Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol.13, No.1, Spring 2013, Pages 35- 43

Isolation and Characterization of Human Umbilical Cord Wharton's jelly Stem Cells

Zahri S[1], Maleki M[2], Hamidi K[1], Khatami SM[1]*

[1] Department of Biology, School of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2] Department of Biology, Islamic Azad University, East Azarbaijan Sciences & Researchs Branch, Tabriz, Iran

* Corresponding Author. Tel: +989141566409 Fax: +984517721966 E-mail: Mahsa.Khatami@gmail.com

Received: 25 January 2012 Accepted: 23 December 2012

ABSTRACT

Background & Objectives: Stem cells are fundamental supporter of multicellular tissue. They allow blood, bone, gametes, epithelia, nervous system, muscle, and other tissues to be replaced by fresh cells throughout life. In recent years human Wharton's jelly stem cells (WJSCs) have gained attention. They express a number of surface markers characteristic of mesenchymal stem cells. In this study, human Wharton's jelly stem cells were isolated using explant method. To show the stemness property of these cells, three CD markers including CD105, CD44 and CD34 were tested.

Methods: The umbilical cord samples were collected by Caesarian section at Arta Hospital in Ardabil. Cords were transferred in sterile conditions and stem cells were isolated using explant method. After log phase, cells were passaged then growth characteristics and CD105, CD44 and CD34 markers investigated by RT-PCR.

Results: Separation of human Wharton's jelly stem cells were started after 7 days. WJSCs in culture revealed two distinct cell population named Type 1 and Type 2. RT-PCR results showed that WJSCs were $CD105^+$, $CD44^+$ and $CD34^-$.

Conclusion: Human umbilical cord stem cells could be an alternative source instead bone marrow stem cells for cell therapy and tissue engineering. These cells have a fibroblastic appearance. Following the lag phase and into log phase respectively, cells grow easily in culture and retain stemness properties in higher passages.

Key words: Umbilical Cord; Mesenchymal Stem Cells; CD105; CD44; CD34

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-19]

جداسازی و شناسایی سلول‌های بنیادی از منبع ژله وارتون بند ناف انسان

صابر زهری[۱]، مسعود ملکی[۲]، کمال الدین حمیدی[۱]، سیده مهسا خاتمی[۱]*

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران [۲] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات آذربایجان شرقی، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۴۱۵۶۶۴۰۹ فاکس:۰۴۵۱ ۷۷۲۱۹۶۶ E-mail: Mahsa.khatami@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: سلول های بنیادی به عنوان پشتیبان اساسی بافت های بدن موجودات پرسلولی می باشند. این سلول ها باعث می شوند خون، استخوان، گامت ها، بافت اپی تلیال، سیستم عصبی، ماهیچه و سایر بافت های بدن بوسیله سلول‌های جدید در طول دوره زندگی جایگزین شوند. سلول های مزانشیمی ژله وارتون بند ناف، در سال های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. سلول های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون نشانگرهای سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی را بیان می کنند. در این مطالعه، سلول های بنیادی ژله وارتون بند ناف انسان با استفاده از روش کشت قطعه بافت جداسازی گردید. برای نشان دادن خاصیت بنیادینگی این سلول ها سه نشانگر CD شامل CD105، CD44 و CD34 مورد آزمایش قرار گرفت. هدف از این مطالعه بررسی ویژگی های مورفولوژیکی این سلول ها و نشانگرهای سطحی آنها بود.

روش کار: بند ناف نوزاد تازه متولد شده به روش سزارین، از بیمارستان آرتا اردبیل تهیه گردید و در شرایط کاملا استریل به آزمایشگاه انتقال داده شد و به روش کشت قطعه بافت، در محیط کشت DMEM کشت داده شد. بعد از جدا شدن سلول ها و رسیدن به فاز لگاریتمی، سلول ها پاساژ داده شدند. سپس ویژگی های رشد آنها بررسی شده و با استفاده از روش RT-PCR نشانگرهای سطحی CD44 و CD105 و CD34 بررسی گردید.

