ۱۶ نمونه UCB تهیه و بعد از تعیین حجم و تعداد لکوسیت‌ها، سلول‌های تک هسته‌ای آن‌ها با استفاده از فایکول (Ficol) (با چگالی ۱/۰۷۷ گرم در هر مترمکعب) جداسازی و شمارش شد. سلول‌های تک هسته‌ای ۱۰ نمونه که شمارش پایین‌تری داشتند، بدون استفاده برای تخلیص سلول‌های $CD34^+$ به مدت ۱۴-۲۸ روز برای جداسازی و استخراج سلول‌های USSC در محیط کشت مخصوص [محیط -DMEM Low glucose با ۳۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum)، 10^{-7} مول دگزامتازون (Dexamethasone) و ۲ میلی‌مول اولترالگوتامین (Ultralglutamine)] و در فلاسک‌های بزرگ T75 کشت داده شدند (در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2

۵ درصد و رطوبت بالا) تا رشد کلونی سلول‌های چسبنده USSC آغاز شود. سلول‌های تک هسته‌ای ۵ نمونه که شمارش مطلوبی داشتند، برای تخلیص سلول‌های $CD34^+$ با استفاده از ستون MACS، استفاده شدند. همزمان بعد از تخلیص سلول‌های $CD34^+$ ، تعداد آن‌ها شمارش و درصدشان محاسبه شد و 10^3 سلول از آن برای بررسی سنجش کلونی (Colony assay) و سنجش LTC-IC (LTC-IC assay) در محیط کشت اختصاصی کشت داده شد (روز صفر). مشخصات مربوط به نمونه‌های جمع‌آوری شده و مشخصات سلولی آن‌ها در جدول ۱ آمده شده است. سپس سلول‌های $CD34^+$ حاصل از پسماند تخلیص آن‌ها برای جداسازی و استخراج سلول‌های USSC در شرایط مشابه فوق کشت داده شدند. تعویض محیط کشت و بررسی فلاسک از نظر تشکیل کلونی سلول‌های USSC هر هفته ۲ بار بسته به رنگ محیط کشت صورت گرفت. بعد از رشد کلونی‌ها (شکل ۱ و ۲) و یک‌بار پاساژ با محیط مشابه، برای پاساژهای بعدی سلول‌ها از همان محیط کشت اختصاصی ولی بدون دگزامتازون استفاده شد. بدین ترتیب طی چندین پاساژ، ۵ تا ۶ فلاسک سلولی از سلول‌های استرومال USSC تکثیر شد. لازم به ذکر است که استفاده از دگزامتازون با غلظت بالا و DMEM-high glucose می‌تواند باعث تمایز سلول‌های USSC به سمت سلول‌های استخوانی شود که در این مطالعه رنگ‌آمیزی منفی قرمز آلزارین (Alizarin Red)، عدم تمایز آن را تأیید نمود.

چهار عدد از فلاسک‌های کشت حاوی سلول‌های چسبنده USSC که به تراکم ۸۰ درصد رسیده و عمده سطح فلاسک را پر کرده بودند، انتخاب شده و پس از تخلیه محیط کشت و شستشوی آن‌ها با بافر PBS (Phosphate Buffered Saline)، سلول‌ها به وسیله تریپسین ۰/۲۵ درصد از کف فلاسک جدا شده و با پیپت نمودن ملایم به صورت سوسپانسیون در آمدند. سپس با افزودن چند میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM-FBS ۱۰ درصد اثر تریپسین خنثی شد. سپس مقداری از آن برداشته و شمارش شد و تعداد کلی سلول‌ها در حجم مورد نظر

به‌دست آمد و سپس مراحل زیر انجام شد:

آزمون‌های انجام شده روی نمونه سلول‌های USSC جداسازی شده:

۱- ایمونوفنوتایپ تأییدی با روش فلوسایتومتری

۲- کشت سلول‌های USSC روی لامل و انجام رنگ‌آمیزی‌های رایت-گیمسا (Wright-Giemsa) و آلزارین قرمز

۳- کشت سلول‌های USSC روی داربست DBM به‌عنوان لایه مغذی و پوشاننده سطح سه‌بعدی و عکس‌برداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscope: SEM) از آن‌ها

۴- کشت سلول‌های USSC روی چاهک‌های ۴۸ تایی به‌عنوان لایه مغذی و پوشاننده سطح دو‌بعدی

۵- غیرفعال‌سازی آن‌ها با میتومايسين C (Mitomycin) برای هم‌کشتی با سلول‌های خون‌ساز CD_{34}^{+}

۶- هم‌کشتی سلول‌های USSC با سلول‌های خون‌ساز CD_{34}^{+} در حضور سیتوکین‌های تراییدی، روی چاهک‌های ۴۸ تایی با و بدون داربست DBM (به‌عنوان لایه مغذی و

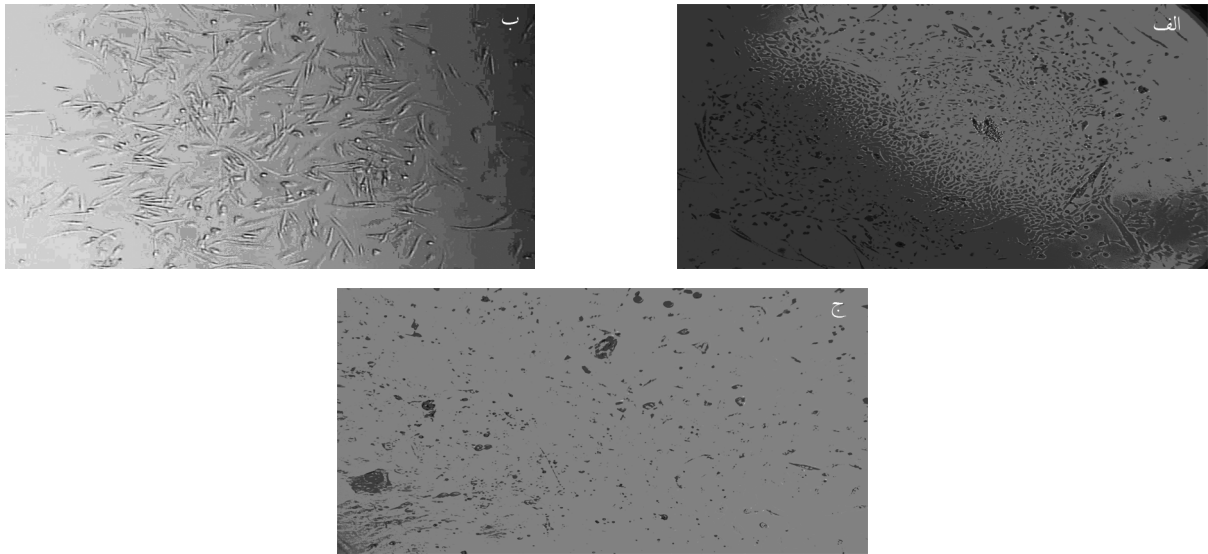
پوشاننده سطح دو‌بعدی و سه‌بعدی)

در این تحقیق سه نوع سلول استفاده شده است: ۱- سلول‌های بنیادی خون‌ساز CD_{34}^{+} تخلیص شده از UCB برای ترایید سلولی ۲- سلول‌های استرومال USSC استحصال شده از UCB برای استفاده به‌عنوان لایه پشتیبان و مغذی ۳- سلول‌های رده استرومال مغز استخوان موشی M2-10B4 برای استفاده در LTC-IC

