

جدا سازی سلولهای بنیادی مزانشیمی بند ناف موش و تمایز آنها به سلول

های فیبری عدسی چشم

مسعود ملکی^۱، دکتر کاظم پریور^۲، دکتر محمد نبیونی^۳، دکتر پریچهر یغمایی^۴، ناجی محمد^۵

^۱ نویسنده مسئول: مربی گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، ایران E-mail: Maleki.Masoud@gmail.com
^۲ استاد گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
^۳ استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم، تهران، ایران
^۴ استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
^۵ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سلول های بنیادی دارای توانایی خود بازسازی و قدرت میتوزی بالا و امکان تمایز به انواع سلول های تخصص یافته می باشند. ژله وار تون بند ناف منبعی برای سلول های بنیادی مزانشیمی بوده که توان تمایزی بالایی دارند. هدف از این مطالعه بررسی تمایز سلول های بنیادی بدست آمده از بند ناف به سلول های عدسی چشم بود. در مسیر تمایز سلول های فیبری عدسی چشم پروتئین های کریستالین ساخته می شوند بنابر این می توانند به عنوان مارکر تمایز سلول های عدسی چشم مورد استفاده قرار گیرند.

روش کار: در این تحقیق سلول های بنیادی از بند ناف جنین موش جدا شدند. ابتدا آنها به قطعات $2-1 \text{ mm}^3$ قطعه قطعه شده و با محلول آنزیم کلاژناز نوع IA انکوبه گردیدند و بدنبال آن به طریق مکانیکی عمل پیپت کردن انجام شد. سوسپانسیون سلولی در فلاسک های کشت 25 cm^2 کشت داده شدند. بعد از پاساژ اول کیت تشخیص آلکلین فسفاتازی جهت شناسایی سلول های بنیادی تمایز نیافته استفاده گردید. در گروه تجربی سلول های بنیادی با زجاجیه چشم گاو و محیط کشت در حجم های $1:3$ کشت داده شدند. عصاره پروتئینی در روز دهم بعد از القا تهیه شده و در ژل پلی آکریل آمید مورد آنالیز قرار گرفت. سپس پروتئین ها بر روی کاغذ نیتروسولولزی انتقال داده شدند. عصاره عدسی چشم رت به عنوان گروه کنترل مثبت استفاده شد. آنتی بادی بر علیه αA - crystallin و αB - crystallin، آنتی بادی نانوپه و vectastain ABC- kit (standard) و Vector blue alkaline phosphatase substrate kit III مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته ها: یافته ها نشان دادند که سلول های بنیادی بند ناف موش فعالیت آلکلین فسفاتازی دارند. بررسی شکل ظاهری سلول های گروه تجربی و نیز جدا سازی پروتئین های سلول ها و استفاده از آنتی بادی ویژه در این گروه ها نشان دهنده تمایز در این سلول ها بود.

نتیجه گیری: بند ناف موش می تواند منبع مناسبی برای سلول های بنیادی مزانشیمی باشد. این سلول ها شکل ظاهری شبه فیبروبلاستی داشتند که در گروه تجربی طویل، نازک و موازی هم قرار گرفته بودند. آنالیز الکتروفورز و وسترن بلات نشان دهنده بیان قابل توجه مارکر تکوین اولیه تمایز سلول های فیبری عدسی در گروه تجربی بود.