یافته ها: سلول های بنیادی ژله وارتون بند ناف بعد از ۷ روز شروع به جدا شدن از قطعه های بافتی کردند. در بررسی های مورفولوژیکی دو نوع تیپ ۱ و تیپ ۲ مشاهده گردید. بررسی های تکنیک RT-PCR نیز نشان دهنده بیان دو نشانگر CD44 و CD105 و عدم بیان نشانگر CD34 بود.

نتیجه گیری: بند ناف انسان می‌تواند یک منبع جایگزین برای سلول های بنیادی مغز استخوان در جهت سلول درمانی و مهندسی بافت گردد. این سلول ها ظاهر فیبروبلاستی دارند. این سلول ها بعد از گذراندن فاز lag و ورود به فاز log به راحتی در محیط کشت رشد می کنند و ویژگی های بنیادی خود را تا پاساژ های بالاتر حفظ می کنند.

کلمات کلیدی: بند ناف، سلول های بنیادی مزانشیمی، CD105، CD44، CD34

دریافت: ۹۰/۱۱/۶ **پذیرش:** ۹۱/۱۰/۳

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی[1] جمعیتی از سلول‌ها هستند که برای اولین بار در نیمه قرن بیستم و در مغز استخوان شناسایی شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل ویژگی های منحصر به فردشان برای برنامه های سلول درمانی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته اند. دلیل توجه به این سلول‌ها داشتن فعالیت خود نوزایی و تمایز به انواع سلول‌های عملکردی می‌باشد. امروزه دسترسی آسان به این سلول‌ها و تاثیر آنها در انواع برنامه های سلول درمانی مثل نواقص استخوان سازی، بهبود خونسازی و ترمیم بافت استخوان مورد قبول واقع شده است. مهمتر از تمام موارد گفته شده، از آنجایی که این سلول‌ها از خود بیماران گرفته می‌شود، مشکلات مرتبط با رد سیستم ایمنی بافت آلوژنیک حذف می‌شود. یکی از ویژگی های مهم سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی آنها در چسبیدن، تکثیر و تکوین در

[1] Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-19]

یک سطح استاتیک می‌باشد [۱]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی علاوه بر مغز استخوان از منابع دیگری مثل خون محیطی، بافت چربی، خون بند ناف و ماتریکس بند ناف (ژله وارتون)[1] بدست می‌آیند. بندناف شامل دو سرخرگ و یک سیاهرگ است، که توسط بافت پیوندی موکوئیدی به نام ژله وارتون احاطه شده اند. اطراف بند ناف را بافت اپی تلیوم پوشانیده است. ماتریکس آن، بافتی غنی از پروتئوگلیکان و موکوپلی ساکارید است که فراوان ترین گلیکوزآمینو گلیکان در این بافت اسیدهیالورونیک می‌باشد، این ماده ژل هیدراته ای در اطراف سلول‌های فیبروبلاستی و رشته های کلاژنی تشکیل می‌دهد و بند ناف را در مقابل فشار حفاظت می‌کند. مبدا پیدایش بند ناف ناحیه ای به نام ساقه اتصالی می‌باشد که در روز ۱۳ رویانی و از مزودرم خارج رویانی ایجاد می‌شود [۲]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان به خاطر چهار علت جایگزین مناسبی برای سلول‌های بنیادی مغز استخوان هستند: ۱) این سلول‌ها به روش غیر تهاجمی بدست می‌آیند. ۲) این سلول‌ها در ضوابط جامعه بین المللی سلول درمانی ثبت شده اند. ۳) سلول‌های بنیادی بند ناف به انواع مختلف سلول‌ها از قبیل چربی [۳]، غضروف [٤]، کاردیومیوسیت [۵]، میوبلاست های اسکلتی [۶]، استخوان [۷]، عصبی [۳]، مشابه کبدی [۸] و اندوتلیالی [۹] تمایز یافته اند. ٤) این سلول‌ها توسط لنفوسیت های HLA تشخیص داده نمی‌شود و این مساله نشانگر امکان استفاده از این سلول‌ها در پیوند های آلوژنیک می‌باشد [۱۰]. سلول‌های بنیادی بند ناف نشانگرهای مزانشیمی مختلفی مثل CD105، CD44، CD68، CD29، CD73، CD90 و HLA-I را بیان می‌کند، در مقابل نشانگرهای هماتوپویتیک مثل CD34 و CD45 را بیان نمی‌کنند. این سلول‌ها از قسمت های مختلف بند ناف قابل جداسازی می‌باشد. این قسمت ها شامل خون بند ناف، ساب اندوتلیوم ورید نافی و ژله وارتون می‌باشد. در قسمت ژله وارتون، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از سه بخش نسبتاً مجزا جداسازی می‌شود: منطقه پری واسکولار، منطقه اینتر واسکولار و ساب آمنیون [۱۱]. اما آیا اینکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بخش های مختلف بند ناف جمعیت های متفاوت سلولی ایجاد می‌کنند، هنوز نامشخص است. در کشت اولیه و پاساژهای P_0 تا P_2 دو نوع سلول متفاوت از لحاظ مورفولوژیکی دیده می‌شود. سلول‌های تیپ ۱ در شرایط In vitro رشته‌های بینابینی پن سایتوکراتین[2] و ویمنتین[3] را به طور شدید بیان می‌کنند، این در حالی است که سلول‌های تیپ ۲ فقط ویمنتین را نشان می دهند [۳]. در این تحقیق با استفاده از روش کشت بافت سلول‌های بنیادی از ماتریکس بند ناف جداسازی شده و نشانگرهای آن مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

