Ex-vivo Expansion and Amplification of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem/Progenitor cells (HSPC)

Thesis

Submitted for Partial Fulfillment of M.D. Degree in Clinical and Chemical Pathology

Presented by

Mai Hany Mahmoud Amin

M.B.B.Ch., M.Sc. of Clinical and Chemical Pathology

Ain Shams University

Supervised by

Professor/ Mona Ahmed Wahba

Professor of Clinical and Chemical Pathology

Faculty of Medicine – Ain Shams University

Professor/ Manal Mohamed Ismail

Professor of Clinical and Chemical Pathology

Faculty of Medicine, Ain Shams University

Professor/ Soha Raouf Youssef

Professor of Clinical and Chemical Pathology

Faculty of Medicine, Ain Shams University

Doctor/ Hanan Mohamed Mahmoud

Lecturer of Clinical and Chemical Pathology

Faculty of medicine, Ain Shams University

Faculty of Medicine

Ain Shams University

2012

PROTOCOL

Ex-vivo Expansion and Amplification of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem/Progenitor cells (HSPC)

Thesis
Submitted for Partial Fulfillment of M.D. Degree in
Clinical and Chemical Pathology

Presented by
Mai Hany Mahmoud Amin
M.B.B.Ch., M.Sc. of Clinical and Chemical Pathology
Ain Shams University

Supervised by
Professor/ Mona Ahmed Wahba
Professor of Clinical and Chemical Pathology
Faculty of Medicine – Ain Shams University

Professor/ Manal Mohamed Ismail
Professor of Clinical and Chemical Pathology
Faculty of Medicine, Ain Shams University

Professor/ Soha Raouf Youssef
Professor of Clinical and Chemical Pathology
Faculty of Medicine, Ain Shams University

Doctor/ Hanan Mohamed Mahmoud
Lecturer of Clinical and Chemical Pathology
Faculty of medicine, Ain Shams University

Faculty of Medicine
Ain Shams University
2009

Introduction:

Tissue specific stem cells, like most somatic stem cells possess the unique ability of self-renewal and multilineage differentiation. These combined properties are reflected in the ability of hematopoietic stem cells (HSCs) to completely and durably reconstitute hematopoiesis of myeloablated recipient and maintain it throughout the entire life span ***(Wanda et al., 2005).***

Umbilical cord blood (UCB) has gained tremendous importance over the last decade as a potential source of transplantable stem cells. It is easily available and has been shown to contain a large number of hematopoietic stem cells and progenitor cells. So far, more than 2000 UCB transplants have been done worldwide though the majority of recipients belong to the pediatric group, successful transplants in adults have also been reported ***(Bojanic et al., 2006).***

Risks and benefits of umbilical cord blood have become clear compared to bone marrow or mobilized peripheral blood derived stem cells. The collection of umbilical cord blood after birth carries no risk for the donor, collected blood can be cryopreserved and stored for prolonged periods and units are immediately available upon request. Its transplantation is associated with a negligible risk of blood born infectious disease transmission and a lower incidence of acute graft

versus host disease (GVHD), where partial HLA match between the donor and the recipient is tolerable ***(Tracey et al., 2006).***

The most important limitations of its use is the low number of hematopoietic stem cells (HSCs) in cord blood samples that might prevent a successful transplantation or cause delayed engraftment and higher morbidity and mortality during the pancytopenic period after the transplantation ***(Shpall et al., 2004).***

The current bone marrow transplantation experience recommend to infuse in the patient at least 2 X 10^7 nucleated cells/kg of body weight. UCB contains at most 10 nucleated cells, and the UCB recipient typically receive 10^9 folds fewer CD34+ cells and progenitors than do recipients of bone marrow or G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells in individuals 60 to 70 Kg, therefore the recovery of neutrophils and particularly platelets is consequently delayed, and grafts fail in 16% of cases ***(Haylock et al., 2007).***