واژه های کلیدی: کریستالین، سلول های بنیادی مزانشیمی، زجاجیه، سلول های فیبری عدسی

دریافت: ۸۷/۱۰/۲۸ پذیرش: ۸۸/۳/۱۸

مقدمه

سلولهای بنیادی^۱ سلولهایی هستند که در بیشتر موجودات زنده پر سلولی یافت می شوند. از ویژگیهای آنها داشتن توانایی خود بازسازی^۲ و تقسیم میتوزی بالا و قدرت تمایزی به انواع سلولهای تخصص یافته است [۲،۱]. سلولهای بنیادی در پستانداران دو گروه هستند: سلولهای بنیادی جنینی^۳ که در بلاستوسیست و سلولهای بنیادی بالغ^۴ که در بافتهای بالغ یافت می شوند. در جنین در حال تکوین، سلولهای بنیادی می توانند به تمام بافتهای تخصص یافته جنینی تمایز یابند. در دوره بلوغ، سلولهای بنیادی و سلولهای پیش ساز^۵ برای بدن نقش یک سیستم تعمیر کننده بازی می کنند و با جایگزین کردن سلولهای تخصص یافته، چرخه ترمیم بافتها را از جمله خون، پوست و روده و غیره حفظ می کنند. امروزه این سلولهای بنیادی را می توان به سلولهای تخصص یافته بافتهای مختلف رشد و تمایز داده و در اعمال درمانی استفاده کرد [۳]. سلول های بنیادی را از نظر توانایی تمایزی به سلولهای بنیادی همه توان^۶، بسیار توان^۷ و چند توان^۸ تقسیم بندی می کنند که به ترتیب توان تمایزیشان کاهش می یابد. مارکرهای سلولهای بنیادی جنینی شامل Oct-4 [۴] و SSEAs (Stage Specific Embryonic Antigens) [۵] و فعالیت آلکلین فسفاتازی هستند که سلولهای تمایز نیافته جنینی میزان بالایی از فعالیت آلکلین فسفاتازی را هم در سطح خود و هم در سیتوپلاسم نشان می دهند [۶]. منابعی که می توان سلولهای بنیادی مزانشیمی را تهیه کرد شامل مغز استخوان^۹ [۷]، استرومای بند ناف^{۱۰} و بافتهای متنوع

دیگری از جمله: پریوستئوم، استخوان تراکولی، بافت چربی، سینوویوم، ماهیچه اسکلتی، دندانهای شیری، پانکراس، ریه، کبد رویان، مایع آمنیوتیک و خون بند ناف هستند [۹،۸].

امتیاز سلولهای بنیادی مزانشیمی بند ناف:

۱) جدا کردن سلولهای بنیادی از مغز استخوان یک عمل تهاجمی و درد آور بوده و تعداد و توانایی تمایزی آنها با افزایش سن کاهش می یابد [۷].

۲) توانایی تمایزی سلولهای بنیادی بند ناف بیشتر از سلولهای مزانشیمی استخوان است. [۱۰]

۳) استرومای بند ناف دارای سلولهایی با توانایی تکثیر بالا و خطر آلودگی ویروسی پایین است. [۱۱]

۴) دسترسی آسان به بند ناف.

سلول های بنیادی بند ناف انسان توان تمایزی به سلول های چربی، غضروفی، استخوانی، عضله قلبی، عضله اسکلتی، پیش ساز عصبی/گلیایی، نورون دوپامینرژیک و سلول آندوتلیالی را در شرایط *in vitro* دارند [۱۲]. در این مطالعه هدف اول جدا کردن سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف موش و سپس بررسی قدرت تمایزی این سلولها در یک مسیر جدید بود. به این منظور توانایی تمایزی این سلول های بنیادی در مسیر تمایز به سلول های فیبری عدسی چشم مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتئینهای اصلی عدسی چشم کریستالینها هستند که به دو گروه اصلی تقسیم می کنند: α و $\beta\gamma$ [۱۳]. در بلوغ سلولهای فیبری عدسی چشم، اول سلولهای فیبری در ناحیه استوای عدسی از سلولهای پیش ساز بوجود آمده و طویل می شوند [۱۴]. عامل القا کننده تمایز در مسیر سلول های فیبری مایع زجاجیه است که α B-crystallin با وزن ملکولی ۲۰/۱۵۹ کیلو دالتون اولین و تنها کریستالین بیان شده در پلاک عدسی چشم است [۱۶،۱۵]. با داخل رفتن پلاک عدسی α A-crystallin با وزن ملکولی ۱۹/۹ کیلو دالتون بیان شده [۱۵] که در عدسی موش تازه متولد شده ۱۷٪

¹ Stem Cells

² Self- Renewal

³ Embryonic Stem Cells

⁴ Adult Stem Cells

⁵ Progenitor Cells

⁶ Totipotent

⁷ Pluripotent

⁸ Multipotent

⁹ Bone Marrow

¹⁰ Umbilical Cord Stroma

بهمراه ۱۰٪ (Sigma- Fatal bovine serum(FBS) Aldrich, St Louis, USA) کشت داده شدند و فلاسکهای کشت در انکوباتور دارای رطوبت و با CO₂ ۵٪ و دمای ۳۷°C نگهداری شدند.