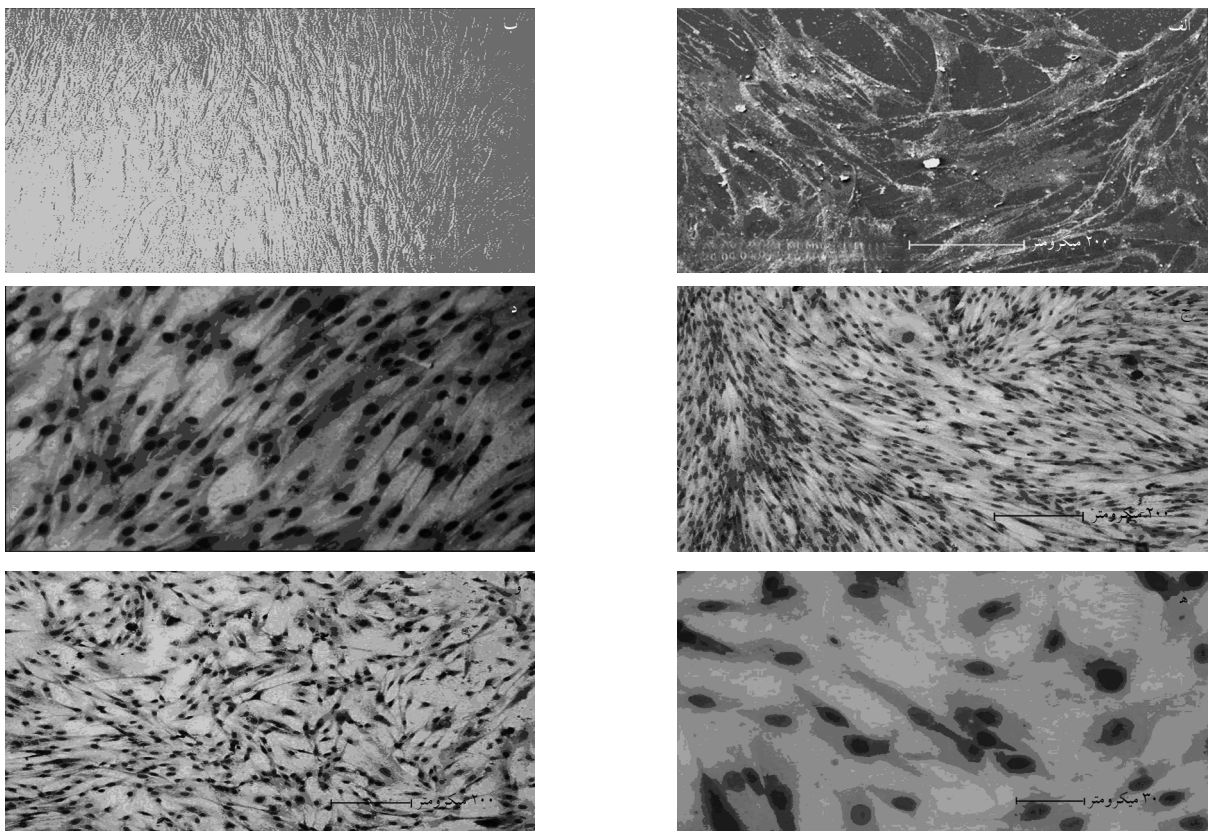
سلول‌های CD_{34}^{+} و USSC با برنامه‌های استاندارد از UCB جداسازی شد. سپس رده سلولی M2-10B4 نیز از مرکز پیوند بیمارستان شریعتی تهیه (با تشکر از آقای دکتر کامران علی‌مقدم) و طبق برنامه مشخص شده در سایت www.ATCC.org پاساژ، تکثیر و فریز شد. براساس بسیاری از تحقیقات از جمله ساترلند (Sutherland) و همکارانش، این رده سلولی می‌تواند به‌عنوان سلول معادل سلول‌های استرومال مغز استخوان انسان برای حمایت از خون‌سازی سلول‌های بنیادی خون‌ساز اولیه در سنجش LTC-IC مورد استفاده قرار بگیرد [۳، ۱۹].

جدول ۱ تعداد و حجم نمونه، تعداد سلول‌های هسته‌دار، درصد سلول‌های CD_{34}^{+} و نتیجه سنجش کلونی ۵ مورد از نمونه‌های گرفته شده از بیمارستان شریعتی؛ ۱۰ مورد از مواردی که از ابتدا حجم و شمارش لکوسیتهی پایین یا زایمان غیرطبیعی داشتند یا مربوط به حالت دوقلو بودند، فقط برای به‌دست آوردن سلول‌های USSC به‌کار رفت و ۵ مورد مطلوب باقی‌مانده برای تخلیص سلول‌های CD_{34}^{+} با ستون MACS، طبق برنامه استاندارد شرکت سازنده جداسازی، شمارش و سنجش کلونی شد.

نوع زایمان	حجم نمونه (میلی لیتر)	تعداد سلول‌های NC	درصد CD_{34}^{+}	تعداد کلونی به ازای هر ۱۰۰۰ سلول
طبیعی	نمونه ۱	۷۶	۳۴×۱۰ ^۶	-
طبیعی	نمونه ۲	۶۱	۳۱×۱۰ ^۶	۲۷
قل ۱/ سزارین	نمونه ۳	۶۸	۲۰×۱۰ ^۶	-
قل ۲/ سزارین	نمونه ۴	۷۶	۳۲×۱۰ ^۶	-
طبیعی	نمونه ۵	۸۴	۴۴×۱۰ ^۶	۱۹
طبیعی	نمونه ۶	۷۸	۳۳×۱۰ ^۶	۲۲
طبیعی	نمونه ۷	۷۹	۵۴×۱۰ ^۶	۱۶
طبیعی	نمونه ۸	۸۳	۲۷×۱۰ ^۶	-
طبیعی	نمونه ۹	۷۶	۴۱×۱۰ ^۶	۲۳



شکل ۱ تشکیل کلونی‌های اولیه USSC در محیط کشت اختصاصی بعد از ۲ هفته از آغاز کشت (بزرگنمایی: الف) $10\times$ ، ب، ج) $40\times$ ؛ این سلول‌ها چسبنده و مشابه سلول‌های فیبروبلاست بوده و قدرت تکثیر و اتصال بالایی دارند.

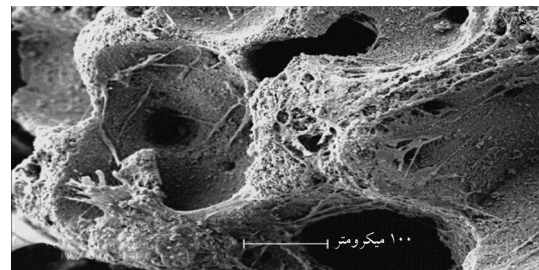
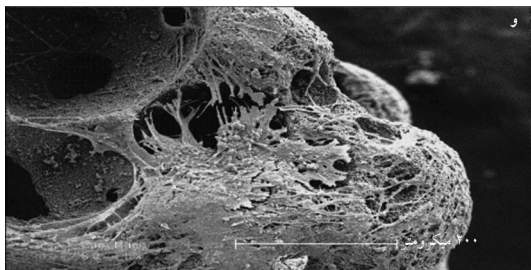
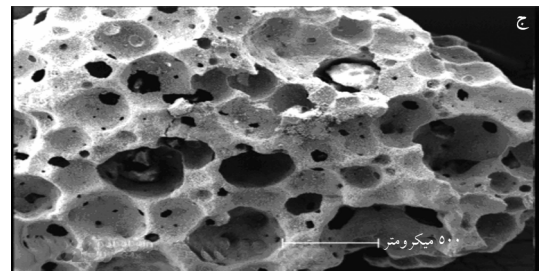
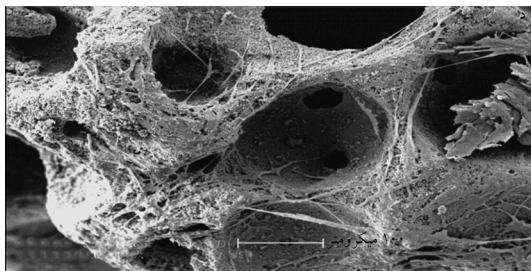
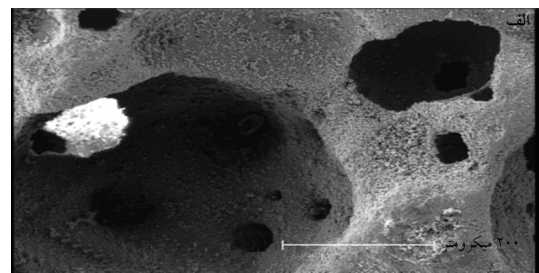
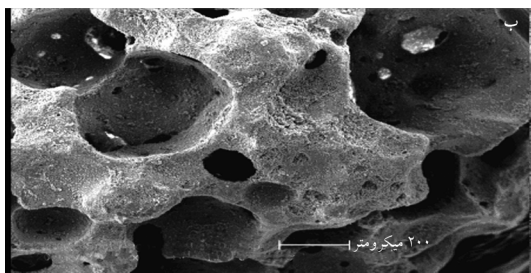


شکل ۲ رنگ‌آمیزی رایت-گیمسا از سلول‌های USSC در روزهای مختلف با سطح تلاقی ۴۰ درصد و ۸۰ درصد با مقیاس‌های مختلف؛ الف) تصویر SEM از سلول‌های USSC پوشش داده شده روی لامل، ب) تصاویر غیر رنگ شده با تلاقی ۸۰ درصد از چاهک حاوی سلول (بزرگنمایی: $10\times$)، ج-و) تصاویر رنگ شده از سلول‌ها با عدسی‌های $50\times$ ، $10\times$ ، $40\times$ که سلول‌هایی با سیتوپلاسم شفاف، بدون گرانول، دوکی شکل، موازی و چسبنده را نشان می‌دهد.

۲-۳- داربست DBM

داربست یا اسکافولد (DBM Scaffold)، یک ماتریکس استخوانی سه‌بعدی نامنظم، متخلخل، سازگار با زیست و تخلیه شده از مواد معدنی و بر پایه پروتئینی است که از منبع استخوان انسانی تهیه می‌شود. عمده محتوای تشکیل دهنده آن کلاژن I و مخلوطی طبیعی از فاکتورهای رشد است. در این مطالعه، داربست‌ها در شکل کروی نامنظم و به صورت متخلخل و با قطر ۱-۵ میلی‌متر استفاده شد (شکل ۳). این قطعات کروی در تعداد بالا و حالت چند لایه‌ای، ساختار هندسی و توپوگرافی سه‌بعدی جدیدی به خود می‌گیرد که در صورت پوشش داده شدن با سلول‌های چسبنده استرومال، می‌تواند نسبت سطح به واحد حجم را در مقایسه با حالت دوبعدی ساده دکستر افزایش داده و تا حدودی میکرومحیط سه‌بعدی مغز استخوان را تقلید کند؛ چرا که تعداد بالای سلول‌های استرومال

USSC در کنار ساختار استخوانی، متخلخل و سه‌بعدی DBM می‌تواند شرایط محدودی از اتصالات و علائم (Signals) بین سلولی، تولید فاکتورهای رشد و ماتریکس خارج سلولی و غلظت کانونی از فاکتورهای رشد اتوکرین و پاراکرین (Autocrin paracrine) را فراهم سازد. این داربست در مقایسه با استخوان‌های اسفنجی که به علت تخلخل بالا، سطحی برابر با ۸۰ سانتی‌متر مربع در هر گرم دارد، از سطح محدودتری (۳۵-۴۰ سانتی‌متر مربع در هر گرم) برخوردار است که البته به دلیل نبود سیستم درجریان (Perfusion) و فشار شار و بسیاری دیگر از عوامل مشخص و مجهول در سیستم کشت معمولی، تقسیم و پوشش سلول‌های استرومال به ندرت به درون حفرات داربست گسترش پیدا کرده و فقط محدود به نقاط سطحی داربست می‌شود که در تصویر میکروسکوپ SEM به وضوح مشهود است (شکل ۳).