Several strategies aimed at increasing the cell dose are being explored to reduce the time to recovery of neutrophils, these strategies include bridging the engraftment period using an additional allogenic carrier cell population through a technique of giving two unrelated UCB units, despite the theoretical risk of bidirectional immune rejection,

engraftment was achieved in all patients. Another technique using host cells to bridge engraftment in non-myeloablative reduced intensity conditioning. Others proposed the direct injection of the cells into the bone marrow rather than infusion via a peripheral vein for better homing results ***(Kamran et al., 2006).***

One of the possible theoretical methods to solve this problem is ex-vivo expansion of hematopoietic cells to increase the number of stem cells to overcome the limitation of low cell dose, with optimization of culture methods and delivery strategies ex-vivo expanded HSCs will have the potential to be an important therapeutic tool in the future ***(Madkaikar et al., 2007).***

Aim of the Work:

Our goal is to develop a reliable methodology to increase the number of stem and progenitor cells available from a single umbilical cord blood unit for transplantation, which could make this alternate source of HSCs available to larger pediatric and adult patients who lack traditional matched donors.

Subjects and Methods:

- ❖ The main experiment will be preceded by a pilot phase study of 5 human cord blood samples for initial evaluation of the expansion technique.
- ❖ The main study will include twenty (20) Umbilical Cord Blood samples collected in the Obstetric Ward of Ain Shams University Labor & Delivery hospital.
- ❖ All mothers enrolled will be from 25 to 35 years old, who experience a singleton, normal course pregnancy.
- ❖ Only uncomplicated, normal vaginal delivery of full term neonate (36 weeks or more) will be included.
- ❖ Exclusion criteria will be represented by the presence of present or history of Smoking, Gestational diabetes mellitus, hypertension associated pregnancy, infectious diseases including blood born pathogens (as HIV, Hepatitis B, C, Syphilis….etc.), congenital malformations, genetic diseases, or hematological diseases (such as Leukemia, Sickle cell diseases……etc.).
- ❖ Umbilical Cord blood samples will be collected ex utero, after fetal delivery and following placental separation using a closed collection system by venipuncture of the umbilical vein under complete aseptic conditions on preservative.

- Whole blood will be used to expand the stem cells in serum free liquid culture media using cytokine cocktails (Human recombinant flt-3 ligand & Human recombinant Thrombopoietin) for 7 days.
- Post expansion assessment will take place by Flow cytometric estimation of the percentage of stem cells in the expanded samples using anti CD34, and anti CD38 antibodies, and comparing the results to pre-expanded control samples.
- Ex-vivo expansion efficiency will be determined by the fold expansion of $CD34^{+}$ $CD38^{-}$ primitive cells.
- At the end of the study all blood samples, used culture media, reagents, and other contaminated waste included in the study will be sealed in a strong impermeable biohazard bags, labeled with the place and date of origin, while contaminated disposable sharp instruments (as needles, test tubes, pipettes…etc.) will be discarded in a biohazard sharp container for further safe transport of these waste according to Ain shams university hospitals infection control biohazard waste disposal policy.

References:

Bojanic, I. and Golubic, B. (2006): Umbilical cord blood as a source of stem cells. Acta Med Croatica, 60:215-225.

Haylock, D. and Nilsson, S. (2007): Expansion of umbilical cord blood for clinical transplantation. Current Stem Cell Research and Therapy, 214:324-335.

Kamran, A.; Mandana, M.; Sina, V.; Zahra, G.; Poya, A. and Farima, F. (2006). Ex-vivo expansion of cord blood cells and its application. Yakhteh Medical Journal, 8:210-218.

Madkaikar, M.; Ghosh, K.; Gupta, M.; Swaminathan, S. and Mohanty, D. (2007). Ex-vivo expansion of umbilical cord blood stem cells using different combination of cytokines and stromal cells. Acta Harmatol, 118(3):153-159.

Shpall, E.; McNiece, I.; De Lima, M.; McMannus, J.; Robinson, S.; Peled, T. and Champlin, R. (2004). Transplantation of ex-vivo expanded cord blood. Biol. Blood Marrow Transplant, 10(10): 738.

Tracey, A.; Karin, T. and Marcus, R. (2006). No longer a biological waste product: Umbilical cord blood. Medical Journal of Australia, 184:407-410.

