Review Article

Large-Scale Expansion of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells for Cell Therapy Applications

Abbasalizadeh S., M.Sc., Rezaei Larijani M., B.Sc., Baharvand H., Ph.D.***

** P.O.Box: 19395-4644, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.,*
*** Developmental Biology Department, Science ad Culture University, ACECR, Tehran, Iran.*

Abstract

Successful isolation, derivation and culturing of human pluripotent stem cells, including human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem (hiPSCs) cells in laboratory scale has opened new horizones for cell therapy applications such as tissue engineering and regenerative medicine. However, most of the cell therapy protocols using these unique cells require large number of fully defined and well-characterized cells with uniform properties. Hence, translating these valuable findings from laboratory scale research to clinical applications would involve development of robust dynamic and scalable culture systems being capable of producing large number of uniform and well-characterized cells under fully controlled conditions. Identification and meticulous investigation of most important parameters affecting on the performance of expansion, self renewal and differentiation of human pluripotent stem cell cultures such as cell line, culture medium, culture conditions and culture system are prerequisite steps for successful culture system development, which have attracted growing attention from researchers in recent years. This review will focus on recent research advances and achievements in culture system development for human pluripotent stem cells as well as current challenges in this filed.

Key words: Human embryonic stem cells (hESCs); Human induced pluripotent stem (hiPSCs); Large-scale expansion; Cell therapy

مقاله مروری

تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی و پرتوان القایی انسانی در مقیاس بالا به منظور کاربردهای درمانی

سعید عباسعلیزاده M.Sc.*، مهران رضایی لاریجانی B.Sc.*، ✍ حسین بهاروند Ph.D.*،**

* گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

**گروه زیست‌شناسی تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران

تاریخ دریافت:تیرماه ۸۹، تاریخ پذیرش:مهرماه ۸۹

چکیده

جداسازی و کشت موفق سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی شامل سلول‌های بنیادی جنینی (hESCs) و پرتوان القایی انسانی (hiPSCs) در شرایط آزمایشگاهی پتانسیل و امیدهای جدیدی را برای کاربردهای درمانی مانند مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی ایجاد کرده است. با این وجود، اغلب کاربردهای درمانی این سلول‌های ارزشمند نیازمند تولید مقادیر زیادی سلول هدف با خصوصیات کاملاً مشخص، تعریف شده و یکسان است. از این رو، کاربردی شدن یافته‌های ارزشمند آزمایشگاهی مستلزم توسعه سیستم‌های کشت پویا، مقیاس پذیر، با کارایی بالا و قابل اعتمادی است که قادر باشد سلول‌های مورد نظر را در مقیاس بالا، تحت شرایط کاملاً کنترل شده و خصوصیات کاملاً مشخص و یکسان تکثیر کند. توسعه موفق سیستم کشت برای اهداف درمانی نیز نیازمند شناسایی و بررسی دقیق عوامل مؤثر بر تکثیر، حفظ خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی و پرتوان القایی انسانی مانند تأثیر رده سلولی، اجزای محیط کشت، شرایط کشت و سیستم کشت است که در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. مقاله حاضر مروری بر آخرین پژوهش‌های مرتبط و دستاوردهای به‌دست آمده در زمینه طراحی سیستم کشت برای تکثیر سلول‌های مذکور در مقیاس بالا و چالش‌های پیش رو است.

کلید واژه‌ها: سلول‌های بنیادی جنینی انسانی (hESCs)، سلول‌های پرتوان القایی انسانی (hiPSCs)، تکثیر در مقیاس بالا، سلول درمانی

مقدمه

در حال حاضر سلول‌ها به عنوان جایگزین سلول‌های آسیب دیده، نوسازی بافت‌های آسیب دیده و حامل‌های دارو رسان استفاده شده و استفاده از سلول‌های بنیادی برای درمان بیماری‌های ژنتیکی و اکتسابی به‌ویژه سرطان‌ها، پارکینسون، بیماری‌های قلبی و عروقی، بافت‌های آسیب دیده و دیابت نیز نتایج بسیار امیدوار کننده‌ای به همراه داشته است [۱و ۲]. به‌کارگیری سلول‌های بنیادی برای سلول درمانی دارای مزیت‌های بالقوه و چشمگیری است. سلول‌های بنیادی قادرند خود از طریق تقسیم سلولی تکثیر کرده و از طریق القای آن‌ها می‌توان سلول‌های اختصاصی متفاوتی را تولید کرد. سلول‌های بنیادی را می‌توان به انواع بافت‌ها پیوند زد و از طریق مکانیسم‌های سلولی مختلف مانند برهمکنش سلول-سلول Intra-cellular interactions، دیگر انواع سلول‌ها را نیز تحریک کرد. از این‌رو، با استفاده از سلول‌های بنیادی می‌توان کارایی

✍ آدرس مکاتبه: گروه سلول‌های بنیادی زیست‌شناسی تکوینی پژوهشگاه رویان، و گروه زیست‌شناسی تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران

E-mail:baharvand@royaninstitute.org

یک بافت را از طریق شرکت مستقیم سلول در بافت هدف یا به‌صورت حامل علایم پیچیده سلولی، حتی بدون شرکت مستقیم در بافت هدف بازیابی کرد. این خصوصیات برجسته باعث شده‌اند تا استفاده از سلول‌های بنیادی برای سلول درمانی از اهمیت به‌سزایی برخوردار باشد [۳]. سلول‌های بنیادی جنینی انسانی Human embryonic stem cells (hESCs) و سلول‌های پرتوان القایی انسانی Human induced pluripotent stem (hiPSCs)، از نویدبخش‌ترین انواع سلول‌های بنیادی برای اهداف سلول درمانی هستند. پس از اولین جداسازی سلول‌های بنیادی جنینی در سال ۱۹۹۸ میلادی و تولید موفق سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی، تحول بزرگی در زمینه مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی ایجاد و روند تحقیقاتی رو به رشدی برای تمایز این سلول‌ها به سمت رده‌های تمایزی مختلف آغاز شده است [٤]. همچنین، امروزه مطالعات روز افزونی در زمینه کاربردهای درمانی این سلول‌ها، شناسایی و رفع موانع بیولوژیکی سلول درمانی و توسعه پروتکل‌های جدید تکثیر، تمایز، انتقال سلول‌ها به بیمار و پایش Monitoring فرآیند تولید سلول و درمان در حال انجام است. با این وجود، اغلب کاربردهای درمانی این سلول‌های ارزشمند نیازمند تولید مقادیر زیادی سلول هدف با خصوصیات کاملاً مشخص، تعریف شده و یکسان بوده و مقدار سلول مورد نیاز پروتکل‌های سلول درمانی شامل بافت‌های مهندسی شده و با توجه به کارایی روش انتقال از ده‌ها میلیون تا چند میلیارد سلول متفاوت است. به عنوان مثال برای جایگزینی بافت عضله قلب پس از سکته قلبی به ۱ الی ۲ میلیارد سلول کاردیومیوسیت Cardiomyocyte نیاز است [۵]. همچنین برای درمان دیابت نوع ۱ یک بیمار با وزن ۷۰ کیلوگرم و رهایی از وابستگی به انسولین پس از پیوند به ۱۰۹ × ۱/۳ سلول β تولید کننده انسولین نیاز است و تولید کبد مصنوعی با ۱۰ میلیارد سلول کبدی (۲۰-۱۰ درصد سلول‌های کبد) می‌تواند باعث بهبودی یک بیمار دارای عارضه حاد کبدی شود [٦و ۷]. بنابراین انتقال یافته‌های ارزشمند آزمایشگاهی به‌دست آمده به کاربردهای درمانی مستلزم توسعه روش‌ها و سیستم‌های کشت پویا Dynamic، مقیاس‌پذیر Scalable، با کارایی بالا و قابل اعتمادی است که قادر به تکثیر و تولید سلول‌های بنیادی جنینی تمایز نیافته و سلول‌های تمایز یافته از آن‌ها با کارایی بالا به میزان مناسب برای اهداف درمانی، با خصوصیات کاملاً مشخص و یکسان و تحت استانداردهای جهانی سلول درمانی Good Manufacturing Practice (GMP) باشد. از این‌رو در دهه اخیر توسعه انواع محیط‌های کشت دارای اجزا و ترکیبات مختلف، پروتکل‌های کشت، سیستم‌های کشت و بیوراکتورهای مختلف [۸-۱۳] برای اهداف ذکر شده مورد توجه بسیاری از محققین و شرکت‌های تجاری مرتبط قرار گرفته است [١٤و ١٥]. با این وجود و علیرغم تلاش‌های بسیار و پیشرفت‌های چشمگیر به‌دست آمده، طراحی سیستم کشت مناسب برای اهداف درمانی سلول‌های بنیادی پرتوان جنینی به دلیل دشوار بودن شرایط کشت، موانع بیولوژیکی و تأثیر عوامل چند گانه کاملاً توسعه پیدا نکرده است. بنابراین برای توسعه سیستم کشت موفق مناسب اهداف سلول درمانی، شناسایی و بررسی دقیق عوامل مؤثر بر تکثیر (حفظ خود نوزایی Self-renewal) و تمایز مانند محیط کشت، فاکتورهای رشد Growth factor، ماتریکس خارج سلولی Extracellular matrix، ارتباطات و سیگنالینگ بین سلولی و پارامترهای سیستم کشت مانند pH، غلظت اکسیژن و تنش برشی Shear stress ضروری است. هدف از این مقاله مروری اشاره به آخرین پژوهش‌های مرتبط انجام شده در سال‌های اخیر، دستاوردهای به‌دست آمده در زمینه طراحی سیستم کشت تکثیر سلول‌های مذکور در مقیاس بالا و چالش‌های پیش رو است.