شکل ۳ الف-ج) تصویر میکروسکوپ SEM از داربست خالی DBM که به صورت سیاه-سفید و در مقیاس‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۵۰۰ برابر تصویربرداری است. حفرات با تخلخل ۳۰-۴۰ درصد در این نوع داربست مشهود است. د-و) تصویر SEM از همان داربست که با سلول‌های USSC پوشش داده شده است. همان‌طور که مشهود است سلول‌ها به دلیل نبود سیستم در جریان و نیروی شار فقط در قسمت‌های سطحی داربست تکثیر یافته و به ندرت به درون حفرات گسترش پیدا کردند و بنابراین نتوانسته‌اند سطح تلاقی بسیار بالایی را ایجاد کنند.

۲-۴- کشت سلول‌های USSC روی داربست DBM

به‌عنوان لایه مغذی و پوشاننده سطح سه‌بعدی

سوسپانسیون سلولی حاصل از ۳ فلاسک به لوله فالكون ۱۵ منتقل شده و با سرعت ۳۰۰ g در هر دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی دفع و به رسوب سلولی ۲ میلی‌لیتر بافر PBS اضافه و سوسپانسیون غلیظی به‌دست آمد که حدود ۶۰ داربست کروی DBM به آن اضافه و تا ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. هر ۱۰ دقیقه لوله محتوی سلول و DBM را به آرامی تکان داده تا مجدداً سلول‌های رسوب کرده در ته لوله معلق شوند. طی این مدت درصدی از سلول‌ها به داربست می‌چسبند. سپس داربست‌ها به آرامی به ۹ چاهک از پلیت ۴۸ تایی منتقل و تا ۱۲ ساعت در انکوباتور ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و انکوبه شدند. همزمان مقداری از سلول‌ها نیز معلق شده و به تعداد ۲×۱۰^۴ در هر میلی‌لیتر به ۲۷ چاهک از پلیت ۴۸ تایی منتقل شدند. در این مدت سلول‌های چسبیده به داربست، اتصالات خود را محکم‌تر کرده و در سطح داربست پهن می‌شوند و سلول‌هایی که به داربست نچسبیده‌اند، در کف چاهک رسوب کرده و از بقیه جدا می‌شوند. سلول‌های اضافه شده به چاهک‌ها نیز به کف آن می‌چسبند. بعد از یک شب که سلول‌ها کاملاً به کف ظرف و داربست متصل شدند، داربست‌ها از چاهک اولیه درآورده شده و به چاهک‌های پوشش داده شده با سلول‌ها اضافه شد و تا سه روز در انکوباتور ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا سلول‌های چسبیده تقسیم شده و تا ۸۰ درصد از سطح چاهک را پر کنند و در عین حال روی داربست نیز تقسیم شده و سطح بیشتری از آن را اشغال کنند. بعد از مدت مذکور، چند تکه از داربست‌ها برداشته شد و برای بررسی چسبندگی سلول‌ها و بررسی سطح سلولی پوشش داده شده با سلول‌ها به آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی (واحد SEM دانشگاه تربیت مدرس) ارسال شد و بقیه آن‌ها برای غیرفعال‌سازی با میتومایسین طبق برنامه استاندارد، به اتاق کشت منتقل شد. برای هم کشتی سلول‌ها با لایه پشتیبان ابتدا

باید فعالیت میتوزی لایه پشتیبان متوقف شود. میتومایسین C با اتصال متقاطع به DNA باعث ممانعت از تکثیر سلول در عین حفظ عملکرد این سلول‌ها می‌شود. در این مطالعه به‌جای اشعه گاما از میتومایسین C استفاده شده است؛ چرا که وجود داربست‌های استخوانی DBM باعث ایجاد نقاط کور و سایه در سطوح زیرین داربست در مقابل اشعه گاما شده و مانع از غیرفعال‌سازی کل سلول‌های استرومال می‌شود. تعداد ۲۰۰۰ سلول CD₃₄⁺ با خلوص ۹۵±۵ درصد که از UCB جدا شده بودند، در شرایط زیر به پلیت‌های کشت پوشش یافته و پوشش نیافته با سلول‌های غیرفعال USSC اضافه شد (شکل ۳).

الف- حالت اول اضافه کردن سیتوکین ها (3cyto)

۹ چاهک خالی (بدون لایه تغذیه کننده و بدون داربست و توأم با سیتوکین‌ها)، به مدت ۳ هفته و برای هر هفته به‌صورت سه بار تکرار

ب- حالت دوم سلول‌های لایه تغذیه کننده (USSC Feeder)

۹ چاهک پوشش داده شده با سلول‌های USSC غیرفعال شده (همراه لایه تغذیه کننده ولی بدون داربست) و بدون سیتوکین

ج- حالت سوم USSC Feeder +3cyto

۹ چاهک پوشش داده شده با سلول‌های USSC غیرفعال شده (همراه لایه تغذیه کننده ولی بدون داربست) و همراه با سیتوکین‌ها

د- حالت چهارم USSC Feeder+3cyto+DBM

۹ چاهک پوشش داده شده با سلول‌های USSC غیرفعال شده و توأم با دولایه از داربست‌های DBM پوشش داده شده با سلول‌های USSC غیرفعال شده (توأم با لایه تغذیه کننده، سیتوکین و داربست)

هر هفته سلول‌های سه چاهک مربوط به آن هفته، در هر ۴ حالت، برداشت شده و بعد از شمارش، میانگین آن‌ها محاسبه شد. برای برداشت سلول‌ها، ابتدا با یک پیپت نمودن ملایم سلول‌های معلق و شل برداشت شد و سپس با رقت ۱ به ۵ تریپسین ۰/۰۲۵ درصد، سلول‌های چسبیده از هم جدا شده و برداشت شدند. برای جلوگیری از ادغام سلول‌های USSC با سلول‌های CD₃₄⁺، سوسپانسیون برداشت شده تا ۳۰-۶۰ دقیقه

در شرایط کشت انکوبه شد تا سلول‌های استرومال مجدداً به کف پلیت چسبیده و از سلول‌های خون‌ساز جدا شوند.