Wanda, P.; Loretta, G. and Ymera, P. (2005): Proliferative senescence in hematopoietic stem cells during ex-vivo expansion. Folia Histochemica et Cytobiologica, 43:197-200.

المقدمة

الخلايا الجذعية هي الخلايا الرئيسية في جسم الإنسان والتي تتجدد باستمرار وتتحول إلى خلايا تعتبر الأساس لجميع أنسجة الجسم وأعضائه وأنظمة المناعة فيه و هذا ينطبق ايضا على الخلايا الجذعية المصنعة للدم و هي القادرة على إعادة بناء خلايا الدم والجهاز المناعي في حالات اعتلال النخاع العظمى.

بدأ في العقود الأخيرة الاهتمام بدم الحبل السري كمصدر هام للخلايا الجذعية القادرة على التطور إلى أي أنواع خلايا الدم و استخدامه، و ذلك لسهولة الحصول علية و احتوائه على أعداد كبيرة من هذه الخلايا الجذعية. هناك حاليا أكثر من ألفين حالة تمت زراعتها من دم الحبل السري في العالم غالبيتهم من الأطفال بالإضافة إلي نجاح بعض عمليات نقل دم الحبل السري للبالغين.

يتمتع دم الحبل السري بالعديد من المزايا إذا ما قورن بالخلايا الجذعية التي كانت تتم زراعتها حتى ألان بشكل متكرر والمستخرجة من النخاع أو من الدم المحيط به, فعملية استخلاص الدم من الحبل السري بعد الولادة سهل وخالي من المخاطر، و يتم حفظة عن طريق التجميد لفترات طويلة و هو حاضر على نحو الفور عندما يتم الاحتياج إليه, هذا بالإضافة إلي إن دم الحبل السري خالي إلي حد كبير من الفيروسات و يتقبله الجسم في عمليات الزرع على نحو أفضل من الخلايا الجذعية البالغة فهو اقل عرضة للأمراض التي لها علاقة برفض نظام المناعة في جسم المريض من جهة قبوله الخلايا الغريبة ولا تحتاج عملية زرع هذه الخلايا مطابقة كاملة بين نوع أنسجة المريض والمتبرع.

من أهم القيود علي عمليات زرع الدم الحبل السري هي أن كمية الدم المستخلصة قليله و قد لا تكفي لإعادة بناء الجهاز الدموي لدى البالغين, فتؤدى بعملية الزرع إلي الفشل و تعرض المريض للمضاعفات أو الموت نتيجة لنقص في كرات الدم البيضاء بعد عملية الزرع.

تنجح عمليات زرع النخاع العظمى، عندما يحصل المريض علي خلايا أحادية الخلية بتركيز ($٢ X ١٠^{٧}$) للكيلو جرام الواحد, و بما إن دم الحبل السري يحتوى علي ($١٠^{٩}$) من الخلايا أحادية الخلية فذلك يعنى إن المريض سيحصل على عشر مرات أقل من الخلايا الجذعية البدائية مما كان سيحصل علية في حالة زراعات النخاع العظمى أو زراعة خلايا مركزة و مستخلصة من الدم البشرى خاصة للبالغين ما بين ٦٠-٧٠ كيلوجرام و لذلك نقص عدد الكرات الدم البيضاء و الصفائح الدموية عادة ما يسبب فشل عملية زرع دم الحبل السري بنسبة ١٦٪.

كثرت الأبحاث التي تهدف إلى زيادة عدد الخلايا المزروعة من الحبل السري لتفادى المضاعفات الناتجة عن نقص عدد كرات الدم البيضاء و منها زرع وحدتين مختلفتين من دماء الحبل السري و ذلك محاولة لتقليل المدة اللازمة لكرات الدم البيضاء من استعادة بناء الجهاز المناعي للجسم, و بالرغم من خطر احتمال قيام الخلايا المناعية في الحبل السري بمهاجمة نسج المتلقي إلا إن عملية الزرع تمت بنجاح. الطريقة الثانية هي استخدام خلايا دم المريض كوسيلة لنقل الخلايا المزروعة لتثبيتها و ذلك لعدم وجود فشل وظيفي في النخاع العظمي، واخيراهناك اقتراح بحقن الخلايا المراد زرعها في النخاع العظمي بدلامن حقنها بالوريد الطرفي.