خودنوزایی و تکثیر

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های زیادی در زمینه تعیین شرایط کشت و شناسایی فاکتورهای مولکولی خاص که باعث حفظ حالت خود نوزایی و تکثیر مناسب در سلول‌های جنینی پرتوان می‌شوند، حاصل شده است. در حقیقت تفاوت و

چالش اصلی تکثیر سلول‌های بنیادی و سلول‌های حیوانی که امروزه در مقیاس بالا (تا چند هزار لیتر) برای تولید سلول و متابولیت‌های آن‌ها به آسانی تکثیر می‌شوند، لزوم حفظ حالت خودنوزایی در سیستم‌های تکثیر سلول‌های بنیادی است. حالت خود نوزایی مکانیسم و فرآیندی است که باعث تکثیر و تقسیم سلول بنیادی و تولید سلول‌های بنیادی جدید بدون ایجاد تمایز می‌شود. در واقع حالت خود نوزایی یک مکانیسم درون سلولی است که از طریق علایم خارج سلولی کنترل شده و کارکرد سلول در بافت را مشخص می‌کند. بنابراین حفظ خودنوزایی، مهمترین عامل مؤثر در طراحی سیستم کشت برای تکثیر سلول‌های بنیادی به شمار می‌رود. در حال حاضر تن‌ها امکان کشت و تکثیر موفق سلول‌های بنیادی جنینی به صورت طولانی و بدون از دست دادن حالت بنیادینگی وجود دارد. از این‌رو این سلول‌های با ارزش به عنوان مناسب‌ترین مدل تحقیقاتی برای درک مکانیسم خودنوزایی علاوه بر کاربردهای درمانی به شمار می‌روند. امروزه بررسی الگوی کلی بیان ژن برای شناسایی مسیرهای ملکولی خودنوزایی سلول‌های بنیادی مختلف و شناسایی، غربالگری و تولید انواع فاکتورهای مهم مؤثر در حفظ خودنوزایی سلول‌های بنیادی در حال انجام است (شکل ۱) [۱۶و ۱۷].

شکل ۱. عوامل مهم مؤثر بر حفظ خودنوزایی و تکثیر

تأثیر رده سلول

یکی از عوامل بسیار مهم که می‌بایست در ابتدا برای طراحی سیستم کشت برای تکثیر سلول‌ها مدنظر قرار گیرد، تأثیر رده سلولی است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که رده‌های سلولی مختلف پاسخ متفاوتی به سطوح مختلف عوامل تأثیر گذار و تیمارها نشان داده و سیستم کشتی که برای تکثیر و تمایز یک رده مشخص سلولی توسعه داده شده است را به طور قطعی نمی‌توان برای رده سلولی دیگر پیشنهاد کرد. همچنین با وجود تشابهات بسیار میان سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های پرتوان القایی، پاسخ آن‌ها نسبت به شرایط کشت متفاوت بوده و طراحی سیستم کشت باید بر اساس رده سلولی هدف انجام پذیرد [۱۳و ۱۵].

تأثیر محیط کشت، فاکتورهای رشد و دیگر ترکیبات محلول

جستجو و شناسایی و ایجاد کتابخانه‌هایی از ملکول‌های کوچک و عوامل محلولی که باعث حفظ خودنوزایی در سلول‌های بنیادی جنینی و پرتوان القایی می‌شوند، پیشنیاز اصلی تولید محیط کشت‌های کاملا تعریف شده برای تکثیر و تمایز این سلول‌ها است. در اولین گزارشی که در مورد جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جنینی انسانی منتشر شد، از سلول‌های فیبروبلاست جنینی موشی به عنوان سلول‌های تغذیه کننده Feeder و حفظ حالت خود نوزایی پر توان در سلول‌های بنیادی انسانی جداشده از بلاستوسیست استفاده شد [۱۸]. سلول‌های تغذیه کننده فیبروبلاست انسانی Human fibroblast feeder مانند فیبروبلاست‌های پوست ختنه‌گاه، فیبروبلاست‌های تولید شده از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و مشتقات تولید شده از آن‌ها از دیگر سلول‌های تغذیه کننده و مشتقات متعددی هستند که قادرند خود نوزایی را در سلول‌های بنیادی جنینی حمایت کنند [۱۹]. با وجود اینکه استفاده از این نوع سلول‌ها در سطح آزمایشگاهی بسیار

اقتصادی و مؤثر است، متغیر بودن کیفیت و ترکیب هر محیط در هر مرحله و دفعات تولیدی با توجه به شرایط متفاوت آماده‌سازی و امکان انتقال عوامل خارجی Xenogenic or infectious agents و عفونی از معایب عمده این محیط‌ها به شمار می‌رود. از این‌رو استفاده از محیط های تعریف شده با منشاء انسانی Defined, humanized media برای کشت و تکثیر در سیستم‌های کشت مقیاس‌پذیر (Scalable culture system) بسیار ایده‌ال بوده و مورد توجه بسیاری از محققین و شرکت‌های تجاری قرار گرفته است. به این منظور تحقیقات گسترده‌ای برای بررسی عوامل مؤثر بر مکانیسم خود نوزایی در سلول و شناسایی اجزا و ترکیبات محیط کشت که در حفظ خود نوزایی و تمایز نقش مؤثری دارد انجام شده و فاکتورهای رشد مختلفی مانند فاکتورهای محلول پروتئینی و لیپیدی به صورت ترکیبی و انفرادی به عنوان فاکتورهای مؤثر پیشنهاد شده‌اند.

بررسی‌ها نشان داده‌اند که استفاده از فاکتور رشد فیبروبلاستی ساده Basic fibroblast growth factor (bFGF) در محیط‌های تعریف شده و محیط‌های مغذی شده (Conditioned medium) به خوبی باعث حفظ خود نوزایی در سلول‌های بنیادی جنینی انسانی می‌شود [۲۰و ۲۱]. اما پایداری کم این فاکتور رشد، استفاده از آن‌را در سیستم‌های مقیاس‌پذیر محدود کرده و مهندسی آن برای افزایش میزان پایداری برای استفاده مؤثر در سیستم‌های کشت مقیاس‌پذیر ضروری است [۲۲]. TGFβ (Transforming growth factor beta)، Activin A، و Nodal و IGFs (Insulin-like growth factors) دیگر فاکتورهای رشد مؤثری است که نقش آن‌ها در مکانیسم خود نوزایی به اثبات رسیده است [۲۳]. در مورد لیگاند Wnt نیز هر دو مکانیسم حفظ خود نوزایی و تمایز به سمت سلول‌های مزودرم در غلظت‌ها و حضور لیگاندهای مختلف گزارش شده است [۲٤و ۲۵]. همچنین آنالیز شیمیایی محیط‌های مغذی شده و غیرمغذی شده نشان داده است که فاکتورهایی که باعث حفظ خود نوزایی سلول می‌شود در محیط مغذی شده بسیار غنی هستند. مطالعات مشابهی گزارش کرده‌اند که Activin A، IGF1 و TGF-β1 فاکتورهای رشدی است که به‌وسیله سلول‌های تغذیه کننده مانند سلول‌های جنینی انسانی (Human Fetal cells)، سلول‌های نوزاد (Neonatal) و سلول‌های فیبروبلاست موشی به محیط ترشح می‌شود [۲٦]. خوشبختانه در حال حاضر، شناسایی و بررسی گسترده فاکتورهای مؤثر در حفظ خودنوزایی منجر به تولید تعداد معدودی محیط کشت‌های انسانی کاملا تعریف شده در سطح تجاری شده است که حاوی بعضی از لیگاندهایی که تاکنون ذکر شد است. به عنوان مثال محیط کشت mTeSR که حاوی TGFβ1 ، Lithium chloride، LiCl، γ-Aminobutyric acid GABA، bFGF و اسید پیپکولیک است قادر است خودنوزایی سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های پرتوان القایی انسانی را به مدت طولانی تضمین کند. محیط StemPro نیز محیط تجاری دیگری است که به این منظور تولید شده و حاوی IGF1، bFGF، Activin A، HRG1β Heregulin 1β و دیگر ترکیبات مؤثر است [۲۷].

از میان ملکول‌های لیپیدی، کارایی اسفنگولیپیدهای فسفاته (Sphingosine-1-phosphate) نیز بر خودنوزایی و جلوگیری از تمایز خودبه‌خودی به اثبات رسیده است [۲۸و ۲۹]. همچنین استفاده از آلبومین و مواد مصنوعی به عنوان حامل لیپیدها برای اتصال به سطح سلول در محیط کشت‌های تعریف شده برای حفظ خود نوزایی بررسی شده و نتایج خوبی حاصل شده است [۳۰و ۳۱]. به‌طور کلی، با این وجود شناسایی بسیاری از فاکتورهای رشد مؤثر، اثبات کارایی آن‌ها و افزایش روزافزون دانش محققین در این زمینه، مکانیسم عملکرد فاکتورهای معرفی شده در حفظ حالت پرتوانی سلول‌ها به‌ویژه سلول‌های بنیادی بالغین تا حدود زیادی ناشناخته مانده است. به عنوان مثال سال‌ها مطالعه و تلاش برای کشت موفق سلول‌های مغز استخوان انسانی تا حدی زیادی ناکام بوده است. از این‌رو دانشمندان در حال پاسخگویی به این سؤوالات

هستند:

چرا سلول‌های بنیادی جنینی می‌توانند برای یکسال و حتی بیشتر در آزمایشگاه کشت داده شوند؟

و اینکه که چه فاکتورهایی در اندام‌های زنده تکثیر و حفظ خودنوزایی را به طور عادی تنظیم می‌کند؟

دستیابی به پاسخ این سؤوالات می‌تواند به محققین در کشت موفق‌تر سلول‌های بنیادی جنینی و غیرجنینی در شرایط آزمایشگاهی، استاندارد کردن روش کشت و بهینه سازی ترکیب محیط کشت تعریف شده برای حفظ خود نوزایی کمک شایانی نماید.