۲-۳- جداسازی، تکثیر و تعیین خصوصیات

سلول‌های USSC

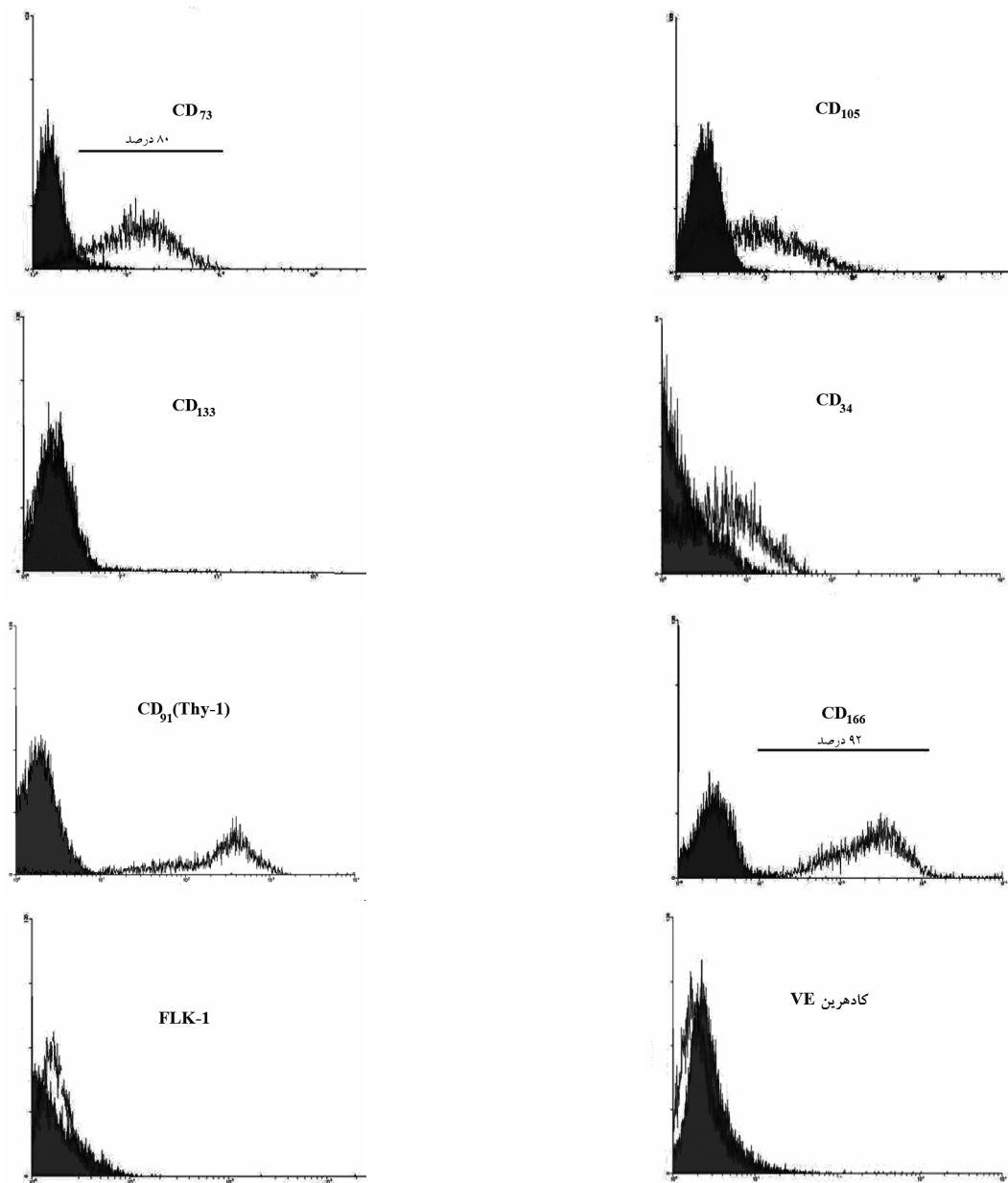
کشت سلول‌های USSC از ۱۵ نمونه UCB آغاز شد که ۵ مورد از آن‌ها شامل سلول‌های تخلیه شده از سلول‌های CD_{34}^{+} بود. در مجموع سلول‌های USSC از ۴ نمونه به‌دست آمدند که سه مورد مربوط به سلول‌های تک هسته‌ای تام و یک مورد مربوط به سلول‌های تک هسته‌ای CD_{34}^{-} تخلیه شده بود. بعد از ۲-۳ هفته کشت در محیط کشت اختصاصی، در هرکدام از فلاسک‌های USSC استحصال شده، به‌طور متوسط ۲-۹ کلونی سلول‌های USSC تشکیل شده بودند که به‌صورت تک لایه تکثیر پیدا کرده بودند (شکل ۱). کلونی‌های مذکور بعد از شستشو و حذف دیگر سلول‌های مازاد به‌طور روزمره ۳-۴ بار پاساژ داده شدند تا سلول‌هایی خالص‌تر به‌دست آمده و در عین حال گلبول‌های قرمز و پلاکت‌های چسبیده به کف پلیت از بین بروند. سلول‌های USSC در پاساژهای اولیه کوچک، نامنظم با کشیدگی اندک بودند که با افزایش دفعات پاساژ به مرور بزرگ‌تر و کشیده‌تر شده و شکل دوکی فیروبیلاست ماندی را به خود گرفتند (شکل ۲). محیط کشت مورد استفاده تا زمان به‌دست آوردن کلنی‌های USSC، محیط کشت اختصاصی آن یعنی محیط DMEM-Low glucose با FBS ۱۰ درصد، 10^{-7} مول دگزامتازون و ۲ میلی‌مول اولترالگوتامین بود ولی بعد از آن برای حفظ و نگهداری و پاساژ سلول‌ها از محیط DMEM-Low glucose با FBS ۱۰ درصد، استفاده شد. سلول‌های USSC بعد از تشکیل کلنی مورد ارزیابی فلوسایتومتری قرار گرفتند که این سلول‌ها نسبت به CD_{166} ، CD_{73} ، CD_{105} ، CD_{90} ، CD_{44} مثبت، نسبت به KDR (Fetal FLK-1) (Kinase insert Domain Receptor) [Liver Kinase 1] بیان مثبت ضعیف و نسبت به CD_{117} ، CD_{34} ، کاده‌رین V (Cadherin V) منفی بودند (نمودار ۱).

۳- نتایج

۱-۳- بررسی نتایج حاصل از جداسازی

سلول‌های CD_{34}^{+}

در هر نمونه UCB به‌طور متوسط $10^6 \times 10^3 \pm 10^3/10^3$ سلول هسته‌دار (لکوسیت) شمارش شد. از ۵ مورد از نمونه‌هایی که شمارش لکوسیتی مطلوبی داشت، لام خون محیطی تهیه و درصد و تعداد مطلق سلول‌های تک هسته‌ای آن‌ها محاسبه شد. از هر نمونه به‌طور متوسط ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلیون سلول تک هسته‌ای (Mononuclear Cell: MNC) جدا شد. میزان سلول‌های تک هسته‌ای زنده پس از رنگ‌آمیزی با تریپان بلو (Trypan blue) و شمارش آن‌ها با استفاده از لام نئوبار، حدود ۹۷ درصد بود. برای جداسازی سلول‌های CD_{34}^{+} از سیستم MACS استفاده شد تا حداکثر خلوص سلولی حاصل شود. نوع ستون نیز براساس تعداد اولیه سلول‌های تک هسته‌ای انتخاب شد. بعد از فرایند تخلیص سلولی، سلول‌ها شستشو و شمارش شدند. درصد سلول‌های زنده شده تعیین و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی که حاوی حداقل $10^4 \times 20$ سلول بود، برای بررسی میزان خلوص به آزمایشگاه فلوسایتومتری بیمارستان شریعتی منتقل شد. سلول‌ها بعد از اتصال با آنتی‌بادی CD_{34} (R-Phycoerythrin: RPE) موشی (کنترل منفی) و انسانی برای بررسی به دستگاه فلوسیتومتری منتقل شدند. پس از انجام فلوسایتومتری با CD_{34} ، حدود ۹۷ درصد سلول‌های جدا شده از UCB، نشانگر (Marker) CD_{34} را بر سطح خود بروز می‌دادند. پس از جداسازی سلول‌های CD_{34}^{+} از نمونه‌های مطلوب، به‌طور متوسط، $10^3 \times 806$ سلول CD_{34}^{+} به ازای هر نمونه جدا شد که میزان سلول‌های CD_{34}^{+} زنده، پس از رنگ‌آمیزی تریپان بلو و با



نمودار ۱ ایمونوفوتوپ سلول‌های USSC؛ نمودار کنترل منفی و نمودار آزمون مورد بررسی از طریق نرم‌افزار درکنار یکدیگر آمده است. این سلول‌ها نسبت به CD_{166} ، CD_{73} ، CD_{105} ، CD_{90} ، CD_{44} مثبت، نسبت به KDR (FLK-1) بیان مثبت ضعیف و برای CD_{117} ، CD_{34} ، کادهرین V منفی هستند.

مهارت محسوسی برای ترزاید سلول‌ها در حالات مختلف وجود نداشت. بعد از ۳ هفته، حداکثر ترزاید در حالت USSC+3Cyto+DBM (به‌طور متوسط $489/89$ برابر) و حداقل ترزاید در حالت USSC (به‌طور متوسط $125/71$ برابر) دیده شد (جدول ۲، شکل ۴ و نمودار ۲). تعداد کلی سلول‌ها

۳-۳- کیتیک و نتایج حاصل از تکثیر برون‌تنی

سلول‌های بنیادی UCB در شرایط مختلف چهارگانه

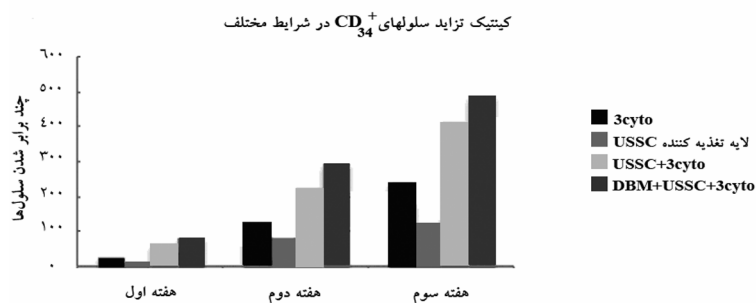
شمارش کلی سلول‌ها و ترزاید سلول‌ها طی مدت سه هفته در همه حالات کشت به‌صورت نمایی افزایش داشت و آثار

روی لایه سلول‌های USSC افزایش داشت که این افزایش در حالت سه‌بعدی USSC+DBM+3cyto محسوس‌تر بوده و در هفته اول ۱/۳۱ برابر (۸۳/۲۶) برابر در مقابل ۶۳/۴۴ برابر (اولیه سلول، $P < 0.05$)، در هفته دوم ۱/۳۳ برابر (۲۹۶/۵۲) برابر (اولیه سلول، $P < 0.05$) برابر ۲۲۲/۱۵ برابر تعداد اولیه سلول، و در هفته سوم ۱/۱۸ برابر بیشتر از حالت دوبعدی USSC+3Cyto بود (۴۸۹/۸۹) برابر در مقابل ۴۱۴/۷۵ برابر تعداد اولیه سلول، ($P < 0.05$).