من النظريات التي من الممكن الاستفادة منها في هذا المجال هي استحداث عدة طرق لتنمية و زيادة كمية الخلايا الجذعية في دم الحبل السري الواحد خارج الجسم في ظروف مخبريه عن طريق استعمال المغذيات وعوامل النمو و الحصول علي عدد مناسب يكفي لزرعها في شخص

بالغ مما يبشر بأفاق جديدة لهذا النوع من العلاج و استبدال خلايا النخاع العظمي بالخلايا المستخلصة من دم الحبل السري و استخدامها في علاج أمراض كثيرة.

الهدف من الدراسة

الهدف من الدراسة هو إيجاد طرق إيجابية يمكن الاعتماد عليها في عملية زيادة كمية الخلايا الجذعية في دم الحبل السري الواحد و الحصول علي عدد مناسب من هذه الخلايا، مما يجعل من الحبل السري مصدر بديل للخلايا الجذعية التي تكفي لزرعها في طفل كبير أو شخص بالغ لم يتوفر لهم متبرع مناسب.

خطة البحث

- ستسبق التجربة الرئيسية دراسة تجريبية لخمس عينات من دم الحبل السري، و ذلك للتقييم الأولى للطريقة التي ستتبع في زراعة الخلايا و زيادة عددها.
- الدراسة الرئيسية ستشمل عدد عشرين (٢٠) عينة من دم الحبل السري سيتم جمعها بمستشفى النساء و الولادة التابعة لجامعة عين شمس.
- لابد و أن تكون الأم ما بين ٢٥-٣٥ سنة، و أن يكون الحمل طبيعي بدون مشاكل صحية، بوليد مفرد.
- سيتم جمع العينات من عمليات الولادة الطبيعية و التي تمضى بدون مشاكل و تنتج عن وليد مكتمل (٣٦ أسبوع فأكثر)
- يستثنى من هذه الدراسة الأمهات المدخنات، إصابة حالية أو تاريخ مرضى للحمل السكري،ارتفاع ضغط الدم المصاحب للحمل، أمراض معدية و خاصة التي تنقل عن طريق الدم (مثل فيروس نقص المناعة، فيروس الالتهاب الكبدي الوبائي، الزهري......و غيرهم)، تشوهات خلقية، أمراض وراثية، و أمراض الدم (مثل ابيضاض الدم، الأنيميا المنجلية.....و غيرهم)
- ستؤخذ عينات الدم خارج الرحم بعد عملية ولادة الطفل و فصل المشيمة من الوريد الرئيسي للحبل السري بعد تعقيمه.
- الدم سيتم زرعه في محيط سائل خالي من الأمصال بمساعدة المغذيات وعوامل النمو (Human recombinant Flt3-L) & (Human recombinant TPO) لمده ٧ أيام.
- سيتم تقييم الخلايا المزروعة عن طريق تقنية التدفق الخلوي و معرفة عدد الخلايا البدائية باستخدام الأجسام المضادة للبروتينات على سطح هذه الخلايا (CD34,CD38) و مقارنتها بعينات الدم التي لم تزرع.

- ❖ كفاءة عملية الزرع ستقيم بمدى قدرة الخلايا الجذعية البدائية ($CD34^+CD38^-$) في دم الحبل السري على النمو و زيادة عددها مخبريا.
- ❖ بعد الانتهاء من الدراسة، كل عينات الدم و السوائل الملوثة بالدم سيتم وضعها في أكياس محكمة الإغلاق معدة خصيصا لجمع النفايات الطبية المعدية، و سيتم كتابة مكان جمعها و التاريخ عليها، أما الأدوات الحادة الملوثة كالإبر و أنابيب الاختبارات سيتم التخلص منها فور الانتهاء من استخدامها بوضعها في الحاويات الخاصة بالأدوات الحادة متبعين في ذلك قواعد التخلص من النفايات الطبية المعدية و سياسة مكافحة العدوى المعمول بها بمستشفيات جامعة عين شمس.