تأثیر ماده زمینه برون سلولی

یکی از عوامل مهم دیگر مؤثر بر تکثیر و خود نوزایی سلول‌های بنیادی جنینی، لزوم وجود یک بستر مناسب (**ماده زمینه برون سلولی**) است که تمایز خودبه‌خودی سلول‌ها را به حداقل رسانده و تکثیر مناسب را تضمین کند [۳۲]. سلول‌های تغذیه کننده و ماتریژل Matrigel (غشای استخراج شده از سلول‌های کارسینومای موشی) ماتریس‌های متداول برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی هستند. پیچیده بودن، نامشخص بودن کامل ترکیب و زئوژنیک Xeogenic (تولید شده از گونه‌هاهای متفاوت سلولی یا جانوری) بودن و متغیر بودن کیفیت این ماتریکس‌ها از مهمترین معایب استفاده از آن‌ها به شمار می‌رود. ماده زمینه جداسازی شده از سلول‌های انسانی مانند سلول‌های مزانشیمی و سلول‌های فیبروبلاست پوست ختنه‌گاه می‌توانند به عنوان جایگزین برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی مورد استفاده قرار گیرند [۱۹و ۳۱]. با این وجود استفاده از یک ماده زمینه خارج سلولی کاملا مشخص و تعریف شده یا استفاده از زیست مواد Biomaterial برای یک محیط کشت انسانی برای تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی انسانی ضروری است. در سال‌های اخیر مواد زمینه تعریف شده Defined matrices متعددی به عنوان سوبسترای مناسب برای خودنوزایی سلول‌های بنیادی جنینی معرفی شده‌اند. فیبرونکتین انسانی به همراه TGFβ1، ویترونکتین انسانی Human vitronectin، کلاژن نوع ۱ به همراه هپارین، انسولین، ترانسفرین، bFGF و آلبومین اتصال یافته با اولئیک اسید، کلاژن نوع ۵ به همراه ویترونکتین، لامینین و فیبرونکتین در محیط mTeSR، لامینین-۵۱۱ Laminin-511 نوترکیب، پپتیدهای تثبیت شده نمونه‌ای از این مواد زمینه است [۲۰و ۳۳-۳۷]. با این وجود مقایسه کارایی این مواد زمینه با ماتریژل در سرم انسانی یا جنینی گاوی نشان داد که کارایی ماتریژل بالاتر بوده و تن‌ها ترکیب کلاژن نوع۱ و ۵، فیبرونکتین و لامینین در محیط کشت MEF تیمار شده و محیط تجاری StemPro توانست تا مدت زیادی خودنوزایی را حمایت کند [۲۷و ۳۸]. علاوه‌براین مواد زمینه سنتتیک مانند هیدروژل‌های پلیمری دارای گروه‌های پپتیدی برای چسبیدن سلول، پلیمرهای سنتتیک بر پایه متاکریلات Methacrylate-based polymers و کپسولاسیون در هیالورونیک اسید و آلژینات نیز به دلیل هزینه پایین و تکرارپذیری برای استفاده به عنوان مواد زمینه برون سلولی پیشنهاد شده‌اند [۳۹-۴۱]. با توجه به روند مطالعات انجام شده اخیر، شناسایی گروه‌های فعال مواد زمینه تولید شده بر پایه انسانی، تولید مواد زمینه نوترکیب بر پایه انسانی و تولید زیست مواد کاملاً تعریف شده، تکنولوژی‌های کارآمد مورد استفاده جهت تولید مواد زمینه در آینده خواهند بود.

تأثیر ارتباطات بین سلولی

ارتباطات بین سلولی نیز از عوامل بسیار مهم و مؤثر بر خودنوزایی سلول‌های بنیادی جنینی و طراحی سیستم کشت موفق به شمار می‌رود. ماهیت چسبنده سلول‌های بنیادی جنینی و وابستگی این سلول‌ها به چسبیدن به یکدیگر برای ارتباط مؤثر و انتقال علایم سلولی و در نهایت حفظ خودنوزایی یکی از مهمترین مشکلات و عواملی است که در

تکثیر موفق در سیستم کشت نقش به‌سزایی دارد. به‌طورکلی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به‌صورت کلونی در بسترهای مسطح به خوبی کشت داده می‌شوند در حالی‌که کشت سلول‌ها به صورت سه بعدی باعث افزایش تمایز می‌شود. براساس محصول مورد انتظار از سلول روش‌های کشت متفاوتی مورد استفاده قرار می‌گیرد به عنوان مثال به صورت تک لایه Monolayer (سلول‌های پیش‌ساز پانکراس)، تجمع سلولی (سلول‌های عضله قلبی Cardiomyocyte) یا در داربست Scaffold (سلول‌های مغز استخوان). اما طراحی سیستم کشت برای تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی بایستی به گونه‌ای باشد که علاوه بر فراهم نمودن مؤثر ارتباطات بین سلولی، امکان تکثیر در شرایط سه بعدی و دینامیک را برای سهولت تکثیر و حفظ خودنوزایی فراهم سازد. برخلاف سلول‌های بنیادی جنینی موشی که قادر به تکثیر به‌صورت سلول انفرادی است، سلول‌های بنیادی جنینی و پرتوان القایی انسانی به صورت انفرادی و دسته‌های کوچک به خوبی رشد نکرده و کلونی‌های بزرگ نیز در معرض تمایز خودبه‌خودی هستند. معمولاً برای حفظ خودنوزایی در سلول‌ها، از روش‌های مکانیکی یا شیمیایی (آنزیمی) برای نگهداری سلول‌ها در اندازه مناسب استفاده می‌شود. تیمار مکانیکی و پاساژ دادن بسیار وقت‌گیر و مشکل بوده و تیمار آنزیمی نیز باعث تولید کلونی‌های ناهمگن و ناپایداری کروموزومی در بعضی رده‌های سلولی می‌شود. بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند که افزودن ممانعت کننده ROCK Rho-associated kinase به محیط کشت و شوک حرارتی و جستجوی منابع مختلف آنزیمی که آسیب کمتری به سلول وارد می‌کند، می‌تواند باعث زنده ماندن سلول‌های منفرد در توده‌های سلولی ناهمگن و افزایش یکنواختی سیستم شود [۱۳]. استفاده از ریز چاهک‌ها Microwell و ریز الگوهای ماتریژلی Matrigel-printed regions نیز یکی از راه‌های کنترل سایز و جلوگیری از تمایز خودبه‌خودی سلول‌ها در مقیاس تکثیر آزمایشگاهی و کوچک است [۴۲و ۴۳].

علاوه‌براین، بررسی‌ها نشان داده‌اند که اندازه کلونی سلول بنیادی بر مسیر تمایزی کلونی نیز مؤثر است. به‌طوری‌که در مورد اجسام سلولی شبه جنینی تولید شده از کلونی‌های بزرگ‌تر تمایز به سمت رده سلولی عصبی و کلونی‌های کوچک تمایز به سمت سلول‌های اندودرم دیده می‌شود. از این‌رو کنترل کردن اندازه کلونی‌ها یکی از عومل بسیار مهم در طراحی فرآیند پایین دستی Downstream processing به منظور کاربردهای تمایزی به شمار می‌رود. همچنین در طول رشد نیز افزایش اندازه توده‌های سلولی باعث کاهش انتشار مواد مغذی و اکسیژن به درون توده شده و باعث کندی رشد، ناهمگنی سلول‌ها و تمایز خودبه‌خودی خواهد شد. بنابراین ارایه مکانیسم مؤثر برای کنترل اندازه توده‌های سلولی در حین کشت یا توسعه لاین‌های سلولی که قادر به رشد و تکثیر انفرادی باشند به طراحی موفق سیستم کشت برای تکثیر سلول‌ها در مقیاس بالا کمک شایانی خواهد نمود.

تنش اکسیژن

غلظت اکسیژن یکی از پارمترهای مهم مؤثر در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی است. مطالعات در حالت کشت استاتیک نشان داده‌اند که غلظت‌های اکسیژن پایین باعث کاهش تمایز و افزایش تکثیر می‌شود. به عنوان مثال رشد سلول‌های بنیادی موشی و انسانی در غلظت اکسیژن ۲ تا ۵ درصد بیشتر از غلظت اکسیژن ۲۰ گزارش شده و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی نیز در غلظت اکسیژن ۳ الی ۵ درصد نسبت به ۲۰ درصد کاهش پیدا کرده است [۴۴و ۴۵]. در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز کاهش غلظت اکسیژن تا سطح ۲ درصد در ابتدا باعث افزایش زمان فاز تأخیری رشد و سپس باعث افزایش رشد در مقایسه با غلظت اکسیژن ۲۰ درصد شد [۴۶]. همچنین بررسی‌ها نشان

داده‌اند که کاهش غلظت اکسیژن باعث کاهش اثر اکسیداتیو آن بر سلول شده و بهینه‌سازی غلظت اکسیژن در توسعه پروتکل کشت و تمایز ضروری است [٤٤, ٤٧و ٤٨]. بنابراین یکی از پارامترهای مهم و مؤثر در طراحی سیستم کشت در مقیاس بالا، بررسی و شناسایی غلظت اکسیژن بهینه برای تکثیر یا کاربرد تمایزی مورد انتظار است. استفاده از مدل‌های ریاضی انتشار اکسیژن که برای تومورها یا توده‌های سلولی کروی توسعه داده شده‌اند نیز می‌تواند برای تعیین میزان اکسیژن بهینه در کشت سلول‌های بنیادی جنینی نیز مفید باشد [٤٩].