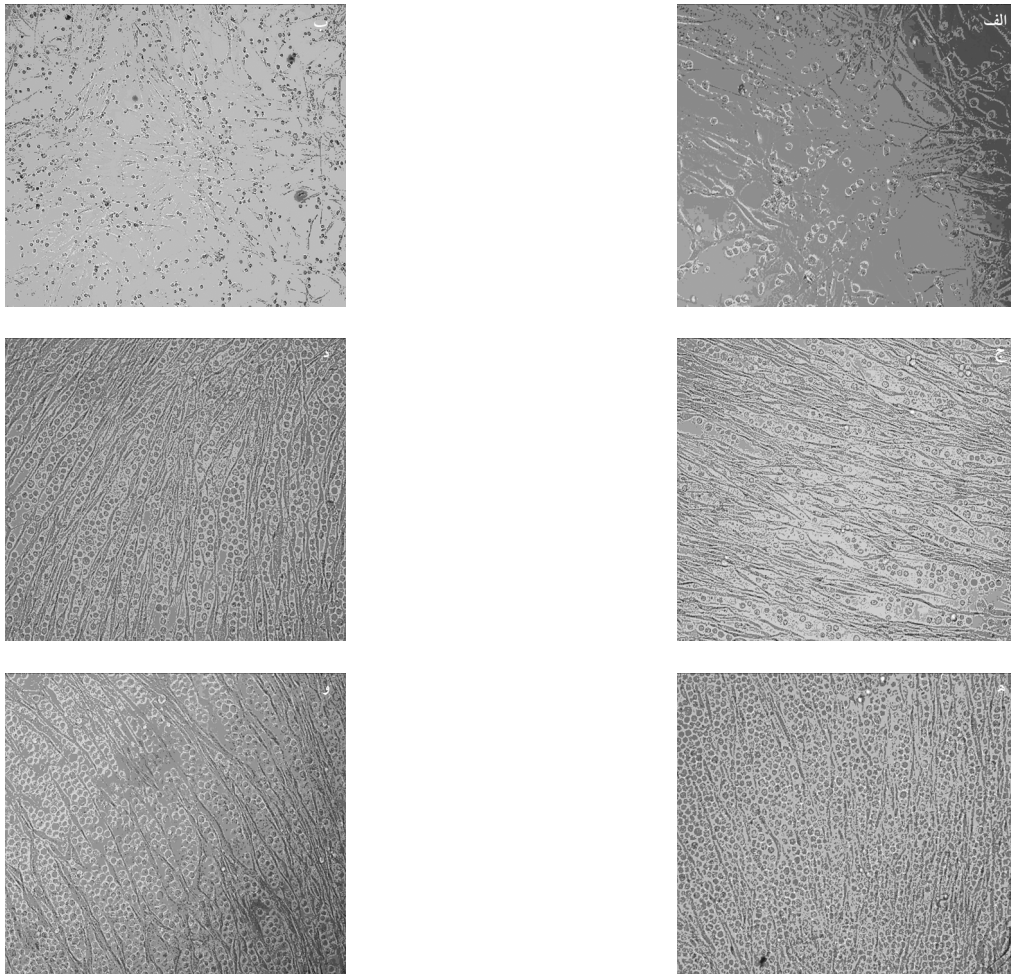
جدول ۲ شمارش و میزان تزايد سلول‌های خون‌ساز در شرایط مختلف کشت در هفته‌های ۱ و ۲ و ۳ به‌صورت سه بار تکرار (تعداد اولیه و پایه سلول‌ها در هر پلیت 2×10^3 است)

تزايد سلولی (Fold expansion)			تعداد سلول $\times 10^4$				
هفته سوم	هفته دوم	هفته اول	هفته سوم	هفته دوم	هفته اول		
۱۳۱/۱۱	۸۰/۰۴	۱۵/۵۶	۲۶۲۲۰۰	۱۶۰۰۰۰	۳۱۱۰۰	R1	لایه تغذیه کننده (+)
۱۲۱/۹۴	۸۷/۲۵	۱۰/۰۸	۲۴۳۸۰۰	۱۷۴۵۰۰	۲۰۱۰۰	R2	3Cyto (-)
۱۲۴/۰۹	۹۳/۲۲	۱۶/۵۷	۲۴۸۱۰۰	۱۸۶۴۰۰	۳۱۱۰۰	R3	DBM (-)
۱۲۵/۷۱±۴/۸	۸۶/۸۳±۶/۶	۱۴/۰۷±۲/۸	۲۵/۱۴±۱/۱	۱۷/۳۶±۱/۳	۲/۸۱±۰/۷	X	
۲۳۸/۷۶	۱۲۵/۸۰	۲۵/۳۵	۴۷۷۵۰۰	۲۵۱۶۰۰	۵۰۷۰۰	R1	لایه تغذیه کننده (-)
۲۲۶/۱۶	۱۱۰/۲۰	۳۱/۷۸	۴۵۲۳۰۰	۲۲۰۴۰۰	۶۳۵۰۰	R2	3Cyto (+)
۲۶۷/۰۳	۱۳۴/۰۸	۲۶/۴۳	۵۳۴۰۰۰	۲۶۸۱۰۰	۵۲۸۰۰	R3	DBM (-)
۲۴۳/۹۸±۲۰/۶	۱۲۳/۳۵±۱۲/۱	۲۷/۸۴±۳/۳	۴۸/۷۹±۴/۸	۲۴/۶۷±۲/۴	۵/۵۶±۰/۸	X	
۴۱۵/۸۶	۱۹۰/۳۷	۵۰/۰۵	۸۳۱۷۰۰	۳۸۰۷۰۰	۱۰۰۱۰۰	R1	لایه تغذیه کننده (+)
۳۹۸/۲۳	۲۵۱/۹۷	۷۶/۰۳	۷۹۶۴۰۰	۵۰۳۸۰۰	۱۵۲۰۰۰	R2	3Cyto (+)
۴۰۸/۹۲	۲۳۳/۱۵	۶۴/۲۵	۸۱۷۸۰۰	۴۶۶۳۰۰	۱۲۸۵۰۰	R3	DBM (-)
۴۱۴/۷۵±۱۲/۳	۲۲۵/۱۵±۳۱/۷	۶۳/۴۴±۱۳/۸	۸۱/۹۵±۲/۳	۴۵/۰۳±۴/۷	۱۲/۶۸±۲/۸	X	
۴۶۸/۲۶	۲۶۷/۰۰	۶۵/۵۲	۹۳۶۵۰۰	۵۳۴۰۰۰	۱۳۱۰۰۰	R1	لایه تغذیه کننده (+)
۴۷۴/۲۳	۳۲۲/۸۲	۹۹/۰۹	۹۴۸۴۰۰	۶۴۵۶۰۰	۱۹۸۰۰۰	R2	3Cyto (+)
۵۲۷/۲۰	۲۹۹/۷۸	۸۱/۱۹	۱۰۵۴۴۰۰	۵۹۹۵۰۰	۱۶۲۳۰۰	R3	DBM (+)
۴۸۹/۸۹±۳۲/۴۸	۲۹۶/۵۲±۲۴/۹	۸۳/۲۶±۱۷/۱	۹۷/۹۷±۵/۶	۵۹/۳۰±۵/۸	۱۶/۶۵±۳/۳	X	

R: تکرار X: میانگین



نمودار ۲ نمودار ستونی از کیتیک تزايد سلول‌های خون‌ساز در شرایط مختلف کشت در هفته‌های ۱ و ۲ و ۳ به‌صورت سه بار تکرار



شکل ۴ الف-ج) نمایی از هم‌کشتی سلول‌های استرومال USSC با سلول‌های خون‌ساز UCB-CD₃₄⁺ بعد از ۱ هفته، د-و) بعد از ۲ و ۳ هفته هم‌کشتی با یکدیگر؛ سلول‌های USSC با توانایی بالایی تکثیر و تزیاد سلول‌های CD₃₄⁺ را طی ۱۴-۲۱ روز پشتیبانی می‌کنند. تصاویر با عدسی‌های ۵×، ۱۰× گرفته شده است.

۳-۴- نتایج سنجش کلونی و LTC-IC حاصل از تکثیر برون‌تنی سلول‌های بنیادی UCB در شرایط مختلف کشت

سلول‌های حاصل از تزیاد سلولی حالات دوبعدی USSC+3Cytو سه‌بعدی USSC+3Cytو+DBM در هفته اول، دوم و سوم طبق روش قبل برداشت شده و بعد از شمارش، برای بررسی و سنجش کلونی در محیط کشت متیل سلولوز کشت داده شد. محیط سنجش کلونی حاوی محیط FBS (Stemspan[™]) و آگار ۱ درصد به‌ترتیب نسبت‌های

۵۰، ۲۰ و ۳۰ درصد بود که فرم تجاری آن Methocult (Methocult H4434) (Stem Cell Technologies) نام داشته و حاوی ۱۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر از فاکتورهای رشد GM-CSF، IL-3، SCF و Epo 2U است که در این مطالعه از متوکالت (Methocult) استفاده شده است. آگار با ژله‌ای کردن محیط اجازه تکثیر سه‌بعدی و تشکیل کلونی‌ها را به سلول‌های خون‌ساز می‌دهد. برای این منظور، پس از شمارش سلولی، میزان ۱۰^۳ سلول به محیط Metocult اضافه و به‌وسیله ورتکس (Vortex) به‌صورت معلق درآورده شد. مخلوط حاصل در چاهک‌های پلیت ۴۸ چاهکی به‌مدت ۱۴ روز،

۱ میلی‌لیتر به‌عنوان مخلوط CFU (CFU-mix)، کلونی‌های با رنگ قرمز آجری و گرد به‌عنوان BFU/CFU-E و کلونی‌های بازتر و غیرمتراکم تیره به‌عنوان CFU-GM ارزیابی شدند. برخلاف شمارش کلی سلول‌ها که در طول زمان افزایش نمایی دارد، CFC کل و تعداد کلونی‌ها از هفته دوم به بعد کاهش داشت. برای سلول‌های تشکیل دهنده کلونی (Colony Forming Cells: CFCs) در همه حالات، حداکثر تکثیر CFC در روز ۱۴ مشاهده شد و بعد از آن تعداد کلی کلنی‌ها شروع به افت نمود (جدول ۳).

انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با فشار ۵ درصد CO_2 و رطوبت بالا قرار گرفت و پس از زمان مقرر، کلونی‌ها بررسی شدند. تجمعات حاوی ۵۰ سلول یا بیشتر به‌عنوان کلونی و تجمعات کمتر از ۵۰ سلول به‌عنوان مجموعه (Cluster) تلقی شده و طبق معیارهای استاندارد و معمول، تحت عناوین CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte/ Macrophage)، BFU-E (Burst Forming Unit- Erythroid) و CFU- GEMM (CFU-Granulocyte/ Erythroid/ Macrophage/ Megakaryocyte) طبقه‌بندی شدند. کلنی‌های متراکم و تیره با قطر بیش از

جدول ۳ تعداد و نوع کلونی‌های حاصل از 10^3 سلول‌های $CD34^+$ دست‌نخورده خون بند ناف و سلول‌های حاصل از تزیاد سلول‌های مذکور در شرایط هم‌کشتی دو و سه بعدی طی مدت ۳ هفته

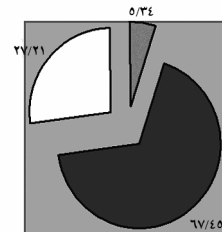
روز	مجموع سلول‌ها	CFC-C در هر ۱۰۰۰ سلول	BFU/CFU-E در هر ۱۰۰۰ سلول	CFU-GM در هر ۱۰۰۰ سلول	CFU-mix در هر ۱۰۰۰ سلول
هفته اول (۷ روز)	۱۲۶۸۰۰	۲۲/۳±۲/۴۸	۹/۱±۰/۸	۱۱/۹±۰/۸	۱/۳±۰/۳
	۱۶۶۵۰۰	۱۶/۶±۱/۷۰	۷/۶±۱/۱	۸/۰±۰/۶	۱/۰±۰/۰
هفته دوم (۱۴ روز)	۴۵۰۳۰۰	۳۸/۳±۱/۷۱	۱۱/۴±۱/۳	۲۵/۳±۲/۳	۱/۶±۰/۴
	۵۹۳۰۰۰	۲۹/۳±۲/۶۱	۷/۹±۰/۸	۱۹/۴±۱/۹	۲/۰±۰/۰
هفته سوم (۲۱ روز)	۸۲۹۵۰۰	۲۷/۳±۴/۱۹	۶/۳±۰/۷	۱۷/۷±۲/۱	۱/۳±۰/۴
	۹۷۹۷۰۰	۲۴/۰±۵/۱	۴/۹±۰/۹	۱۷/۵±۱/۳	۱/۶±۰/۳
صفر روز	۱۰۰۰	۳۲/۵±۳/۱	۲۱/۷±۱/۱	۸/۷±۰/۷	۲/۱±۰/۴

تعداد کل LTC-ICها در روز صفر (روز تخلیص سلول‌های $CD34^+$ از UCB) حدود ۲۱ کلونی بود که بعد از ۳ هفته هم‌کشتی با سلول‌های USSC در شرایط دوبعدی و سه‌بعدی، اختلاف محسوسی بین این دو شرایط مشاهده نشد (جدول ۴). در هر دوشرایط دو و سه‌بعدی، سلول‌ها توانسته بودند تا هفته دوم هم‌کشتی، به‌ترتیب، یک تکثیر ۱/۱۹ و ۱/۱۴ برابر را در هفته اول و تکثیر ۲/۰۴ و ۱/۸۵ برابر را، نسبت به روز صفر در هفته دوم ایجاد کنند ولی در هفته سوم، این رقم افت کرده و حفظ سلول‌های LTC-IC به ۰/۸ مقدار اولیه رسیده بود. به این ترتیب سلول‌های USSC فقط قادر بودند تا دو هفته سلول‌های خون‌ساز اولیه را در شرایط کشت آزمایشگاهی حفظ

به‌طور خلاصه تکثیر CFU-GM (Amplification) و BFU/CFU-E در روز ۱۴ بالاتر از بقیه روزها بود. ترکیب CFC به‌وضوح نشان می‌دهد که بعد از هفته دوم کشت، در هر دو شرایط دوبعدی و سه‌بعدی، حدود ۷۵ درصد کلونی‌های به‌دست آمده CFU-GM بودند، حال آن‌که در روز صفر کلونی‌های BFU/CFU-E بیشتر بود (نمودار ۳). وقتی که تعداد کلی سلول‌های به‌دست آمده در حالت سه‌بعدی با دوبعدی مقایسه شد، با توجه به تعداد بالای سلول‌های هسته‌دار مشاهده شده در حالت سه‌بعدی، تعداد CFC، CFU-GM و BFU/CFU-E نیز به‌طور مشخصی در مقایسه با حالت دوبعدی بالاتر و در هر نقطه زمانی مشهود بود (جدول ۳).

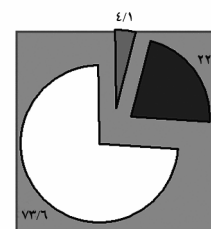
کرده و باعث ایجاد خون‌سازی طولانی مدت بشوند.

الف



■ CFU مخلوط ■ BFU/CFU-E □ CFU-GM

ب



■ CFU مخلوط ■ BFU/CFU-E □ CFU-GM

دوبعدی و چه سه‌بعدی مشاهده شد. به‌طوری که در روز هفتم درصد سلول‌ها به‌ترتیب به ۳۸/۹ درصد و ۳۵/۱ درصد، در هفته دوم به ۱۵/۵ درصد و ۱۲/۷ درصد و در هفته سوم به ۱۱/۰۷ درصد و ۷/۷ درصد افت کرد که در مقایسه این دو حالت، افت درصد سلول‌های CD_{34}^{+} در شرایط سه‌بعدی بیشتر بود که توضیح این مسئله را تا حدودی می‌توان به ترشح سطح بالایی از فاکتورهای تمایزی رده میلوئیدی مثل GM-CSF، M-CSF، IL-6، IL-11، SCF نسبت داد [۲۶]. همچنین ترشح فاکتور IL-1B توسط هر دو سلول USSC و CD_{34}^{+} باعث افزایش شدید تولید G-CSF توسط سلول‌های USSC می‌شود که منجر به تمایز مختص رده‌ای در سلول‌های CD_{34}^{+} می‌شود.

۳-۵- نتایج بررسی سیتوژنتیک (کاریوتایپ) سلول‌های CD_{34}^{+} قبل و بعد از سه هفته هم کشتی با سلول‌های USSC

برای این منظور سلول‌ها به آزمایشگاه سیتوژنتیک دکتر کریمی‌نژاد منتقل و طبق برنامه کاری استاندارد آزمایشگاه بررسی شدند. نتایج نشان دهنده آن بود که با وجود سطح بالایی از تریپل در حالات دوبعدی و سه‌بعدی و در حضور سیتوکین‌های تریپل، کاریوتایپ سلول‌ها فرم طبیعی خود را حفظ نموده و هیچ ناهنجاری کمی [آنپلوئیدی (Aneuploidy)] و کیفی در کروموزوم‌ها مشاهده نشد. همچنین داده‌ها نشان داد که ادغام کروموزومی نیز بین سلول‌های تغذیه کننده USSC و سلول‌های خون‌ساز وجود نداشته و تکثیر سلول‌های بنیادی نتیجه بدخیم شدن سلول‌های بنیادی خون‌ساز UCB و آمیخته شدن سلولی نیست و تریپل سلول‌ها به‌صورت سالم و به‌دور از هرگونه ناهنجاری ژنومی اولیه و ثانویه به تریپل است و در استفاده از این سلول‌های تکثیر شده مشکل خاصی به‌وجود نخواهد آمد (شکل ۵).