جداسازی سلول‌ها از ماتریکس بند ناف

بند ناف نوزادان سالم (n=۱۲) پس از کسب رضایت از مادر به روش سزارین از بیمارستان آرتا در اردبیل تهیه شدند و بند ناف در شرایط استریل، در داخل نرمال سالین به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل گردید. جداسازی سلول‌های بند ناف انسانی به روش کشت قطعه بافت صورت گرفت. بدین منظور بند ناف پس از شستشو در الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه، در داخل نرمال سالین تازه قرار داده شد. بند ناف به قطعات کوچک تقسیم و پس از شستشو در بافر HBSS[4]، لایه آمنیونی و رگ های آن جداسازی گردید. بند ناف به تکه های ۵ mm^2 برش داده شد. برای کشت سلول از فلاسک‌های T-25 (Orange Scientific) استفاده گردید. قطعه‌های

[1] Wharton's Jelly

[2] Pancytokratin

[3] Vimentin

[4] Hanks' Balanced Salt Solution

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-19]

بافتی در داخل فلاسک کشت حاوی محیط DMEM (Gibco (31600-083)) + 20% FBS (Gibco (10270-106)) +1% Pen strep (Sigma (S-1277)) (کشت داده شده) و در انکوباتور CO_2 دار و در دمای ۳۷°C قرار داده شدند. محیط کشت فلاسک ها هر سه روز یکبار تعویض گردید. بعد از پر شدن کف فلاسک، سلول‌ها بوسیله تریپسین 0.25٪ (Gibco (27250-018)) پاساژ داده شدند.

انجماد و ذوب سلول‌های بنیادی ژله وارتون بند ناف انسان

مقدار تاثیر عمل انجماد و ذوب بر میزان زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از دو گروه سلول در محیط های انجماد متفاوت بررسی گردید. سلول‌ها بعد از جدا شدن از کف فلاسک بوسیله تریپسین، در FBS 90% + DMSO 10% درون ویال های ویژه منجمد گردیدند. دو ماه بعد، سلول‌ها در دمای ۳۷°C ذوب شدند و با استفاده از تریپان بلو و هموسیتومتر شمارش شدند و درصد حیات سلول‌ها محاسبه گردید. بعد از شمارش در محیط DMEM + FBS 20% + Pen strep 1% کشت داده شدند.

محاسبه زمان دو برابر شدن در سلول‌های جدا شده از بند ناف انسان

سلول‌ها در ۶ پاساژ شمارش شدند و زمان دو برابر شدن سلول‌ها با استفاده از نرم‌افزار زمان دو برابر شدن مطابق با فرمول:

$$T=t^{*}\ln(2)/(\ln(N_1)-\ln(N_0)) \qquad N_1=N_0{}^{*}2^{t/T}$$

محاسبه گردید. در فرمول N_0: غلظت اولیه سلول‌ها، N_1: غلظت نهایی سلول‌ها، t: مدت کشت و T: زمان دو برابر شدن می‌باشد.