همزدن و تنش‌های مکانیکی در اثر نیروهای برشی

در حال حاضر سلول‌های بنیادی جنینی و پرتوان القایی در شرایط آزمایشگاهی به صورت پایا Static و بدون کنترل پارامترهای رشد مانند غلظت اکسیژن و pH انجام می‌شود. اما لازمه تکثیر سلول‌ها در مقیاس بالا افزایش حجم کشت است که این افزایش مقیاس باعث ناهمگنی شرایط کشت و در نهایت غیریکنواختی سلول‌های به‌دست آمده خواهد شد. بنابراین برای دستیابی به تکثیر و حتی تمایز مناسب، طراحی سیستم‌های کشت پویایی Dynamic که قادر به ایجاد شرایط رشد همگن، کنترل دقیق پارامترهای رشد و کشت سه بعدی سلول‌های بنیادی جنینی و پرتوان القایی انسانی باشند، ضروریست. همزدن یا ایجاد جریان Perfusion فرآیندهایی است که نقش اصلی را در فراهم نمودن شرایط همگن برای حفظ خودنوزایی سلول‌ها، عدم تمایز و عدم وجود گرادیان غلظت مواد و گازها در سیستم کشت تکثیر ایفا می‌کند. علاوه‌براین، هنگامی‌که سلول‌ها به‌صورت تجمعات سلولی Aggregate یا با استفاده از ریز حامل‌ها Micro-carrier کشت داده می‌شوند، استفاده از همزدن برای معلق نگه داشتن سلول‌ها ضروری است. اما همزدن مستمر یا ایجاد جریان در سیستم‌های کشت پویا و مقیاس پذیر باعث اعمال تنش برشی و نیروی مکانیکی به سلول‌ها می‌شود. با وجود اینکه اطلاعات کمی در مورد تأثیر نیروهای مکانیکی بر خودنوزایی و تکثیر سلول وجود دارد، بررسی‌ها نشان داده‌اند که نیروهای تولید شده می‌تواند باعث تمایز خودبه‌خودی شود [۵۰و ۵۱]. تنش برشی ناشی از ایجاد جریان در سیستم کشت می‌تواند باعث تغییر مورفولوژی سلول‌های تمایز نیافته و افزایش طول و گستردگی سلول‌ها شود. از این‌رو در نظر گرفتن این عامل مهم در طراحی سیستم کشت برای تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که تنش‌های برشی که می‌تواند باعث تغییر مورفولوژی یا مرگ سلول شود بسیار وابسته به رده سلولی مورد استفاده و کاربرد مورد انتظار است. به‌طور کلی طراحی سیستم کشت باید به گونه‌ای انجام شود که حداقل نیروی برشی به سلول‌ها اعمال شود. اضافه کردن بعضی مواد مانند سرم، پلورونیک پلی‌ال‌ها Pluronic polyols، سلولز و دکستران که از طریق افزایش ویسکوزیته محیط کشت باعث کاهش حساسیت سلول به تنش برشی می‌شود، به عنوان روشی مؤثر در کشت به صورت سه بعدی و پویا توصیه شده است [۵۲, ۵۳].

طراحی سیستم‌های کشت برای تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی و پرتوان القایی در مقیاس بالا و مشکلات آن

همان‌طور که پیش از این اشاره شد، کاربردی شدن استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و پرتوان القایی برای اهداف سلول درمانی نیازمند تولید تعداد زیادی سلول است. همچنین میزان مورد نیاز سلول به استراتژی انتقال سلول به بیمار و قابلیت زنده ماندن و کارایی سلول‌ها درون بدن بیمار بستگی دارد. بنابراین با توجه هدف و کاربرد مورد

نظر می‌بایست سیستم کشتی توسعه داده شود که قادر باشد میزان سلول مورد نیاز را با مشخصات کیفی و فیزولوژیکی کاملا تعریف شده و مشخص برای هدف خاص تولید کند. طراحی سیستم کشت مقیاس‌پذیر برای سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به دلیل ماهیت چسبنده این سلول‌ها و شرایط کشت که قبلاً نیز ذکر شد بسیار پیچیده است و مشکلات فراروانی دارد. به عنوان مثال اگر سلول‌ها به صورت چسبنده کشت داده شوند تکثیر و جداسازی آن‌ها از بستردر مقیاس بالا بسیار دشوار بوده و جداسازی به روش‌های متداول مکانیکی، شیمیایی و آنزیمی نیز باعث آثار مخرب بر سلول و تمایز خودبه‌خودی خواهد شد. از این‌رو کشت سوسپانسیون سلول‌های بنیادی جنینی و پرتوان القایی روی ریز حامل‌ها و به‌صورت توده‌های سلولی Aggregate به دلیل مقیاس‌پذیری مناسب بسیار مورد توجه قرار گرفته است [٥٤و ٥٥]. با این وجود، کشت روی ریز حامل‌ها نیز شامل مشکلات برداشت سول‌ها و نیاز به ریزحامل‌هایی است که تکثیر و حفظ خودنوزایی مناسب سلول‌ها را فراهم کند. کشت توده‌های سلولی در حالت سوسپانسیون نیز با محدودیت انتشار و نفوذ مواد مغذی، فاکتورهای رشد، متابولیت‌های جانبی تولید شده و انتقال گازهای محلول درون توده‌های سلولی مواجه خواهد بود. در عین حال با افزایش میزان همزدن در محیط، تخریب توده‌های سلولی، افزایش تنش برشی و در نتیجه تخریب فیزیکی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی Apoptosis مشاهده می‌شود [٥٦]. ناهمگنی محیط کشت ناشی از گرادیان مواد مغذی و غلظت اکسیژن از دیگر مشکلات سیستم‌های کشت سلول‌های چسبنده و تا حدی سیستم‌های کشت سوسپانسیون است [٥٧]. این پدیده می‌تواند باعث تمایز خودبه‌خودی سلول‌های بنیادی جنینی به انواع سلول‌های ناخواسته یا کاریوتایپ‌های غیرعادی شود. بنابراین سیستم کشت باید به گونه‌ای طراحی شود که علاوه بر ایجاد محیط کشت کاملاً همگن، نیروهای برشی که آثار زیانباری بر سلول دارد را نیز کاهش دهد. بنابراین طراحی سیستم‌های کشت مقیاس پذیر برای تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی بسیار پیچیده‌تر از سلول‌های حیوانی است. همان‌طور که پیش از این ذکر شد، حفظ حالت خودنوزایی در سلول‌های بنیادی جنینی که لازمه تکثیر است، وابسته به حضور فاکتورهای رشد و ماتریس‌های خارج سلولی است که بسیار گران‌قیمت است. ایجاد جریان در محیط کشت یا استفاده از فاکتورهای رشد نوترکیب با پایداری بیشتر می‌تواند باعث کاهش هزینه شود، اما در مقیاس بالای کشت این تدابیر نیز ممکن است اقتصادی نباشد. ناپایداری ژنتیکی و تغییرات در کاریوتایپ سلول‌ها از دیگر مشکلات کشت این سلول‌ها در مقیاس بالا است که می‌تواند باعث ایجاد حالت سرطانی سلول‌ها در محیط *in vivo* شود. بنابراین در مورد کشت در مقیاس بالا به منظور اهداف درمانی حفظ کاریوتایپ سلول‌ها از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. پایش Monitoring حالت تمایزی سلول‌ها نیز یکی از عوامل بسیار مهم در توسعه سیستم‌های کشت مقیاس‌پذیر برای سلول‌های بنیادی جنینی انسانی است. با توجه به اینکه هیچ فرآیند تمایزی نمی‌تواند سلول‌های کاملاً همگنی تولید کند، پایش حالت تمایزی سلول‌ها و اتخاذ تدابیر انتخابی برای جداسازی خالص‌سازی سلول‌ها در حین فرآیند افزایش مقیاس بسیار ضروری است. فرآیندهای تمایزی طراحی شده باید قادر باشد تا جمعیتی خالص از یک سلول، همراه با خصوصیات دلخواه و فاقد هر گونه سلول‌های تمایز نیافته تولید کند. استفاده از گزارشگرهای فلورسان Fluorescent reporter و غربالگری از طریق مقاومت به آنتی بیوتیک مهمترین روش‌های پایش تمایز سلول‌ها به شمار می‌رود که پایداری ژن گزارشگر یکی از عوامل بسیار مهم است که در طراحی این‌گونه سیستم‌های