نمودار ۳ نسبت کلونی‌های مختلف حاصل از هم‌کشتی سه‌بعدی سلول‌های CD_{34}^{+} و USSC نمونه خون بند ناف در روز صفر (الف) و روز ۱۴ (ب)

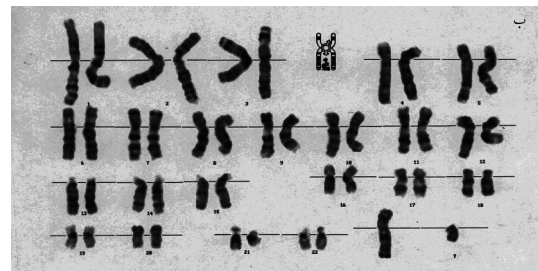
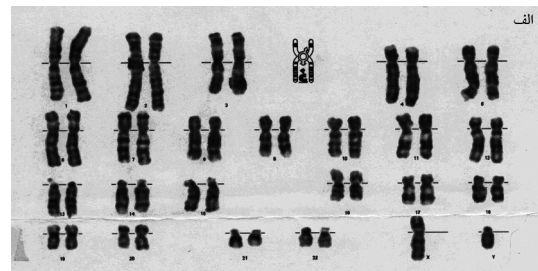
جدول ۴ تعداد کلونی‌های حاصل از سنجش کلونی سلول‌های تکثیر یافته به مدت ۲۱ روز در شرایط دو و سه‌بعدی بعد از ۵ هفته کشت در شرایط LTC-IC

روز صفر	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۸	
۲۱/۶±۲/۴۸	۲۵/۳±۲/۷۱	۴۳/۶±۴/۱	۱۴/۴±۱/۸۱	USSC+ 3Cytok
۲۱/۶±۲/۴۸	۲۴/۱±۱/۹۰	۳۹/۴±۵/۳	۱۲/۲±۱/۳۷	DBM+USSC+ 3Cytok

بررسی فلوسایتومتری درصد سلول‌های CD_{34}^{+} ، کاهش محسوسی در شرایط هم کشتی با USSC چه در حالت

مناسب پیوند بالغین سودمند بوده و احتمال استفاده از این منبع را افزایش می‌دهد [۲۶، ۷]. حداقل دوز سلول‌های مورد نیاز برای یک فرد بالغ $3/7 \times 10^6$ سلول تک هسته‌ای در هر کیلوگرم یا $3/5 \times 10^6$ CD_{34}^+ در هر کیلوگرم است. در حالی که تعداد کل سلول‌های شمارش شده در نمونه UCB به‌طور متوسط 11×10^8 است [۱۷]، بنابراین برای پیوند سلول‌های خون‌ساز UCB به بیماران بالغ لازم است تا این سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی توسط سیتوکین‌های مختلف و در شرایط مختلف کشت تکثیر پیدا کنند، بدون این‌که قابلیت پیوند و چندقوه‌ای بودن آن‌ها تغییر پیدا کند. پیوند سلول‌های UCB در درمان بیماری‌های خونی مثل لوسمی (Leukemia)، تالاسمی (Thalassemia) و کم‌خونی فانکونی (Fanconi Anemia) بیشترین کاربرد را داشته ولی در درمان بیماری‌های متابولیکی مثل نشانگان هورلر (Hurler Syndrome) و بیماری کراب (Crab) [بیماری سیستم عصبی ناشی از نقص سنتز میلین در اثر نقص کلی آنزیم گالاکتوسیداز (Galactocerebrosidase)]، بیماری‌های سیستم عصبی مثل CVA (Cerebrovascular Disease)، ضایعات نخاعی، بیماری‌های قلبی-عروقی، کبدی و دیابت نیز مورد استفاده قرار گرفته و برای درمان یا کاهش عوارض بیماری‌هایی مثل آلزایمر (Alzheimer's) و پارکینسون (Parkinson's) نیز در حال بررسی و مطالعات بالینی است.

حضور سلول‌های مغذی و پشتیبان استرومایی با برهم‌کنش آن‌ها با سلول‌های خون‌ساز و نیز با ایجاد غلظت بالاتر فاکتورهای رشد اولیه باعث حفظ خواص خودنوزایی سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌شود [۱۵]. در غلظت‌های بیش از 10^5 سلول در هر میلی‌لیتر، ازدیاد سلول‌های هسته‌دار افزایش و پیش‌سازها کاهش می‌یابد و در روز هفتم به میزان ثابت می‌رسد ولی غلظت سلولی $10^4 \times 1-5$ سلول در هر میلی‌لیتر موجب سطح بالاتری از تزايد می‌شود. گرچه گفته می‌شود برای شروع تزايد سلولی وجود سرم لازم است ولی یکی از فواید اساسی استفاده از محیط فاقد سرم، عدم حضور سرم جنین گاوی (FBS) و بقیه فراورده‌های حیوانی است که احتمال عفونت و



شکل ۵ کاریوتیپ تهیه شده از سلول‌های در حال تکثیر خون بند ناف در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های استرومایی (USC; الف) کاریوتیپ سلولی قبل از هم‌کشتی و ب) کاریوتیپ سلولی بعد از ۲۱ روز هم‌کشتی با سلول‌های USC در حضور سیتوکین‌های تزايدی؛ همان‌طور که مشخص است در هر دو کاریوتیپ، تعداد کروموزوم‌ها ۴۶ عدد و مشابه سلول‌های طبیعی است و این بیانگر آنست که هیچ‌گونه آمیختگی سلولی بین سلول‌های خون‌ساز و سلول‌های استرومایی رخ نداده است و شرایط تکثیری مورد مطالعه آثار سیترژنتیکی مشخصی را ایجاد نکرده است.

۴- بحث

یک منبع توانا از سلول‌های خون‌ساز نابالغ، سلول‌های CD_{34}^+ هستند. این سلول‌ها می‌توانند از منابع مختلف ایزوله شده و در مسیرهای تمایزی متفاوت افزایش یابند. یکی از این منابع، UCB است. این منبع برای بیمارانی کاربرد دارد که به دلایل مختلف، دهنده‌های مناسب مغز استخوان در اختیار ندارند. یک مسئله در پیوند UCB این است که تنها یک شانس برای جمع‌آوری نمونه در دست است و این امر موجب محدودیت حجم و تعداد سلول می‌شود، در نتیجه پیوند موفقیت‌آمیز محدود به کودکان و بیماران کم‌وزن می‌شود [۱۷]. به‌ترتیب ۱۰۰، ۶۷ و ۲۵ درصد واحدهای UCB، میزان کافی سلول‌های هسته‌دار برای پیوند بیماران با وزن ۱۰، ۳۵ و ۶۰ کیلوگرم را دارا هستند. ازدیاد جمعیت سلول‌های بنیادی برای رسیدن به یک دوز درمانی

حساسیت را بالا می‌برد. همچنین حضور مهارگرهای دیگری مثل $TNF-\alpha$ (Tumor Necrosis Factor-alpha) و فاکتورهای تمایزی مثل IL-3 و GM-CSF در FBS، خون‌سازی را مهار و جمعیت سلول‌های $CD34^+$ را کاهش می‌دهد. سلول‌های بالغ و $CD34^-$ تولید شده در طول کشت نیز تزیاید سلول‌های بنیادی را مهار می‌کنند [۱۶].

سلول‌های USSC در مقایسه با سلول‌های مزانشیمال تلمومراز (Mesenchymal Telomerase Cells) بلندتری دارند که این امر ممکن است ظرفیت بالای تکثیر و تزیاید آن‌ها را توضیح دهد. سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان تا حدودی با سلول‌های USSC متفاوت بوده ولی با این وجود مشترکات فراوانی با هم دارند. سلول‌های USSC قدرت تولید تعدادی از سیتوکین‌ها را نیز دارد. سلول‌های USSC تحریک نشده درحالت طبیعی قادر به تولید مشخص سیتوکین‌های $TGF-1\beta$, LIF, CSF (Leukemia Inhibitory Factor), M-CSF, (Transforming Growth Factor-1 beta), VEGF, GM-CSF (Vascular Endothelial Growth Factor), SDF-1 α , IL-15, IL-12, IL-11, IL-8, IL-6, IL-1 β (Stromal Derived Factor-1 alpha) هستند [۲۶].

مسئله مساحت یا سطح کشت مربوط به سیستم دکستر و سلول‌های استرومال بوده و سلول‌های سوسپانسون خون‌ساز به دلیل معلق بودنشان چندان وابسته به سطح و مساحت پلیت یا فلاسک نیستند. برای مثال یک پلیت ۴۸ تایی با قطر چاهک ۱۲ میلی‌متر، مساحتی برابر با $113/04$ میلی‌متر مربع دارد و سلول‌های استرومال نیز به‌صورت تک لایه رشد کرده و نمی‌تواند سطحی بالاتر را پوشش بدهد. از طرفی دیگر؛ افزایش تعداد سلول‌های استرومال و افزایش سطح پوشیده شده با استرومال آثار حمایتی بیشتری را برای کشت طولانی مدت ایجاد می‌کند. در اینجاست که برای افزایش نسبت سطح به حجم، مسئله کشت سه‌بعدی مطرح می‌شود [۲۳]. هر گرم استخوان خشک مغز استخوان (استخوان اسفنجی) حدود ۸۰ سانتی‌متر مربع سطح دارد که تاکنون بهترین نمونه‌های