استخراج mRNA و انجام RT-PCR

با استفاده از محلول RNX-PLUS Trizole (Cinnagen (RN7713))، RNA کل سلول‌های رشد یافته در فلاسک کشت که به تعداد بیشتر از 10^{6} سلول رسیده بودند، استخراج گردید. مراحل استخراج طبق دستورالعمل محلول Trizole انجام گردید. غلظت سنجی RNA تام با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر جهت تعیین کمیت RNA صورت گرفت. بعد از تعیین غلظت RNA که ۶,٤-۳ میکرو گرم در هر میکرو لیتر بود، واکنش سنتز cDNA با پرایمر اولیگونوکلئوتیدی (T18)، بافر واکنش، dNTP (Cinnagen (DN7603C)) و آنزیم Reverse transcriptase (Cinnagen (EP0441)) انجام گردید. بدین ترتیب زنجیره اول cDNA سنتز و به عنوان الگوی PCR با اجزای تشکیل دهنده خود که شامل پرایمر های پیشرو و پیرو برای ژن های CD44، CD105، CD34می باشد، بوسیله بافر PCR (cinnagen)، dNTP، $MgCl_2$، Taq polymerase (Cinnagen(TA8108C)) و نمونه در دستگاه Cobert Reserch انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱. توالی و خصوصیات پرایمرهای مورداستفاده

ژن	توالی پرایمر (3′-5′)	طول محصول
CD105	رفتCAGCATTGTGGCATCCTTCGTG برگشتCCTTTTTCCGCTGTGGTGATGAG	۳۹۵
CD44	رفتATCCACCCCAACTCCATCTGT برگشتTGTTTGCTCCACCTTCTTGACTC	٤۳۳
CD34	رفتGCCTGGAGCAAAATAAGACC برگشتACCGTTTTCCGTGTAATAAGG	٤۳٤
β –actin	رفتTGGAGAAATCTGGCACCACACC برگشتGATGGGCACAGTGTGGGTGACCC	۲۵۰

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-19]

تهیه نمونه جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی

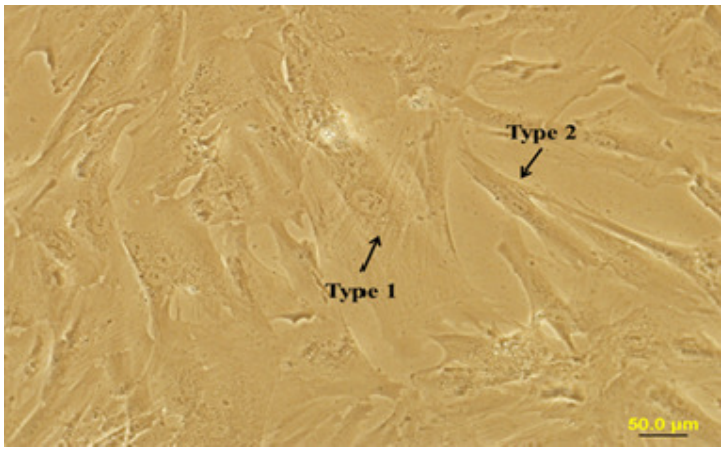
ابتدا سلول‌های بنیادی جدا شده از ژله وارتون به مرحله P_2 رسانده شد، سپس سلول‌ها بوسیله بافر PBS شسته شده و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در فرمالدئید قرار گرفتند. سپس با استفاده ازطلا سطح نمونه پوشش داده شد. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره شکل ظاهری سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان

۷-۵ روز پس از قرار دادن قطعات ژله وارتون در محیط به تدریج جوانه های سلولی از کناره های بافت شروع به رشد کردند (شکل ۱) و بعد از ۳ روز کف فلاسک را پوشاندند. میزان جداسازی سلول $۱۰^۶ \times ۱۲-۱۰$ در هر سانتی متر از بند ناف محاسبه گردید. در کشت اولیه و پاساژهای P_0 تا P_2 دو نوع سلول متفاوت از لحاظ مورفولوژیکی شد. سلول‌های پهن با سیتوپلاسم گسترده که به عنوان سلول‌های تیپ ۱ هستند در میان سلول‌های شبه فیبروبلاستی و میله ای به عنوان تیپ ۲ پخش شده اند (شکل ۲). چون بعد از ۷ روز سلول‌ها کف فلاسک را تا ۸۰٪ پر کرده بودند، پاساژ داده شدند و به چند فلاسک تقسیم گردیدند. نتیجه اولین پاساژ بعد از کشت اولیه تولید رده سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان بود. این سلول‌ها از توانایی چسبیدن به سطح فلاسک برخوردار هستند.