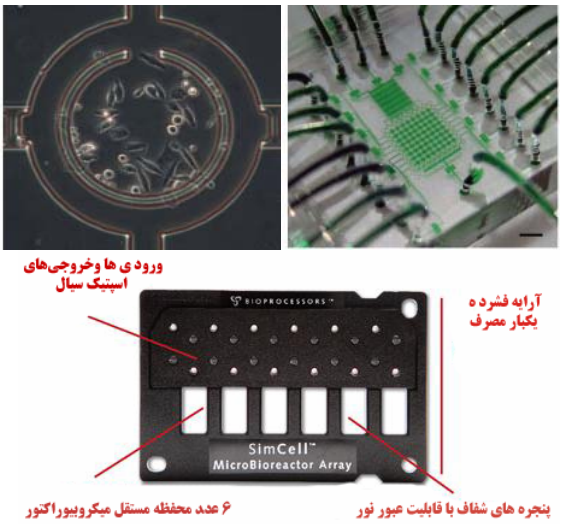
پایش می‌بایست مد نظر قرار گیرد [۵۸]. منطبق بودن سیستم کشت سلول‌های بنیادی جنینی در مقیاس بالا با سیستم کیفی و استاندارد تمرین روش مطلوب تولید GMP نیز یکی موارد مهمی است که می‌بایست در طراحی سیستم کشت برای اهداف درمانی مد نظر قرار گیرد. طراحی و توسعه سیستم و فرآیندهای کشتی که مطابق با استانداردهای GMP باشد نیازمند استفاده از لوازم و تجهیزات استریل مانند اتاق‌های تمیز Clean rooms است. علاوه‌براین استفاده از مشتقات و محصولات حیوانی مانند فیبروبلاست جنینی موشی در کشت سلول انسانی برای اهداف درمانی با اصول GMP مغایرت داشته و لزوماً باید از محیط کشت، سلول‌های تغذیه کننده و ماتریس‌های خارج سلولی برای جداسازی، کشت و تکثیر در مقیاس بالا استفاده شود که عاری از مشتقات حیوانی باشد. همچنین علاوه بر طراحی فرآیندهای کشت در مقیاس بالا تحت اصول و رعایت قوانین GMP، جداسازی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی تحت شرایط GMP نیز برای استفاده به منظور فرآیندهای با درجه بالینی در آینده ضروری است.

علاوه‌بر سلول‌های بنیادی جنینی، پیشرفت‌های اخیر در مورد تولید رده‌های سلولی پرتوان القایی نیز توسعه روش‌های درمانی برای هر بیمار خاص را نیز فراهم ساخته و در آینده نزدیک توسعه سیستم‌های کشت مقیاس پذیر برای تکثیر و تمایز این سلول‌ها برای اهداف درمانی نیز بسیار ضروری است [۵۹, ۶۰]. با توجه به شباهت سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی استفاده از سیستم‌های کشت طراحی شده برای سلول‌های جنینی برای کشت سلول‌های پرتوان القایی امکان‌پذیر است. اما باتوجه ماهیت متفاوت سلول‌های پرتوان القایی این شرایط برای سلول‌های پرتوان القایی بهینه نبوده و برای طراحی و توسعه سیستم‌های کشت مقیاس‌پذیر، رفتار این سلول‌ها نیز باید مانند سلول‌های بنیادی در مورد تمامی عواملی که در مورد سلول‌های بنیادی جنینی ذکر شد، بررسی شود.

سیستم‌های کشت مورد استفاده برای بهینه‌سازی شرایط کشت و تکثیر در مقیاس‌پذیر

سیستم‌های کشت و آرایه‌های High-throughput cellular microarray platforms ریز سیال Microfluidic

با وجود اینکه کاربردهای درمانی سلول‌های بنیادی نیازمند تولید تعداد زیادی سلول و کشت در مقیاس بالا است، بهینه‌سازی شرایط کشت در تکثیر و تمایز پیش از طراحی سیستم‌های مقیاس‌پذیر ضروری است. بیوراکتورهای ریزسیال مهمترین ابزار انجام آزمون‌های بهینه سازی شرایط کشت و کنترل بسیار دقیق شرایط کشت و همچنین فراهم کردن مناسب ریز محیط Micro-environment سلول‌ها برای بعضی کاربردهای مهندسی بافت به شمار می‌رود (شکل ۱).



شکل ۲. سیستم‌های کشت آرایه‌های ریز سیال [۶۱و ۶۲]

پیشرفت‌های اخیر در زمینه طراحی بیوراکتورها در اندازه

میکرو و نانو به همراه پیشرفت تکنولوژی سنسورها امکان ساخت آرایه‌های بیوراکتور برای کشت سلول، کنترل و پایش همزمان رشد و فرآیندهای سلولی را فراهم ساخته است [۸, ۵۰]. آرایه‌های میکروبیوراکتورها دارای کاربردهای فراوانی در جستجوی داروهای جدید Drug discovery، مهندسی بافت و تحقیقات در زمینه سلول‌های بنیادی و سرطان شناسی است [۱۱]. امکان مطالعه دقیق تکثیر، تمایز و تأثیر ریزمحیط بر فرآیندهای سلولی در سطح گسترده و مصرف بسیار کم محیط کشت، فاکتورهای رشد و دیگر ترکیبات گران‌قیمت محیط کشت از مهمترین مزایای استفاده از این بیوراکتورها است.

سیستم‌های کشت سوسپانسیون سلول دیواره چرخان
Rotary cell culture systems (RCC systems)

این بیوراکتورها توسط سازمان هوا و فضای ایالات متحده NASA برای کشت سلول‌ها طراحی شده و مقیاس آن‌ها از سیستم‌های ریزسیال بزرگتر است. محیط کاملاً همگن کشت و عدم تولید نیروهای برشی که باعث صدمه به این سلول‌ها می‌شود، از مزایای مهم این بیوراکتورها به‌شمار می‌رود (شکل ۲). همچنین امکان کشت سه بعدی سلول‌ها به صورت معلق در محیط وجود داشته و همزدن از طریق مکانیسم ریز گرانش Microgravity انجام می‌شود. سیستم انتقال گاز در این بیوراکتورها از طریق غشای نفوذپذیر سیلیکونی و با کارایی بالا انجام شده و سلول‌ها چسبنده را نیز می‌توان بدون نیاز به استفاده از ریز حامل‌ها Microcarriers کشت داد.

اجسام سلولی جنینی انسانی و اجسام سلولی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی به‌طور موفقیت‌آمیزی در این بیوراکتورها کشت داده شده‌اند. به دلیل الزام کشت اجسام سلولی جنینی در حالت سوسپانسیون، توده‌ای شدن Aggregation مانع بزرگی برای توسعه سیستم‌های کشت مقیاس‌پذیر برای تمایز این اجسام سلولی است [۶۳].

شکل ۳. سیستم‌های کشت سلولی دیواره چرخان به‌صورت غیرمداوم و مداوم (ساخت شرکت Synthecon آمریکا)

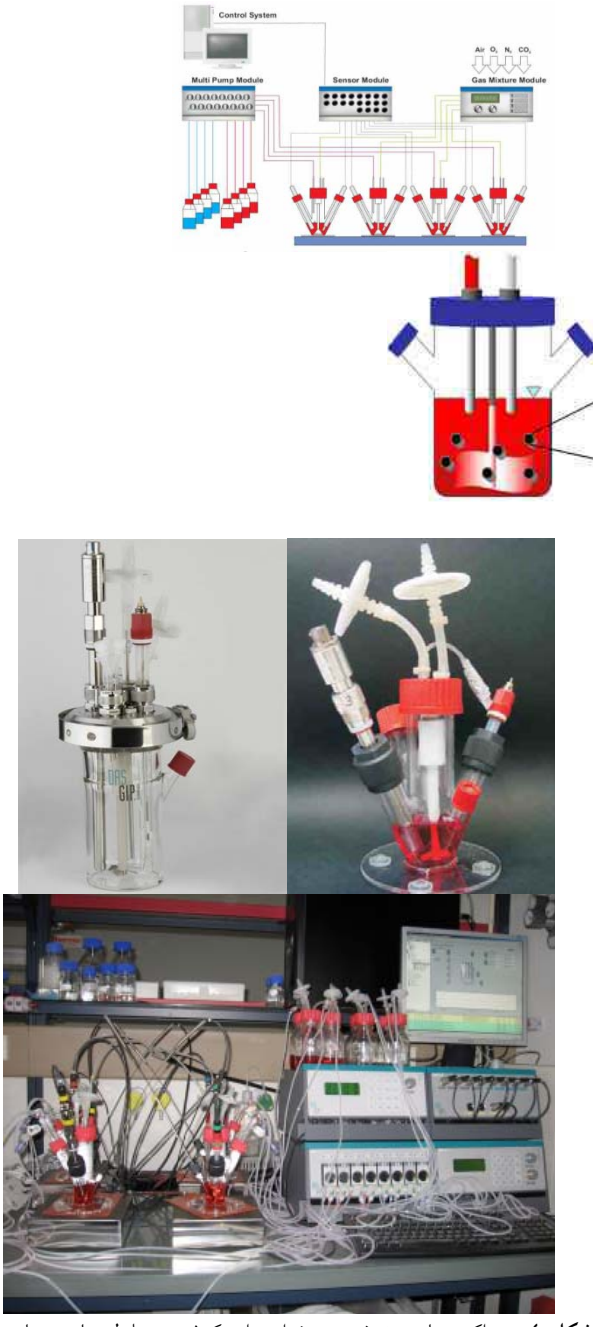
بررسی‌ها نشان داده‌اند که کارایی سیستم‌های کشت چرخان با دور کند Slow turning lateral vessel (STLV) از کشت استاتیک بالاتر بوده و تولید اجسام سلولی جنینی کوچک بدون هسته‌های نکروز شده امکان‌پذیر است. درحالی‌که، سیستم‌های چرخشی با دور تند High aspect rotating vessel (HARV) باعث ایجاد حالت توده‌ای شدید، مرگ سلول‌ها و نکروز گسترده درون توده‌های سلولی جنینی می‌شود [۶۴]. همچنین امکان ایجاد جریان در محفظه کشت Perfusion سیستم‌های سلولی چرخان برای رساندن مواد مغذی به سلول‌ها و خارج کردن متابولیت‌های سلولی مضر وجود داشته که این عمل باعث یکنواختی بیشتر در سیستم کشت و کاهش مصرف محیط کشت می‌شود [۶۵]. در تحقیقی که برای بهبود تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به رده تمایزی عصبی انجام شد، مشخص شده که ایجاد جریان و دیالیز محیط کشت باعث یکنواختی بیشتر سیستم و بهبود کارایی تمایز نسبت به سیستم‌های کشت استاتیک می‌شود. در عین حال با وجود تمامی مزایای ذکر شده، مقیاس کشت در

این بیوراکتورها از نظر حجم و اندازه محفظه کشت محدود بوده و برای کشت سلول به منظور بعضی اهداف درمانی مناسب نیست.