شناسایی سلولهای بنیادی در محیط کشت:

در این مطالعه بعد از پاساژ اول، از کیت شناسایی فعالیت آلکلین فسفاتازی (CHEMICON) برای نشان دادن سلولهای بنیادی تمایز نیافته استفاده گردید.

روش تهیه زجاجیه Vitreous body :

چشمهای گاو بلافاصله بعد از کشتار (کشتارگاه صنعتی کرج) داخل یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. و در عرض ۶ ساعت مایع زجاجیه را که حالت ژله ای دارد در آورده و با دور بالا (اولتراسانتریفوژ) در دمای ۴°C سانتریفوژ گردیدند تا یکنواخت گردند. سپس مایع زجاجیه یکنواخت در میکروتیوبها الیکوت^۳ و در داخل فریزر ۷۰°C- ذخیره شدند.

بررسی تاثیر زجاجیه بر روی تمایز سلولهای بنیادی استرومایی بند ناف:

در گروه تجربی سلولهای بنیادی استرومایی بند ناف بعد از تشکیل یک لایه سلولی در معرض DMEM به همراه FBS و زجاجیه (القاء کننده) به نسبت ۷۵٪ به ۲۵٪ قرار گرفتند. در گروه کنترل از عدسی چشم رت، عصاره سلولی تهیه شد.

تهیه نمونه ها Sample preparation:

سلولهای چسبیده به بستر کشت و نیز عدسی چشم رت (کنترل) با استفاده از بافر لیز کننده (۲۰mM از Tris-HCl و ۵mM از EDTA) لیز گردیده و برای هموژنیزه کردن از سرنگ با سر سوزن ۱۸ gauge استفاده شد و سوسپانسیون سلولی در دستگاه سانتریفوژ قرار داده شد و محلول رویی^۴ بیرون کشیده شد و بدین ترتیب نمونه های هر دو گروه تجربی و کنترل تهیه گردیدند.

از کل کریستالینهای آن را به خود اختصاص می دهد [۱۷]. پس می توان جهت نشان دادن شروع تمایز، بیان این کریستالین ها را بررسی کرد.

روش کار

آماده کردن حیوان آزمایشگاهی:

در این تحقیق از موش سوری NMRI تهیه شده از مرکز سرم سازی رازی کرج استفاده گردید. روز مشاهده پلاک موکوسی (پلاک واژنی^۱ یا پلاک تاریخ گذاری^۲) در ابتدای واژن روز صفر در نظر گرفته و موشهای حامله در روزهای آخر، به طور معمول بالای روز ۱۸، جراحی و جنینها بیرون آورده شدند. جدا کردن سلولهای بنیادی استرومای بند ناف و کشت اولیه آنها:

جنینها در داخل پتری دیش استریل حاوی محلول Dissection Balanced salt solution (DBSS) قرار گرفتند. بند ناف ها تا حد امکان به قطعه های ۱-۲ mm^۳ قطعه قطعه شدند و قطعه های ریز شده به پتری دیش حاوی Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (BI.R.D Baharafshan) منتقل گردیدند. ۲ cc از محلول آنزیم کلاناز (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) بر روی تکه های بافت ریخته شد و بعد از ۵ دقیقه عمل پیپت کردن Pipetting انجام گرفت (جدا کردن مکانیکی سلولها).

سلول ها با غلظت های ۲×۱۰^۵ سلول در هر سانتی متر مربع (۵×۱۰^۶ سلول در یک فلاسک T-25) از فلاسک (Greiner bio-one) T-25 بدون پوشش پلی-D-لیزین حاوی محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) دارای L-glutamine و سوسپانسیون بی کربنات (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) و یک درصد پنی سیلین/استرپتومایسین (Gibco)

³ Aliquot

⁴ Supernatant

¹ Vaginal Plug

² Plug Date

الکتروفورز Electrophoresis :

در این پژوهش از الکتروفورز یک بعدی استفاده شد. ابتدا ژل جدا کننده در بین صفحه های شیشه ای ریخته شد و سپس ژل Stacking بر روی آن اضافه شد. با قرار دادن شانه، چاهک هایی بر روی ژل ایجاد گردید. به میزان مساوی از پروتئین های هر نمونه در چاهک های دستگاه الکتروفورز (Biometra) ریخته و به مدت ۳ ساعت تحت جریان الکتریکی قرار گرفت تا باندهای پروتئینی از هم جدا شوند.