شکل ۱. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف انسان در حال جداشدن از قطعه بافت کشت شده



شکل ۲. وجود دو نوع سلول با مورفولوژی متفاوت. سلول‌های بنیادی تیپ ۱ و تیپ ۲ با پیکان در شکل نشان داده شده است.

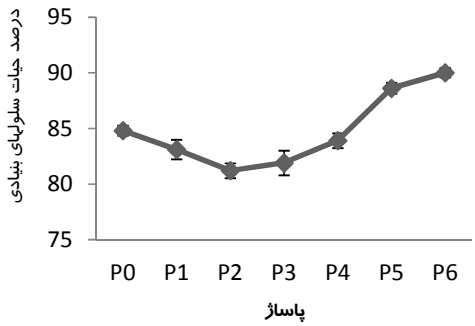
[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-19]

ویژگی های رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون

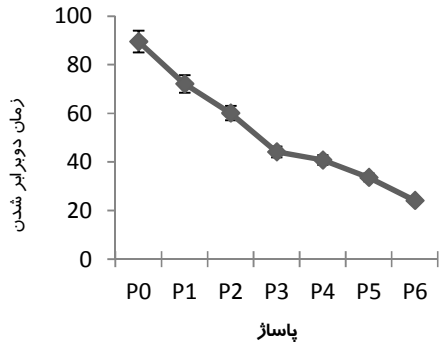
سلول‌های جدا شده از ژله وارتون (P_0) ظاهر فیبروبلاستی در محیط کشت نشان دادند. در روز ۷ کشت، سلول‌ها در فاز lag به سر می‌بردند، اما در روزهای ۱۲-۱۰ به فاز log رسیدند و به صورت نمایی رشد کردند. بررسی زنده ماندن سلول‌ها طی پاساژهای مختلف نشانگر افزایش قدرت تکثیر آنها تا پاساژ ۶ بود. اطلاعات بدست آمده نشان داد که این سلول‌ها توانایی تقویت رشد یکدیگر را دارند. به عبارت دیگر، سرعت تکثیر و رشد سلول‌ها با افزایش تعداد سلول‌ها افزایش یافت (شکل ۳).

بررسی زمان دو برابر شدن سلول‌ها

با استفاده از نرم افزار زمان دو برابر شدن میزان دو برابر شدن سلول‌ها محاسبه گردید. یافته ها نشان می‌دهد، با گذشت زمان، مدت دو برابر شدن سلول‌ها کاهش چشمگیری می یابد. زمان دو برابر شدن سلول‌ها با بالا رفتن پاساژها از ۱/۵±۸۹ در پاساژ P_0 به ۱/۲± ۲۳ در پاساژ P_6 کاهش یافت (شکل ٤).