مخازن کشت همزن‌دار برای کشت سوسپانسیون

بیوراکتورهای مخزنی همزن‌دار Stirred-tank bioreactors و اسپینر فلاسک‌ها Spinner flasks مهمترین سیستم‌های کشت همزن‌دار است که به‌طور گسترده در توسعه سیستم‌های کشت سلول‌های حیوانی به‌کار گرفته شده است. از این‌رو استفاده از این نوع بیوراکتورها برای توسعه سیستم‌های کشت مقیاس پذیر سلول‌های بنیادی جنینی انسانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (شکل ۳) [٦٦–٦٨]. بررسی‌ها نشان داده‌اند که کشت در اسپینر فلاسک‌ها می‌تواند باعث بهبود تکثیر، یکنواختی توده‌های سلولی و حفظ قابلیت تمایز به سلول‌های پیش‌ساز مغز استخوان در مقایسه با پلیت‌های ٦ خانه شود [٦٩]. همچنین در مقایسه سیستم‌های کشت همزن‌دار مختلف، سیستم کشت چرخان و سیستم کشت استاتیک مشخص شد که سرعت رشد و میزان اجسام سلولی جنینی در سیستم‌های همزن‌دار بیشتر است. علاوه‌براین، استفاده از اسپینر فلاسک‌هایی که مجهز به همزن شیش‌های Glass Ball Impeller spinner flask (GBI) بود، تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی را به سمت کاردیومیوسیت‌ها افزایش داد [۷۰].

بررسی‌ها نشان داده‌اند که کشت سوسپانسیون سلول‌های بنیادی جنینی با استفاده از ریزحامل‌های پلی استایرن در محیط کشت MEF مغذی شده امکان پذیر است [۷۱]. امکان اتوماسیون، مقیاس‌پذیری و محیط کاملاً کنترل شده از دیگر مزایای سیستم‌های کشت همزن‌دار است که امکان مطالعه تأثیر عوامل مختلف بر رشد و تمایز سلول‌ها فراهم می‌سازد. به عنوان مثال در بررسی اثر غلظت اکسیژن بر رشد توده‌های سلولی جنینی کشت داده شده در اسپینر فلاسک مشخص شده که شرایط هایپوکسیک Hypoxic (غلظت اکسیژن کاهش یافته) رشد سلول افزایش یافته و بیان نشانگرهای مزودرمی و قلبی را افزایش می‌دهد که این روش می‌تواند استراتژی خوبی برای تمایز به سمت سلول‌های قلبی باشد [٦٦و ۷۲].



شکل ٤. بیوراکتورهای مخزنی همزن‌دار برای کشت سلول‌های بنیادی ساخت شرکت Dasgip آلمان

برخلاف توده‌های سلولی جنینی که کشت آن‌ها به صورت سوسپانسیون به خوبی درون بیوراکتورهای همزندار و اسپینرفلاسک‌ها امکان‌پذیر است، سلول‌های تمایز نیافته چسبنده بوده و برای تکثیر نیازمند چسبیدن به سطح هستند که از طریق افزودن ریزحامل‌ها Microcarrier به مخازن کشت همزن‌دار امکان افزایش مقیاس کشت این سلول‌ها نیز وجود دارد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که استفاده از ریزحامل‌های بر پایه دکستران و سلولز که به ترتیب به‌وسیله کلاژن دناتوره شده و ماتریژل پوشش داده شده بود نیز باعث بهبود تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و میزان بیشتر تولید سلول در اسپینر فلاسک در مقایسه با سیستم کشت استاتیک شد [٥٤, ٧٣]. علاوه‌براین، استفاده از ریزحامل‌ها باعث حفظ ظرفیت تمایزی سلول‌ها شده و کارایی آن‌ها در محیط‌کشت‌های دیگر مانند Stempro و mTeSR1 نیز به اثبات رسیده است [٧٤]. علاوه بر تکثیرسلول‌های بنیادی جنینی، توسعه سیستم‌های کشت مقیاس پذیر به منظور تمایز مستقیم این سلول‌ها به اندودرم نیز با موفقیت به‌وسیله سیستم کشت ریزحامل‌ها انجام شده است [٧٤]. استفاده از ریزحامل‌ها برای نگهداری سلول‌های تکثیر شده بنیادی جنینی انسانی در حالت انجماد و بهبود بازیابی آن‌ها پس از انجماد از دیگر کاربردهای این حامل‌ها است که قدم بزرگی در طراحی سیستم‌های کشت مقیاس‌پذیر و رفع محدودیت‌های موجود در روش‌های مرسوم به شمار می‌رود [٧٥].

مقایسه انواع سیستم‌های کشت سوسپانسیون

همان‌طور که پیش از این ذکر شد، با توجه به ماهیت سلول‌های بنیادی جنینی و تأثیر پارامترهای مختلف و پیچیده بر رشد و تمایز سلول‌ها، سیستم‌های کشت محدودی برای تکثیر و تمایز این سلول‌ها در مقیاس بالا توسعه داده شده و با موفقیت نسبی همراه بوده است (جدول ١). همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود سیستم‌های کشت سلول ریزسیال مناسبترین سیستم کشت برای کنترل دقیق شرایط کشت و ریز محیط سلول‌ها در سطح گسترده بوده و ابزار مهمی برای بهینه‌سازی شرایط کشت از قبیل ترکیبات و اجزای محیط کشت مانند فاکتورهای رشد به شمار می‌رود. با این حال به دلیل پتانسیل پایین مقیاس‌پذیری این سیستم‌ها، استفاده از آن‌ها برای طراحی سیستم‌های کشت مقیاس‌پذیر و کشت در مقیاس بالا برای اهداف درمانی توجیه‌پذیر نبوده و تن‌ها در مواردی که کنترل دقیق شرایط ریز محیط به منظور اهداف مهندسی بافت ضروریست، می‌توان از این سیستم‌های کشت استفاده کرد.

جدول ١. مقایسه انواع سیستم‌های کشت سلول‌های بنیادی جنینی انسانی

نوع بیوراکتور	حجم کاری	بیشترین میزان سلول تولید شده hESCs	مزایا	معایب	منبع
سیستم ریزسیال	٠/٢-٠/١ میلی‌لیتر	3×10^{4} Cell/cm^2	کنترل دقیق ریز محیط و غربالگری شرایط کشت در مقیاس وسیع	مقیاس کوچک	[٧٦, ٥٠]
سیستم کشت سلولی چرخان	١٠ الی ٥٠٠ میلی‌لیتر	36×10^{6} Cell/ml	انتقال گاز مؤثر و نیروی برشی پایین	مقیاس پذیری	[٦٤, ٦٥]
سیستم‌های کشت همزن‌دار	٥٠ میلی‌لیتر الی ١٠٠٠٠ لیتر	5×10^{6} Cell/ml	مقیاس‌پذیر محیط کاملاً همگن	تنش برشی بالا	[٦٩, ٧٥]

جدول۲. تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی انسانی در سیستم‌های کشت چرخان و همزندار مختلف در حالت سوسپانسیون

حالت کشت	تکثیر	تمایز	منابع
توده سلولی	۱۵ برابر در ۲۱ روز	$CD34^+CD31^+$ ، سلول‌های پیش‌ساز مغز	[۶۹]
	(فلاسک همزن‌داز با همزن مغناطیسی آویزان)	استخوان، حداکثر ۵ الی ٦ درصد در ١٤ روز	
	۷۰ برابر در ۲۸ روز	تشکیل توده جنینی – بدون تمایز ویژه	[٦٤]
	(محفظه دورانی چرخان با دور آرام)		
	۱/۲ برابر در ۱۰ روز	تشکیل توده جنینی – بدون تمایز ویژه	[۷۰]
	(محفظه دورانی چرخان با دور آرام)		
	٦/٤ برابر در ۱۰ روز	تشکیل توده جنینی – بدون تمایز ویژه	
	(فلاسک همزن‌داز با همزن شیش‌ه‌ای توپی شکل)		
	۲/۲ در ۱۰ روز	تشکیل توده جنینی – بدون تمایز ویژه	
	(فلاسک همزن‌داز با همزن پارویی)		
	۵/٦ برابر در ۷ روز	تشکیل توده سلولی – بدون تمایز ویژه	[۱]
	(فلاسک همزن‌داز با همزن سه گوش و بافل‌های شیشه‌ای)		
	۲/۵ –۲ برابر در ۷ روز	تشکیل توده سلولی – بدون تمایز ویژه	[۱۳]
کشت ریزحامل	۳٤ الی ٤۵ برابر در ۸ روز	تمایز به سمت سلول‌های اندودرم قطعی ($FOXA2^+/SOX17^+$) – با کارایی بیش از ۸۰ درصد	[۷٤]
	٦/۸ برابر در ١٤ روز	–	[۵٤]
	٤/۲ برابر در ۷ روز (۵/۸ برابر در روز ۵)	–	[۷۷]

سیستم‌های چرخان کشت سلول نیز از نظر انتقال گاز و فراهم نمودن محیط با تنش برشی کم برای تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی بسیار مناسب است، اما به دلیل عدم مقیاس‌پذیری مناسب (حداکثر ۵۰۰ میلی لیتر) برای تکثیر و تمایز در مقیاس بالا کاربرد محدودی دارد. از میان سیستم‌های کشت ذکر شده، سیستم‌های کشت همزن‌دار به دلیل مقیاس‌پذیری بسیار مناسب، نویدبخش‌ترین سیستم‌های کشت برای تکثیر و تمایز سلول‌ها در مقیاس بالا بوده و مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته‌اند (جدول ۲).