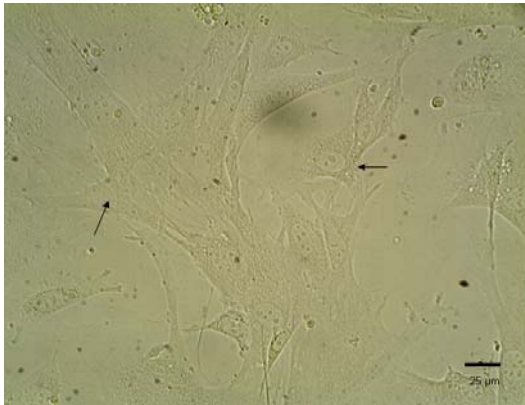
وسترن بلات Western blot و Immunostaining :

برای انتقال باندهای پروتئینی از روی ژل به کاغذ نیتروسولوزی (Fluka- biochemika: GA16285)، در داخل دستگاه انتقال (Cleaver Scientific Ltd) قرار داده شدند و به جریان برق (0.65mA/sq.cm) ژل استفاده شد) وصل گردید. پس از انتقال باندهای پروتئینی بر روی کاغذ نیتروسولوزی جهت شناسایی آلفا- کریستالین ها از آنتی بادی اولیه + alpha A alpha B Crystallin antibody (تهیه شده از شرکت abcam,UK) و سپس آنتی بادی ثانویه Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) made Vectastain ABC-AP Kit (Standard) , in goat VECROR Blue- Alkaline Phosphatase و Substrate Kit III (هر سه مورد از vector,USA تهیه شده بود) استفاده گردید.

یافته ها

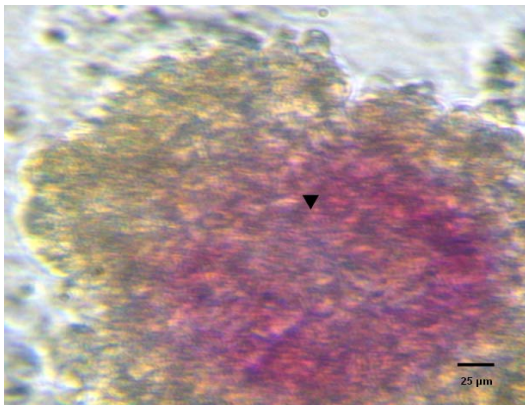
بعد از جدا سازی و کشت سلول های استرومایی بند ناف، با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند که سلول هایی شبیه سلول های فیبروبلاست با زوایدی به اطراف کشیده به بستر فلاسک کشت چسبیده بودند بعد از ۳ روز محیط کشت تعویض شد و سلول های مرده از محیط حذف شدند و چون در بستر کشت اولیه ۸۰٪ از سلول ها چسبیده بودند، پاساژ داده شدند و به چند فلاسک تقسیم گردیدند. نتیجه اولین پاساژ بعد از کشت اولیه تولید لاین

سلولی سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف موش^۱ بود (شکل ۱).



شکل ۱. سلول های بنیادی مزانشیمی (استرومایی) بند ناف بعد از پاساژ دادن (بزرگ نمایی 400X): سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف با علامت پیکان در شکل نشان داده می شود که به بستر کشت چسبیده اند.

با استفاده از کیت شناسایی، مارکر آلکلین فسفاتاز که نشان دهنده وجود سلول های بنیادی جنینی تمایز نیافته در کشت بود نشان داده شد و مکان هایی که در آنها اجتماع سلول های بنیادی وجود داشتند به رنگ قرمز دیده شدند. شناسایی فعالیت آلکلین فسفاتازی در کشت های سلولی به تعداد ۱۰ بار انجام گرفت و در همه موارد نتایج مشابه بدست آمد (شکل ۲).

