Investigating the expression of mesenchymal markers in stem cells of human umbilical cord matrix (Wharton's jelly)

ARTICLE INFO

Article Type

Original Article

Authors
Javad Amini Mahabadi[1], Maryam Sanaye Naderi[2], Mohammad Reza Nateghi[*2]

1 Anatomical Sciences Research Center, Institute for Basic Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
2 Sarem Gynecology, Obstetrics and Infertility Research Center, Sarem Women's Hospital, Iran University of Medical Sciences (IUMS), Tehran, Iran.

***Corresponding Author:** Mohammad Reza Nateghi; Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR), Sarem Women's Hospital, Iran University of Medical Sciences (IUMS), Tehran, Iran.
Address: Sarem Women Hospital, Basij Square, Phase 3, Ekbatan Town, Tehran, Iran. Postal code: 1396956111, Phone: +98 (21) 44670888, Fax: +98 (21) 44670432.

Received: 02 October, 2022
Accepted: 27 October, 2022
e Published: 14 June 2023

Article History

ABSTRACT

Introduction: Mesenchymal stem cells are multipotent cells that are characterized by the ability to self-renew and differentiate and transform into other types of body cells. Umbilical cord cells are a valuable source of mesenchymal stem cells that are of interest for stem cell therapy. In this study, stem cells of umbilical cord matrix were investigated using several mesenchymal markers.

Material and methods: In the present study, after isolation and cultivation of the cells, when they reached 80% confluency, they were trypsinized and passaged, and after the fourth passage, the cells were prepared for flow cytometry. First, the cells were counted and about $5x10^6$ cells were prepared along with 20 µl of conjugated antibody of baficoarithrin (PE) and fluorescein isothiocyanate (FITC) and 100 µl of PBS and centrifuged. Finally, the cell plaque was dissolved in 100 µl of PBS and analyzed by flow cytometry.

Results: The findings showed that more than 80% of the stem cells population derived from the umbilical cord matrix expressed mesenchymal stem cell markers. The population of stem cells isolated from the umbilical cord matrix were positive for MSC markers.

Conclusion: The results demonstrated that umbilical cord cells matrix are a source of mesenchymal stem cells that can be a suitable substitute for stem cells in clinical applications and cell therapy.

Keywords: Expression of Markers; Mesenchymal Stem Cells; Umbilical Cord Matrix.

Copyright© 2021, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License which permits Share (copy and distribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-Noncommercial terms.

[Downloaded from saremjrm.com on 2024-10-06]

[DOI: 10.61186/sjrm.7.3.157]

بررسی بیان مارکرهای مزانشیمال در سلول های بنیادی ماتریکس بندناف انسان (ژله وارتون)

جواد امینی مهابادی[۱]، مریم صنایع نادری[۲]، محمد رضا ناطقی[۲*]

[۱] مرکز تحقیقات آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان-ایران
[۲] مرکز تحقیقات زنان، زایمان و ناباروری صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های چندتوانی هستند که از ویژگی آن ها داشتن توانایی خودبازسازی و قابلیت تمایز و تبدیل شدن به انواع دیگر سلول‌های بدن می باشد. سلول‌های بند ناف بعنوان یک منبع با ارزشی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده که برای درمان سلول‌های بنیادی مورد توجه هستند. در این مطالعه با استفاده از چند مارکر مزانشیمال، سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف بررسی گردید.

مواد و روش ها: در تحقیق حاضر پس از جداسازی و کشت سلول‌ها وقتی به تراکم ۸۰ درصد رسیدند ترپسینه شده و پاساژ داده شدند و بعد از پاساژ چهارم سلول‌ها آماده فلوسایتومتری شدند. ابتدا سلول‌ها شمارش شدند و حدود ۵×۱۰^{۶} سلول همراه با ۲۰ میکرولیتر آنتی بادی کونژوگه شده بافیکواریترین (PE) و فلورسین ایزوتیوسیانات (FITC) و ۱۰۰ ماکرولیتر PBS آماده سازی شد و سانتریفیوژ گردید. در نهایت، پلاک سلولی در ۱۰۰ ماکرولیتر PBS حل و با دستگاه فلوسایتومتری آنالیز شد.

نتایج: یافته‌ها نشان داد بیش از ۸۰ درصد جمعیت سلول بنیادی مشتق شده از ماتریکس بند ناف، مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بیان کردند. جمعیت سلول‌های بنیادی جدا شده از ماتریکس بند ناف برای مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مثبت بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های ماتریکس بند ناف منبعی از سلول‌های بنیادی مزانشیمال بوده که می‌تواند جایگزین مناسبی برای سلول‌های بنیادی در کاربردهای کلینیکی و سلول درمانی باشد.

کلید واژه‌ها: بیان مارکرها؛ سلول‌های بنیادی مزانشیمال؛ ماتریکس بند ناف.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۵

*نویسنده مسئول: محمد رضا ناطقی؛ مرکز تحقیقات زنان، زایمان و ناباروری صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. آدرس: تهران، شهرک اکباتان، فاز ۳، میدان بسیج، بیمارستان فوق تخصصی صارم. کد پستی: ۱۳۹۶۹۵۶۱۱۱. تلفن: ۰۲۱۴۴۶۷۰۸۸۸. فکس: ۰۲۱۴۴۶۷۰۴۳۲.