در عین حال معایب این نوع سیستم کشت عبارتند از:

– میزان بالای تنش برشی در این سیستم‌ها و تخریب سلول‌ها

– لزوم استفاده از ریزحامل‌ها برای کشت سوسپانسیون به دلیل ماهیت چسبنده سلول‌ها و مشکل بودن برداشت سلول‌های تکثیر شده

– تمایز خودبه‌خودی سلول‌ها در اثر تنش بالا

– مشکل بودن کنترل اندازه اجسام سلولی جنینی

بنابراین توسعه سیستم‌های کشتی که علاوه برحفظ یکنواختی در سیستم کشت نیروهای مکانیکی وارده به سلول‌ها را کاهش داده و قادر به کشت سوسپانسیون، حفظ خودنوزایی و تکثیر در مقیاس بالا باشد راه حل مناسبی برای کاربردی شدن این سلول‌های ارزشمند است.

همان‌طور که پیش از این نیز ذکر شد، ماهیت چسبنده سلول‌های بنیادی جنینی یکی از ممانعت‌های بزرگ برای کشت و تکثیر آن‌ها در مقیاس وسیع است، مطالعات نشان داده‌اند که جدا کردن یا جدا شدن مکانیکی و آنزیمی سلول‌های کشت شده به صورت چسبنده باعث ایجاد تمایز

خودبه‌خودی و کاریوتایپ غیرعادی می‌شود. استفاده از ریزحامل‌ها برای کشت سوسپانسیون سلول‌های چسبنده نیز به دلیل دشوار بودن برداشت سلول‌ها و نیاز به اعمال روش‌های مکانیکی یا آنزیمی برای کشت و جداسازی در مقیاس بالا با محدودیت مواجه است. از این‌رو در سال‌های اخیر کشت سلول‌ها به‌صورت سوسپانسیون درون اسپنیر فلاسک‌ها برای کشت کوتاه مدت مورد توجه قرار گرفته است [۱۲, ۱۳و۷۸]. اما با توجه به اینکه کنترل دقیق شرایط رشد در اسپینر فلاسک‌ها به صورت مستقیم مقدور نیست، استفاده از بیوراکتورهای مخزنی همزن‌دار که مجهز به کنترل کننده‌های دقیق شرایط رشد و پایش همزمان است، راه حل مناسبی برای طراحی سیستم‌های کشت مقیاس‌پذیر و توسعه سیستم کشت مقیاس‌پذیر برای تکثیر و تمایز برای اهداف درمانی است. با توجه به مطالب ذکر شده توسعه موفق سیستم‌های کشت مقیاس پذیر برای سلول‌های بنیادی انسانی نیازمند توسعه موفق مراحل زیر است:

– انتخاب سلول مناسب و بررسی شرایط رشد و خصوصیات دقیق آن (برای هدف خاص و تعیین میزان سلول مورد نیاز)

– توسعه و بهینه‌سازی محیط کشت و اجزای آن مانندفاکتورهای رشد بر پایه انسانی از طریق درک دقیق مکانیسم خودنوزایی در این سلول‌ها به منظور توسعه محیط کاملاً تعریف شده و قابل تولید تحت شرایط GMP

– توسعه ماده زمینه برون سلولی بهینه و کاملاً تعریف شده برای حفظ خودنوزایی و قابل تولید تحت شرایط GMP

– توسعه سیستم کشت مناسب برای ایجاد شرایط کاملاً همگن و یکنواخت برای رشد سلول به صورت مقیاس‌پذیر و قابلیت انجام فرآیند تحت شرایط GMP

– بهینه‌سازی شرایط کشت از نظر شرایط فیزیولوژیک از طریق کنترل دقیق و اتوماتیک شرایط رشد مانند غلظت گازها وpH

– توسعه سیستم مقیاس‌پذیر برای تکثیر و تمایز که برداشت سلول را آسان کرده و قابلیت عملکرد تحت شرایط GMP را دارا باشد.

توسعه یک روش سلول درمانی مناسب برای کاربرد درمانی در سطح گسترده نیازمند رعایت همزمان هر یک از عوامل ذکر شده است. علاوه‌براین، موانع بیولوژیکی سلول درمانی، جستجوی مواد زیستی جدید برای سلول درمانی و ترکیب موفق سلول درمانی با مهندسی بافت و دارو رسانی نیز از محدودیت‌ها و موضوعات مهم تحقیقاتی علم سلول درمانی به شمار می‌رود [۷۹و۸۰]. با این وجود پیش‌بینی می‌شود که پزشکی آینده همراه با سلول درمانی خواهد بود و برای به‌کارگیری موفق سلول درمانی در جایگزینی، ترمیم و بازسازی، درک عمیق بیولوژی سلول درمانی برای توسعه سیستم‌های مؤثر کشت، تکثیر و درمان مؤثر ضروریست.

References

1. **Kehoe DE, Jing D, Lock LT, Tzanakakis ES.** Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells. Tissue Eng Part A 2009; 16(2):405.
2. **Docherty K, Bernardo AS, Vallier L.** Embryonic stem cell therapy for diabetes mellitus. Semin. Cell Dev Biol 2007; 18(6):827-38.
3. **Sobajima S, Vadala G, Shimer A, Kim JS Gilbertson LG, Kang JD.** Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. Spine J 2008; 8(6):888-96.
4. **Baharvand H, Mehrjardi N, Hatami M, Kiani S, Rao M, Haghighi M.** Neural differentiation from human embryonic stem cells in a defined adherent culture condition. Int J Dev Biol 2007; 51(5):371.
5. **Jing D, Parikh A, Canty Jr JM, Tzanakakis ES.**

Stem cells for heart cell therapies. Tissue Eng Part B: Reviews 2008; 14(4):393.

6. **Lock LT, Tzanakakis ES.** Stem/progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes. Tissue Eng 2007; 13(7):1399-412.
7. **Allen JW, Hassanein T, Bhatia SN.** Advances in bioartificial liver devices. Hepatology 2001; 34(3):447-55.
8. **Anderson DG, Levenberg S Langer R.** Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2004; 22(7):863-66.
9. **Chen X, Xu H, Wan C, McCaigue M, Li G.** Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24(9):2052.
10. **Cui ZF, Xu X, Trainor N, Triffitt JT, Urban JPG, Tirlapur UK.** Application of multiple parallel perfused microbioreactors and three-dimensional stem cell culture for toxicity testing. Toxicol In Vitro 2007; 21:1318-24.
11. **Fernandes TG, Diogo MM, Clark DS Dordick JS, Cabral J.** High-throughput cellular microarray platforms: applications in drug discovery, toxicology and stem cell research. Trends Biotechnol 2009; 27(6):342-49.
12. **Kehoe DE, Jing D, Lock LT, Tzanakakis ES.** Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells. Tissue Eng Part A 2009; 16(2):405-21.
13. **Singh H, Mok P, Balakrishnan T, Rahmat SNB, Zweigerdt R.** Up scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells. Stem Cell Res 2010; 4(3):165-79.
14. **Améen C, Strehl R, Bj.rquist P, Lindahl A, Hyllner J, Sartipy P.** Human embryonic stem cells: Current technologies and emerging industrial applications. Crit Rev Oncol /Hematol 2008; 65(1):54-80.
15. **Azarin SM, Palecek SP.** Development of scalable culture systems for human embryonic stem cells. Biochem Eng J 2009; 48(3):378-84.
16. **Chen S, Do JT, Zhang Q, Yao S, Yan F, Peters EC, et al.** Self-renewal of embryonic stem cells by a small molecule. Proc Natl Acad Sci 2006; 103(46):17266.
17. **He S, Nakada D, Morrison SJ.** Mechanisms of stem cell self-renewal. Annu Rev Cell Dev Biol 2009; 25:377.
18. **Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282(5391):1145.
19. **Meng G, Liu S, Li X, Krawetz R, Rancourt DE.** Extracellular matrix isolated from foreskin fibroblasts supports long-term xeno-free human embryonic stem cell culture. ***Stem Cells Dev*** 2010; 19(4):547-56.
20. **Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, et al.** Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. Nat Biotechnol 2006; 24(2):185-87.
21. **Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N.** From the cover: effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Science's STKE 2000; 97(21):11307.
22. **Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski JS Gold JD, O'Sullivan C, et al.** Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. Stem Cells 2005; 23(3):315-23.

23. **Saha S, Ji L, De Pablo JJ, Palecek SP.** TGF /activin/nodal pathway in inhibition of human embryonic stem cell differentiation by mechanical strain. Biophys J 2008; 94(10):4123-33.

24. **Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, et al.** A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature 2003; 423(6938):409-14.

25. **Reya T, Clevers H.** Wnt signalling in stem cells and cancer. Nature 2005; 434(7035):843-50.

26. **Prowse ABJ, McQuade LR, Bryant KJ, Marcal HGray PP.** Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media. J Proteome Res 2007; 6(9):3796-807.