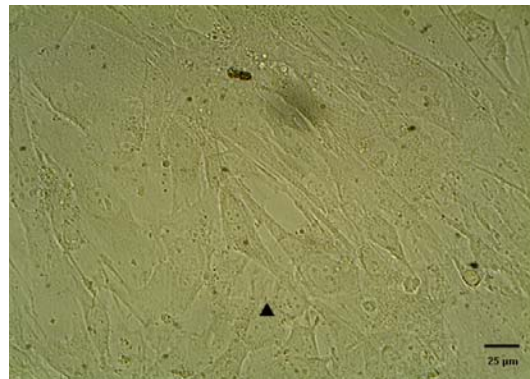


شکل ۲. محدوده ای که به رنگ قرمز در آمده نشان دهنده وجود فعالیت آلکلین فسفاتازی در این ناحیه است که با علامت نوک پیکان در شکل مشخص شده است (بزرگ نمایی 400X).

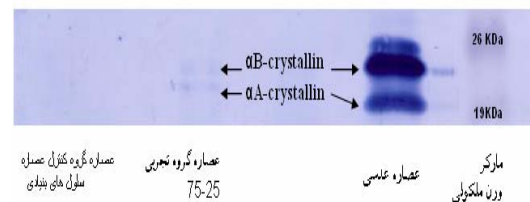
¹ Mouse Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Line

سلول های استرومایی یا مزانشیمی بند ناف به صورت موضعی توسط معرف های این کیت به رنگ قرمز در آمده اند که وجود فعالیت آلکلین فسفاتازی و در نتیجه داشتن ویژگی سلول های بنیادی جنینی را در کشت های سلولی این پژوهش نشان می داد. جالب این است که این فعالیت را کارهای قبلی توصیفی بر ویژگی های سلول های بنیادی جنینی همه توان ارائه داده بودند در حالیکه در مطالعه حاضر، سلول های بنیادی چند توان و از یک بافت بالغ تامین شده بودند که مشاهده شد این سلول ها هم از خود ویژگی های سلول های بنیادی جنینی را نشان می دهند. در پی کارهای گذشته کان^۲ و همکارانش به این فرضیه در مقاله خود اشاره کردند که سلولهای استرومایی بند ناف مکانیسم های تنظیمی مشابهی با سلولهای بنیادی جنینی نشان می دهند، بویژه زمانی که این سلولها از محیط میکرونی^۳ خود که کنام^۴ آنها محسوب می شود جدا شده باشند [۱۲]. در مقایسه با کارهای گذشته اولین باری است که در این پژوهش داشتن فعالیت آلکلین فسفاتازی در سلولهای بنیادی مزانشیمی بند ناف موش نشان داده شد و می توان گفت که داشتن این فعالیت که از ویژگی های سلول های بنیادی جنینی است شاید نشان دهنده این باشد که در این مطالعه هم به علت جدا شدن سلول های مزانشیمی از کنام خود توانایی تمایز آنها افزایش یافته و ویژگی مشابه با ویژگی های سلول های بنیادی جنینی از خود نشان دادند. سوراگاسر^۵ و همکارانش [۱۸] و همچنین قارا حسین اوقلو^۶ و همکارانش نشان دادند که سلولهای استرومایی بند ناف که تازه کشت داده شده، ظاهری شبیه سلولهای فیبروبلاستی (Fibroblast-like Cells) نشان می دهند [۱۹،۱۸].

بررسی شکل ظاهری کشت سلول های بنیادی همراه با ۲۵٪ زجاجیه و ۷۵٪ محیط کشت به مدت ۱۰ روز نشان داد که این سلول ها از نظر شکل ظاهری کشیده تر و به صورت موضعی موازی هم قرار گرفته اند (شکل ۳) و Immunostaining کاغذ نیتروسولولزی بیان هر دو آلفا- کریستالین را در سلول های گروه تجربی نشان داد (شکل ۴).



شکل ۳- عکس میکروسکوپی سلول های گروه تجربی که ۲۵٪ زجاجیه به عنوان القا کننده استفاده شده بود: در روز بعد از کشت سلول ها کشیده تر و فیبری شکل شدند که با علامت نوک پیکان نشان داده شده است (بزرگ نمایی 400X).



شکل ۴. نتیجه Immunostaining فیلتر نیتروسولولزی گروه کشت تجربی و کنترل در روز دهم. (عصاره گروه تجربی ۲۵-۷۵٪ در این گروه محیط شامل ۷۵٪ محیط کشت و ۲۵٪ زجاجیه است).