شکل۳. بررسی میزان زنده ماندن سلول‌ها در پاساژهایP0-P6



شکل ٤. بررسی میزان دو برابر شدن در پاساژهای P0-P6

نتایج RT-PCR

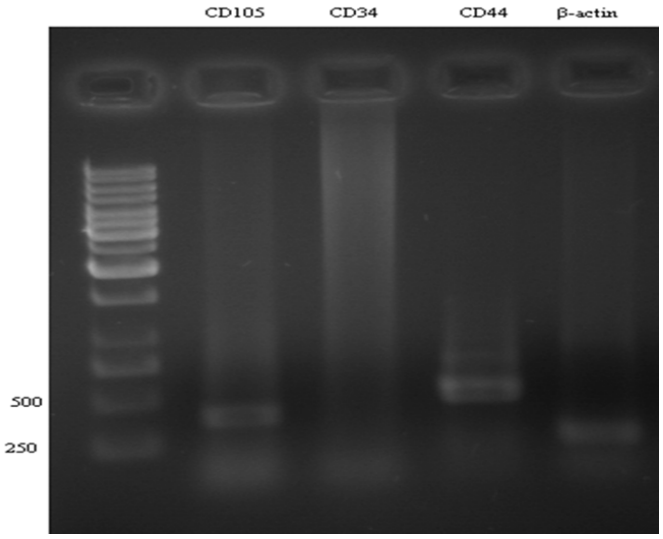
برای اثبات بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی جدا شده از ژله وارتون بند ناف از دو ژن CD105 و CD44 به عنوان ژن های بیان شونده در این سلول‌ها و ژن CD34 به عنوان ژنی که در این سلول‌ها بیان نمی‌شود، مورد استفاده قرار گرفت. بتا-اکتین[1] هم به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. باند ٤۳۳ جفت بازی مربوط به ژن CD44 و باند 395 بازی مربوط به ژن CD105 در این سلول‌ها مشاهده گردید، در حالی که باند ٤۳٤ جفت بازی ژن CD34 مشاهده نگردید (شکل ۵). بیان دو ژن CD44 و CD105 و عدم بیان ژن CD34 در این سلول‌ها نشانگر بنیادی بودن این سلول‌ها می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی مورفولوژیکی با میکروسکوپ الکترونی نگاره

شاخص ترین ویژگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون دوکی شکل بودن و داشتن استطاله‌هایی می‌باشد که آنها را به بستر وصل می کند. در میکروگراف های سلول‌های بینادی استطاله‌های متصل کننده به بستر در شکل مشخص می‌باشد (شکل۶).

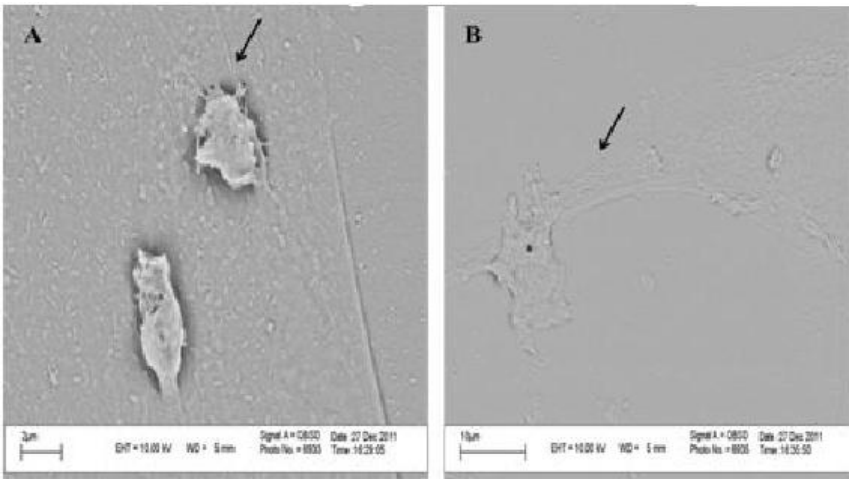
[1] β-Actin

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-19]



شکل۵. بارگذاری محصول PCRمربوط به ژن‌های بنیادی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف انسان.

باند ٤٣٣ جفت بازی مربوط به ژن CD44 و باند۳۹۵ بازی مربوط به ژن CD105 در این سلول‌ها مشاهده گردید. در حالی که باند ٤٣٤ جفت بازی ژن CD34 مشاهده نگردید. باند ۲۵۰ جفت بازی مربوط به ژن شاهدβ –actin می باشد.



شکل ۶. A و B) سلول‌های بنیادی ژله وارتون را نشان می‌دهد. استطاله‌ها با پیکان در هر دو شکل مشخص است.