27. **Wang L, Schulz TC, Sherrer ES , Dauphin DS, Shin S, Nelson AM, et al.** Self-renewal of human embryonic stem cells requires insulin-like growth factor-1 receptor and ERBB2 receptor signaling. Blood 2007; 110(12):4111.

28. **Inniss K, Moore H.** Mediation of apoptosis and proliferation of human embryonic stem cells by sphingosine-1-phosphate. Stem Cells Dev 2006; 15(6):789-96.

29. **Wong RCB, Tellis I, Jamshidi P, Pera M, Pébay A.** Anti-apoptotic effect of sphingosine-1-phosphate and platelet-derived growth factor in human embryonic stem cells. Stem Cells Dev 2007; 16(6):989-1002.

30. **Garcia-Gonzalo FR, Belmonte JCI.** Albumin-associated lipids regulate human embryonic stem cell self-renewal. PLoS One 2008; 3(1).

31. **Peiffer I, Barbet R, Zhou YP, Li ML, Monier MN, Hatzfeld A, et al.** Use of Xenofree Matrices and Molecularly-Defined Media to Control Human Embryonic Stem Cell Pluripotency: Effect of Low Physiological TGF- Concentrations. Stem Cells Dev 2008; 17(3):519-34.

32. **Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Ashtiani SK.** The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 2005; 38(3):495-503.

33. **Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J.** Feeder layer-and serum-free culture of human embryonic stem cells. Biol Reprod 2004; 70(3):837.

34. **Furue MK, Na J, Jackson JP, Okamoto T, Jones M, Baker D, et al.** Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. Proc Natl Acad Sci 2008; 105(36):13409.

35. **Godier AFG, Marolt D, Gerecht S, Tajnsek U, Martens TP, Vunjak-Novakovic G.** Engineered microenvironments for human stem cells. Birth Defects Res C Embryo today: reviews 2008; 84(4):335.

36. **Braam SR Zeinstra L Litjens S Ward-van Oostwaard D, van den Brink S, van Laake L, et al.** Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. Stem Cells 2008; 26(9):2257.

37. **Azarin SM, Palecek SP.** Matrix Revolutions: A Trinity of Defined Substrates for Long-Term Expansion of Human ESCs. Cell Stem Cell 2010; 7(1):7-8.

38. **Hakala H, Rajala K, Ojala M, Panula S, Areva S, Kellomaki M, et al.** Comparison of biomaterials and extracellular matrices as a culture platform for multiple, independently derived human embryonic stem cell lines. Tissue Eng Part A 2009; 15(7):1775-85.

39. **Saha K, Pollock JF, Schaffer DV, Healy KE.**

Designing synthetic materials to control stem cell phenotype. Curr Opin Chem Biol 2007; 11(4):381-87.

40. **Metallo CM Mohr JC Detzel CJ de Pablo JJ Van Wie BJ Palecek SP.** Engineering the stem cell microenvironment. Biotechnol Prog 2007; 23(1):18-23.
41. **Li YJ, Chung EH, Rodriguez RT, Firpo MT, Healy KE.** Hydrogels as artificial matrices for human embryonic stem cell self-renewal. J Biomed Mater Res Part A 2006; 79(1):1-5.
42. **Bauwens CL, Peerani R, Niebruegge S, Woodhouse KA, Kumacheva E, Husain M, et al.** Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. Stem Cells 2008; 26(9):2300-10.
43. **Moeller HC, Mian MK, Shrivastava S, Chung BG, Khademhosseini A.** A microwell array system for stem cell culture. Biomaterials 2008; 29(6):752-63.
44. **King JA, Miller WM.** Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. Curr Opin Chem Biol 2007; 11(4):394-98.
45. **D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC.** Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. Bone 2006; 39(3):513-22.
46. **Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T.** Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. J Cell Physiol 2005; 207(2):331-39.
47. **Zhao F, Pathi P, Grayson W, Xing Q, Locke BR, Ma T.** Effects of oxygen transport on 3-d human mesenchymal stem cell metabolic activity in perfusion and static cultures: experiments and mathematical model. Biotechnol Prog 2008; 21(4):1269-80.
48. **Ezashi T, Das P, Roberts RM.** Low O_2 tensions and the prevention of differentiation of hES cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(13):4783.
49. **Gassmann M, Fandrey J, Bichet S, Wartenberg M, Marti HH, Bauer C, et al.** Oxygen supply and oxygen-dependent gene expression in differentiating embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(7):2867.
50. **Cimetta E, Figallo E, Cannizzaro C, Elvassore N, Vunjak-Novakovic G.** Micro-bioreactor arrays for controlling cellular environments: Design principles for human embryonic stem cell applications. Methods 2009; 47(2):81-89.
51. **Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, et al.** Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. Am J Physiol-Heart C 2005; 288(4):H1915.
52. **Kallos MS, Sen A, Behie LA.** Large-scale expansion of mammalian neural stem cells: a review. Med Biol Eng Comput 2003; 41(3):271-82.
53. **Fok EYL, Zandstra PW.** Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation. Stem Cells 2005; 23(9):1333-42.
54. **Fernandes AM, Marinho PAN, Sartore RC, Paulsen BS, Mariante RM, Castilho LR, et al.** Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system. Braz J Med Biol Res 2009; 42:515-22.
55. **Lecina M, Ting S, Choo A, Reuveny S, Oh S.** Scalable Platform for hESC Differentiation to Cardiomyocytes in Suspended Microcarrier Cultures. Tissue Eng 2010;16(6):1609-19.
56. **Chisti Y.** Hydrodynamic damage to animal cells.

Crit Rev Biotechnol 2001; 21(2):67-110.

57. **Marks DM.** Equipment design considerations for large scale cell culture. Cytotechnology 2003; 42(1):21-33.
58. **Giudice A, Trounson A.** Genetic modification of human embryonic stem cells for derivation of target cells. Cell Stem Cell 2008; 2(5):422-33.
59. **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al.** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007; 131(5):861-72.
60. **Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al.** Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 2007; 318(5858):1917.
61. **Heath C, Kiss R.** Cell culture process development: advances in process engineering. Biotechnol Prog 2007; 23(1):46-51.
62. **Lee PJ, Hung PJ, Rao VM, Lee LP.** Nanoliter scale microbioreactor array for quantitative cell biology. Biotechnol Bioeng 2006; 94(1):5.
63. **Hammond TG Hammond JM.** Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel. Am J Physiol-Renal 2001; 281(1):12.
64. **Gerecht-Nir S, Cohen SItskovitz-Eldor J.** Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation. Biotechnol Bioeng 2004; 86(5):493-502.
65. **Côme J, Nissan X, Aubry L, Tournois J, Girard M, Perrier AL, et al.** Improvement of culture conditions of human embryoid bodies using a controlled perfused and dialyzed bioreactor system. Tissue Eng Part C: Methods 2008; 14(4):289.
66. **Niebruegge S, Bauwens CL, Peerani R, Thavandiran N, Masse S, Sevaptisidis E, et al.** Generation of human embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor. Biotechnol Bioeng 2009; 102:493-507.
67. **Zandstra PW, Bauwens C, Yin T, Liu Q, Schiller H, Zweigerdt R, et al.** Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. Tissue Eng. 2003; 9(4):767-78.
68. **Dang SM, Zandstra PW.** Scalable production of embryonic stem cell-derived cells. Methods Mol Biol 2005; 290:353-64.
69. **Cameron CM, Hu WS, Kaufman DS.** Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation. Biotechnol Bioeng 2006; 94(5):938-48.
70. **Yirme G, Amit M, Laevsky I , Osenberg S, Itskovitz-Eldor J.** Establishing a dynamic process for the formation, propagation, and differentiation of human embryoid bodies. Stem Cells Dev 2008; 17(6):1227-42.
71. **Phillips BW, Horne R, Lay TS , Rust WL, Teck T, TCrook JM.** Attachment and growth of human embryonic stem cells on microcarriers. J Biotechnol 2008; 138(1-2):24-32.
72. **Forsyth NR, Musio A, Vezzoni P, Simpson A, Noble BS, McWhir J.** Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities. Cloning Stem Cells 2006; 8(1):16-23.
73. **Oh SKW, Chen AK, Mok Y, Chen X, Lim U.** Long-term microcarrier suspension cultures of human embryonic stem cells. Stem Cell Res 2009; 2(3):219-30.
74. **Lock LT, Tzanakakis ES.** Expansion and differentiation of human embryonic stem cells to endoderm progeny in a microcarrier stirred-

suspension culture. Tissue Eng Part A 2009; 15(8):2051-63.

75. **Nie Y, Bergendahl V, Hei DJ, Jones JM , Palecek SP.** Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers. Biotechnol Prog 2009; 25(1):20.
76. **Korin N, Bransky A, Dinnar U, Levenberg S.** Periodic "flow-stop" perfusion microchannel bioreactors for mammalian and human embryonic stem cell long-term culture. Biomed Microdevices 2009; 11(1):87-94.
77. **Oh SKW, Chen AK, Mok Y, Chen X, Lim UM, Chin A, et al.** Long-term microcarrier suspension cultures of human embryonic stem cells. Stem Cell Res 2009; 2(3):219-30.
78. **Steiner D, Khaner H, Cohen M, Even-Ram S, Gil Y, Itsykson P, et al.** Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. Nat Biotechnol 2010; 28(4):361-64.
79. **Ye Z, Mahato RI.** Emerging trends in cell-based therapies. Adv Drug Del Rev 2008; 60(2):89-90.
80. **Kabelitz D, Geissler EK, Soria B, Schroeder IS, Fandrich F, Chatenoud L.** Toward cell-based therapy of type I diabetes. Trends Immunol 2008; 29(2):68-74.