بحث

پیز^۱ و همکارانش در سال ۱۹۹۰ نشان دادند که سلولهای تمایز نیافته جنینی میزان بالایی از فعالیت آلکلین فسفاتازی را نشان می دهند [۶]. در این پژوهش از کیت شناسایی آلکلین فسفاتازی استفاده شد که در نتایج کار ملاحظه گردید که اجتماعی از

² Can

³ Microenvironment

⁴ Niche

⁵ Sarugaser

⁶ Karahuseynoglu

¹ Pease

آلفا- کریستالین را بیان کردند پس سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف موش تحت عمل القایی زجاجیه می توانند تا مرحله تمایزی مشابه با سلول های جام عدسی پیش بروند در این مرحله هنوز هسته و اندامک ها حضور دارند و سلول شفاف نشده است.

نتیجه گیری

بند ناف موش می تواند منبع مناسبی برای سلول های بنیادی مزانشیمی باشد. این سلول ها شکل ظاهری شبه فیبروبلاستی داشتند که در گروه تجربی طویل، نازک و موازی هم قرار گرفته بودند. آنالیز الکتروفورز و وسترن بلات نشان دهنده بیان قابل توجه مارکر تکوین اولیه تمایز سلول های فیبری عدسی در گروه تجربی بود.

در این پژوهش هم سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف موش از نظر شکل ظاهری شبه فیبروبلاستی بودند که با نتایج کارهای گذشته در مورد سلول های بند ناف انسانی مطابقت داشت. در مسیر تمایزی سلول های فیبری عدسی چشم پروتئین های کریستالین بیان می شود.

گروهی از محققان گزارش دادند که رونویسی از ژنهای کریستالینها در مراحل ابتدایی رشد و نمو انجام می گیرد، بطوری که در پلاک عدسی موش در E9.5، E10 تا E10.5 α B-crystallin و در مرحله E10 تا E10.5 در جام عدسی، α A-crystallin قابل تشخیص هستند [۱۵]. با توجه به کارهای گذشته و شرایطی که بر کشت سلولی گروه تجربی اعمال گردید این سلول ها مسیر تمایزی سلول های فیبری عدسی چشم را شروع کرده و چون هر دو نوع پروتئین

References

- 1- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963; 197: 452-4.
- 2- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 1963; 62: 327-36.
- 3- Tuch BE. Stem cells--a clinical update. *Australian family physician*. 2006; 35: 719-21.
- 4- Schöler HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J*. 1989; 8: 2543-2550.
- 5- Solter D, Knowles BB. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978; 75: 5565.
- 6- Pease S, Braghetta P. Isolation of embryonic stem (ES) cells in media, supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Develop Biol*. 1990; 141:344-352.
- 7- Rao MS, Matton MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev* 2001; 122:713-34.
- 8- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cel Biol*. 2004; 36:568-84.
- 9- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 2003; 21:105-10.
- 10- Lu L, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis- supportive function and other potentials. *Hematopoietic Stem Cells*. 2006; 91: 1017-26.
- 11- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative source of postnatal human mesenchymal stem cells; candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 2003; 21:105-10.

- 12- Can A, Karahuseynoglu S. Concise review: Human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus- derived stem cells. *Stem Cells*. 2007; 25:2886-95.
- 13- Horwitz, J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89:10449–53.
- 14- Beebe DC, Vasiliev O, Guo J, Shui YB, Bassnett S. Changes in adhesion complexes define stages in the differentiation of lens fiber cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2001; 42: 727–34.
- 15- Robinson ML, Overbeek PA. Differential expression of alpha A- and alpha B-crystallin during murine ocular development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1996; 37: 2276–84.
- 16- Haynes JI, Duncan MK, Piatigorsky J. Spatial and temporal activity of the alpha B-crystallin/small heat shock protein gene promoter in transgenic mice. *Dev. Dyn*. 1996; 207: 75–88.
- 17- Ueda Y, Duncan MK, David LL. Lens proteomics: the accumulation of crystallin modifications in the mouse lens with age. *Invest. Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43: 205–15.
- 18- Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*. 2005;23:220 –29.
- 19- Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: In situ and in vitro surveys. *Stem Cells*. 2007; 25:319 –31.