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی یک انتخاب مناسب جهت سلول درمانی می‌باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از منابع مختلفی مثل مغز استخوان، خون محیطی، بافت چربی، خون بند ناف و ماتریکس بند ناف جداسازی می شوند. انتخاب یک منبع مناسب برای کاربردهای درمانی کار دشواری است. بنابراین بررسی منابع مختلف سلول‌های مزانشیمی مساله بسیار مهمی در سلول درمانی می‌باشد. سلول‌های جدا شده از مغز استخوان و خون بند ناف به طور گسترده بررسی شده است، اما یکی از بهترین منابع جهت جداسازی این سلول‌ها ماتریکس بند ناف پیشنهاد شده است. بند ناف دارای دو سرخرگ و یک ورید می‌باشد که توسط بافت پیوندی موکوئیدی احاطه شده است که به این بافت ژله وارتون گفته می‌شود. بند ناف بوسیله اپی تلیومی که از آمنیون در

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-19]

حال تکوین ایجاد می‌شود، احاطه می‌گردد [۱۲]. یکی از مسائل مهم در مطالعات سلول‌های بنیادی مزانشیمی بزرگسالان دسترسی به یک منبع از سلول‌ها با تراکم قابل قبول از سلول‌های زنده برای گسترش در شرایط کشت می‌باشد. فراوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مغز استخوان ۱ تا ۱۰ سلول در $۱۰^{۶}$ سلول تک هسته ای می‌باشد [۱۳]. تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی در خون بند ناف از $۱۰^{3}\times۱$ تا $۱۰^{۳}\times۵$ در هر نمونه می‌باشد، علاوه بر این جداسازی و گسترش این سلول‌ها در شرایط کشت دشوار است [۱۴]. مطالعات گسترده ای که کارا حسین اوقلو[1] بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از ماتریکس بند ناف انجام داده است، نشانگر امکان جداسازی $۱۰^{۳}\times۱۵$-۱۰ سلول در هر سانتی متر از بند ناف می‌باشد [۳]. در مطالعه حاضر نیز میزان جداسازی سلول $۱۰^{۳}\times۱۲$-۱۰ محاسبه گردید. هدف این مطالعه شناخت ویژگی‌های رفتاری این سلول‌ها در شرایط کشت بود. در این مطالعه برای جداسازی سلول‌ها از روش کشت قطعه بافت استفاده گردید. این روش علی رغم زمان بر بودن روش مطمئن و کم هزینه ای است. سلول‌های مزانشیمی ماتریکس بند ناف را می‌توان از بند ناف نوزادی که هنگام تولد دور انداخته می‌شود و استفاده از آن مشکل اخلاقی خاصی ندارد، تهیه کرد. این سلول‌ها دارای خواص آنتی ژنی کمی هستند، از این رو پیشنهاد شده است که از این سلول‌ها می‌توان در سلول درمانی و اصلاح ساختارهای بیولوژیک آسیب دیده استفاده کرد [۱۵]. این سلول‌ها از مزودرم خارج رویانی مشتق می شوند و با توجه به منشا جنینی و عدم بیان نشانگرها یا آنتی ژنی سطحی مثل HLA-II واکنش های ایمنی را در گیرنده سلول تحریک نمی کنند [۱۱]. ساراگوزر[2] و همکاران ظاهر فیبروبلاستی این سلول‌ها را گزارش کردند [۷]، سلول‌های جدا شده در این پژوهش نیز فیبروبلاستی بودند. همچنین در این پژوهش دو نوع سلول با ظاهری متفاوت نشان داده شد، که در این مورد با مطالعات کارا حسین اوقلو کاملا مطابقت می کرد. سلول‌های مزانشیمی بند ناف از قدرت تکثیر بالایی برخوردارند. نتایج ما نیز نشان داد که در پاساژهای بالاتر قدرت تکثیر این سلول‌ها افزایش می‌یابد و زمان دو برابر شدن این سلول‌ها کاهش می‌یابد (شکل ٤). علاوه بر این، یافته ها نشان دهنده افزایش ماندگاری سلول‌ها در پاساژ های بالاتر می‌باشد (شکل ۳). هاوایی[3] و همکاران نشان دادند که CD44 و CD51 و CD29 و SH2 و SH3 نشانگرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند. دومینیکی[4] و همکاران نشانگرهای موجود روی سلول‌های بنیادی استرومایی بند ناف انسانی شامل CD90 و CD73 و CD105 را معرفی کردند. علاوه بر این مطالعات مختلف نشان داده است، MSCs جداشده از بند ناف نشانگرهایی همچون CD95 و CD13 [۱۶] و CD68 [۱۷،۱۸] را نیز بیان می کنند. این در حالی است که این سلول‌ها نسبت به نشانگرهای CD71، CD38، CD45 و CD34 منفی هستند. در مطالعه حاضر با استفاده از تکنیک RT-PCR بیان نشانگرهای CD105 و CD44 و عدم بیان نشانگر CD34 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بند ناف انسانی نشان داده شد.