مصنوعی سازگار زیستی نتوانسته است به سطح ۵۰ سانتی‌متر مربع برسد. در شرایط کشت معمولی، استفاده از سیستم کشت سه‌بعدی با تخلخل بالا چندان مقدور نیست و سلول‌ها برای این‌که بتوانند به درون حفرات سیستم سه‌بعدی نیز نفوذ کرده و از سطح موجود در آن‌ها استفاده کنند به فشار کمپرسی بالاتر، سیستم درجریان، شاخص‌های حساس و در حقیقت به یک بیوراکتور (Bioreactor) نیاز دارند [۲۲]. در این مطالعه برای افزایش سطح در شرایط معمولی کشت از داربست DBM استفاده شد که منشأ آن استخوان انسان است. عمده مصرف این داربست برای ترمیم ضایعات استخوان، مشکلات فک و جراحی‌های دندان بوده و به دلیل ساختار استخوانی که دارد، سازگاری و پیوندپذیری بالایی را در محل ضایعات دارد. این داربست در اندازه‌ها و اشکال مختلف نامنظم ساخته شده و دارای تخلخل ۳۰-۴۰ درصد و سطح حدود ۳۵ میلی‌متر مربع است. اندازه داربست‌های مورد مطالعه در این تحقیق حدود ۱-۵ میلی‌متر و شکل آن‌ها کروی نامنظم بود که با احتساب قطر متوسط ۳ میلی‌متر، می‌توان مساحت کره معادل آن را حدود $28/26$ میلی‌متر مربع ($4\pi r^2 = 4 \times 1/5 \times 3/14 = 28/26$) تخمین زد و به دلیل تخلخل متوسط ۳۵ درصد، مساحت $38/15$ میلی‌متر مربع ($28/26 + 9/89 = 38/15$) را به آن نسبت داد. حال اگر در یک پلیت ۴۸ چاهکی، دو لایه، معادل ۲۰ عدد از آن را در نظر داشته باشیم، سطح کشت به $876/06$ میلی‌متر مربع [$(38/15 \times 20) + 113/04 = 876/06$] یا $7/75$ برابر میزان اولیه افزایش خواهد یافت. همان‌طوری که اشاره شد، به دلیل عدم وجود سیستم در جریان، هیچ‌کدام از سلول‌های استرومال و خون‌ساز به درون حفرات نفوذ نکرده و در حقیقت یک سطح تلاقی ۳۰ درصد روی داربست ایجاد می‌شود که معادل $2/58$ برابر سطح اولیه خواهد بود و سلول‌های خون‌ساز نیز به دلیل معلق بودنشان به ته پلیت رسوب کرده و در آن‌جا تکثیر می‌یابند، در نتیجه در این سطح کشت ایجاد شده، همه سلول‌های استرومال قادر به ایجاد برهم‌کنش سلولی مستقیم نبوده و اغلب با تولید فاکتورهای پاراکرین [مثل

BMP-4 ,SDF-1 ,LIF ,IL-7 گیرنده ,IL-6 ,IL-4 ,IL-3 ,IL-1 ,SCF ,FLt3 (Bone Morphogenetic Protein 4) لیگاند ,Oncostatin M) OSM ,M-CSF ,GM-CSF ,G-CSF (Platelet Derived PDGF گیرنده (Transferin) Trf (Interferon-gamma) IFN- γ گیرنده ,Growth Factor) (Fibroblast Growth Factor) FGF گیرنده ,TNF گیرنده
آثار خون‌سازی خود را اعمال می‌کند ولی سلول‌های استرومال کف و کناره‌های پلیت و داربست، از طریق ایجاد مسیر پیام‌دهی بین سلولی، تولید پروتئین‌های ECM (Extracellular Matrix) [مثل کلاژن‌های I, II, III, IV, V, VI، فیبرونکتین (Fibronectin)، لامینین (Laminin)، ویمنتین (Vimentin)، هیالورونات (Hyaluronate)، پروتئوگلیکان (Proteoglycan)]، تولید فاکتورهای پاراکرین و مولکول‌های اتصال (مثل VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule)، ICAM-1,2,3 (Inter-Cellular Adhesion Molecule)، LFA1,3 (Lymphocyte Function-associated Antigen)، VLA (Very Late Antigen) L-sel (L-Selectin)،

این تحقیق مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد گروه هماتولوژی بوده و بخشی از آن با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. همچنین این پروژه از حمایت مالی سازمان انتقال خون ایران و ستاد سلول‌های بنیادی کشور نیز برخوردار شده است. نویسندگان از جناب آقای دکتر علی مقدم، مرکز تحقیقات خون و انکولوژی بیمارستان شریعتی، نیز سپاسگزاری می‌نمایند.

- [1] Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2000; 18(6): 1360-77.
- [2] To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997; 89(7): 2233-58.
- [3] Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother* 1996; 5(3): 213-26.
- [4] McCullough J, Clay M, Herr G, Smith J,

Stroncek D. Effects of granulocyte-colony-stimulating factor on potential normal granulocyte donors. *Transfusion* 1999; 39(10): 1136-40.

- [5] Anderlini P, Przepiorka D, Körbling M, Champlin R. Blood stem cell procurement: donor safety issues. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21 Suppl 3: S35-9.
- [6] Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, Chapuis B, Chopra R, Cornelissen JJ, Gale RP, Goldman JM, Loberiza FR Jr, Hertenstein B, Klein JP, Montserrat E, Zhang MJ, Ringdén O, Tomany SC, Rowlings PA, Van Hoef ME, Gratwohl A. Blood stem cells compared with

- bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* 2000; 95(12): 3702-9.
- [7] Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Molldrem J, Carter C, Yu M, Dunbar C, Barrett J. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood* 1996; 88(8): 3223-9.
- [8] Ehring B, Biber K, Upton TM, Plosky D, Pykett M, Rosenzweig M. Expansion of HPCs from cord blood in a novel 3D matrix. *Cytotherapy*. 2003; 5(6): 490-9.
- [9] Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Stem cell transplantation. Text book of Essential Haematology. 3th Edition, London: Wiley-Blackwell, 2001; p: 80-93.
- [10] Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Stem cell transplantation. color atlas of Essential Haematology. 4th Edition, London: Wiley-Blackwell, 2003; p: 259-66.
- [11] AABB. New frontiers in transfusion medicine: Mobilization and collection of PBPC. In: Cellular therapy. Sacher RA (Editor). USA: AABB, 2002; p: 69-88.
- [12] Bin B. Collection and transfusion of leukocytes, dendritic cells and stem cells. In: Text book of Hamatology. Beutler E, Lichtman M, Collier B, Kipps TJ, Bandereko N (Editors). 6th edition, Singapour: Mcgrow Hill, 2001; p: 1893-904.
- [13] Gao L, Chen X, Zhang X, Liu Y, Kong P, Peng X, Liu L, Liu H, Zeng D. Human umbilical cord blood-derived stromal cell, a new resource of feeder layer to expand human umbilical cord blood CD34+ cells in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36(2): 322-8.
- [14] Kasper D. StemCell Transplantation. Text book of principles of internal medicine Harrison. Singapour: Mcgrow Hill, 2005; 221-30.
- [15] Camille N, Abboud A. Structure of the marrow and the hematopoietic microenviroment. Text book of Williams hematology. 7th edition, Singapour: Mcgrow Hill, 2005; p: 35-51
- [16] Soleimani M. Expansion of cord blood stem/progenitor cells and evaluation of Hb switching and expression of CD44 in co-culture with BM Stromal dells. Presented for the Ph.D., Tehran, Tarbiat Modares University, 2005. (Persian)
- [17] Shara BA, Glukman E, Rubinstein P, Madrigal A. Cord blood characteristics in stem cell transplantation. London: Martin Duntiz, 2000; p: 129-48.
- [18] D.HO A, Hass R, Champlin RE. Hematopoeitic stem cell transplantation. New York: Marcel Dekker Publ. Inc, 2000; p: 300-30.
- [19] Sutherland HJ, Lansdrop PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(9): 3584-8.
- [20] Zhang Y, Li C, Jiang X, Zhang S, Wu Y, Liu B, Tang P, Mao N. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture

- expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Exp Hematol* 2004; 32(7): 657-64.
- [21] Baharvand H. Stem cells. vol2, 1th edition, Tehran: Khane Zistshenasi, 2007; p: 139-71.
- [22] Yoshida T, Takagi M. Cell processing engineering for ex vivo expansion of hematopoietic cells: a review. *Biochem Engineering* 2004; 20(2-3): 99-106.
- [23] Panoskaltsis N, Mantalaris A, Wu JH. Engineering a mimicry of bone marrow tissue ex vivo. *J Biosci Bioeng* 2005; 100(1): 28-35.
- [24] Jiang XS, Chai C, Zhang Y, Zhuo RX, Mao HQ, Leong KW. Surface-immobilization of adhesion peptides on substrate for ex vivo expansion of cryopreserved umbilical cord blood CD34+ cells. *Biomaterials* 2006; 27(13): 2723-32.
- [25] Xie CG, Wang JF, Xiang Y, Qiu LY, Jia BB, Wang LJ, Wang GZ, Huang GP. Cocultivation of umbilical cord blood CD34+ cells with retro-transduced hMSCs leads to effective amplification of long-term culture-initiating cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12(3): 393-402.
- [26] Kögler G, Radke TF, Lefort A, Sensken S, Fischer J, Sorg RV, Wernet P. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol* 2005; 33(5): 573-83.
- [27] van Hensbergen Y, Schipper LF, Brand A, Slot MC, Welling M, Nauta AJ, Fibbe WE. Ex vivo culture of human CD34+ cord blood cells with thrombopoietin (TPO) accelerates platelet engraftment in a NOD/SCID mouse model. *Exp Hematol* 2006; 34(7): 943-50.