نتیجه گیری

روش کشت قطعه بافت روش کم هزینه و مطمئنی می‌باشد. بیان دو نشانگر CD44 و CD105 و عدم بیان نشانگر سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک CD34 نشان دهنده بنیادی بودن این سلول‌ها است. به توجه به کاهش زمان دو برابر شدن و افزایش درصد زنده

[1] Karahuseyinoglu
[2] Sarugaser
[3] Hwai
[4] Dominici

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-19]

ماندن این سلول‌ها طی پاساژهای بالاتر منبع بسیار مناسبی برای جداسازی سلول‌های بنیادی می باشند.

تشکر و قدردانی

از پرسنل اتاق عمل بیمارستان آرتا اردبیل که در تهیه بند ناف نوزادان همکاری صمیمانه ای داشته اند و همچنین دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1- Baksh D, Song R, Tuan S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004 Sep; 8(3): 301-316.
2- Sadler TW. Second week of development: Bilaminar germ disc. In: Langman's medical embryology, 9 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 51-63.
3- Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E. Biology of the stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells. 2007 Oct; 25(2): 319 –331.
4- Limin W, Detamore MS. Insulin-like growth factor-I improves chondrogenesis of predifferentiated human umbilical cord mesenchymal stromal cells. J Orthopaed Res. 2009 Feb; 27(8): 1109–1115.
5- Pereira WC, Khushnooma I, Madkaitar M, Ghosh K. Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. J Tissue EngRegen Med. 2008 Oct; 2(7): 394-399.
6- Teresa M, Conconi P, Burra R, diLiddo C, Calore M, Turetta S.B,et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. Int j Mol Med. 2006 Jul; 18(6): 1089-1096.
7- Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors. Stem Cells. 2005 Sep; 23(2): 220–229.
8- Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stemcells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. Gastroenterology. 2008 Apr; 134(3): 833-848.
9- Chena MY, Pu-Chang L, Zhi-Ling L, Xing W. Endothelial differentiation of Wharton's jelly–derived mesenchymal stem cells incomparisonwith bone marrow–derived mesenchymal stem cells. ExpHematol. 2009 Feb; 37(5): 629–640.
10- EnnisJ, Sarugaser R, Gomez A, Baksh D, Davies J. Isolation, characterization and differentiation of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs). Meth Cell Biol. 2008 Apr; 86(2): 121-136.
11- Troyer D, Mark L, Weiss M. Concise Review: Wharton's Jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells. 2008 Jun; 26 (3): 591–599.
12- Meyer FA, Laver-Rudich Z, Tanenbaum R. Evidence for amechanical coupling of glycoprotein microfibrils with collagen fibrils in Wharton's jelly. Biochimica et BiophysicaActa. 1983 Feb; 755(3): 376–387.
13- Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G. characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. Blood. 1980 May; 56(2): 289 –301.
14- Rogers I, Casper RF. Umbilical cord blood stem cells. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2004 Apr; 18(6): 893–908.
15- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, GuoYJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's Jelly of the human umbilical cord. Stem Cells. 2004 Aug; 22(7): 1330–1337.
16- Lu LL, 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 . Hematol J. 2006 Feb; 91(8): 1017-1026.
17- La Rocca G, Anzalone R, Farina F. The expression of CD68 in human umbilical cord mesenchymal stem cells: New evidences of presencein Non-Myeloid cell types. Scand J Immunol. 2009 Aug; 70(2): 161–162.
18- Giordano B, Andrea B, Maddalena M, Rosario N, Lucio L, Ranieri C, et al. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. Exp Cell Res. 2003 Feb; 287(1): 98-105.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-19]