مقدمه

سلول های بنیادی سلول‌هایی هستند که در بیشتر موجودات زنده پرسلولی یافت می‌شوند. خاستگاه و منشأ انواع سلول‌ها در بدن بوده و دارای دو ویژگی مهم یعنی پرتوانی[۱] و خودبازسازی[۲] می باشد، یعنی هم قدرت تبدیل به انواع سلول ها را دارند و هم می توانند به سلولی تمایز نیافته مشابه خودش تبدیل شود [۱]. بسته به نوع سلول‌های بنیادی، این سلول‌ها قدرت تبدیل به یک یا چند نوع سلول مختلف را دارند، که این نوع سلول‌ها می توانند در درمان انواع مختلف بیماری‌ها کمک کننده باشند [۲]. به طور کلی سلول‌های بنیادی به سه دسته سلول‌های بنیادی جنینی[۳]، سلول‌های بنیادی بالغ[۴]، سلول‌های بنیادی بند ناف[۵] تقسیم بندی می‌شوند. سلول‌های بنیادی جنینی که در بلاستوسیست و سلول-های بنیادی بالغ که در بافت های بالغ یافت می شوند [۳]. سلول های بنیادی بند ناف همانطور که از نامشان بر می آید از خون بند ناف در هنگام وضع حمل جدا می شوند. در جنین در حال تکوین سلول‌های بنیادی می توانند به تمام بافتهای تخصص یافته جنین تمایز یابند. امروزه این سلول های بنیادی را می توان به سلول های تخصص یافته بافت های مختلف، رشد وتمایزداده ودر سلول درمانی [۶] از آن‌ها استفاده کرد [۴]. به عبارت دیگر، این سلول‌ها قادر هستند تا در محیط آزمایشگاهی انواع مختلفی از سلول‌ها را به وجود بیاورند [۲]. جفت و بند ناف منابع قابل دسترس و پایان‌ناپذیر از سلول‌های بنیادی می‌باشند در این میان سلول-های بنیادی مزانشیمی بند ناف، سلول‌هایی هستند که از ژله وارتون جداسازی می‌شوند. این سلول‌ها جزء سلول‌های بنیادی چندتوان بوده [۵] و بنا به دلایلی از جمله دسترسی آسان و کم هزینه بودن تهیه آن، منبعی مناسب برای سلول‌های بنیادی می‌باشند که در سال‌های اخیر اولین بار توسط دکتر ویس و همکاران در سال ۲۰۰۳ مورد شناسایی و کشت قرار گرفته‌اند. این سلول‌های بنیادی از توان تکثیر فوق‌العاده برخوردار می-باشند و در طی ۷۰ تقسیمات متوالی فرآیند پیر شدن در آن‌ها رخ نخواهد داد [۳]. بندناف رابط بین مادر و جنین در طی دوره حاملگی بوده و از یک بافت پیوندی موکوئیدی به نام ژله وارتون [۷] و رگ‌های بند نافی و سلول-های شبه فیبروبلاستی تشکیل شده است [۶]. سلول‌های جدا شده از رگ-های بند ناف از ویژگی تکثیر بالاتری نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان برخوردار می‌باشد و قادر است به سلول‌های استئوژنیک، کندروژنیک و آدیپوژنیک تمایز یابند [۷]. بندناف تا دهه‌های ۷۰ و۸۰ مورد توجه نبود زیرا به عنوان یک بافت اضافی دور انداخته می-شد. در سال‌های اخیر، در کنار تلاش‌هایی که در جهت منابع سلول‌های بنیادی در بدن انسان انجام گرفت بند ناف به عنوان منبعی از سلول‌های

[۱] Pluripotency
[۲] Self renewal
[۳] Embryonic Stem Cells
[۴] Adult Stem Cells
[۵] Umbilical cord Stem Cell
[۶] Cell Therapy
[۷] Wharton's Jelly

[Downloaded from saremjrm.com on 2024-10-06]
[DOI: 10.61186/sjrm.7.3.157]

رویانی[۸] برای بافت سلولی و ژن درمانی در دسترس قرار گرفت که می تواند به عنوان یک منبعی دیگر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار رود [۸]. سلول‌های ماتریکس بندناف از نظر خواص انقباضی و ترشح فراوان کلاژن، سلول‌های شبه میوفیبروبلاست نام گرفته‌اند [۹]. مارکرهای موجود در سطح سلولی سلول‌های بنیادی ماتریکس بندناف انسانی شامل: CD73، CD105، CD90، CD44، CD29 و CD51 (۱۷-۱۶) مارکرهای اینتگرین SH2 و SH3 مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی و به میزان کمتری برخی از فاکتورهای رونویسی از جمله Oct_4 [۱۰] و Nanog [۱۱] هستند که در سلول‌های بنیادی جنینی بیان می‌شوند. این فاکتورها باعث تنظیم خودبازسازی و پرتوانی در سلول‌های بنیادی می‌شوند. فلوسایتومتری تکنولوژی است که در آن به طور همزمان چندین ویژگی فیزکی یک ذره مثل سلول، حین عبور جریان مایعی حاوی سلول‌ها از مقابل نور لیزر، اندازه گیری و تجزیه وتحلیل می‌گردد. یکی از متداولترین کاربردهای فلوسایتومتری در آزمایشگاه و کلینیک، بررسی آنتی‌ژن‌های سطحی با استفاده از تکنیک ایمونوفلورسانس و توسط آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌باشد که به این ترتیب فلوسایتومتری را به یک تکنیک استاندارد برای شمارش زیر جمیعت‌های لنفوسیتی در نمونه‌های خون و مغز استخوان تبدیل کرده است. هدف از این مطالعه، بررسی بیان مارکرهای مزانشیمال در سلول های بنیادی ماتریکس بندناف انسان (ژله وارتون) می باشد.

مواد و روش ها

بند ناف نوزاد متولد شده با کسب اجازه از والدین از بیمارستان تهیه شده و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد. بعد از تحویل بند ناف آن را در ظرف استریل حاوی نرمال سالین ۰.۹ درصد در دمای ۴ درجه سانتی-گراد حمل می‌شود. مدت زمان بین تحویل بند ناف و کشت آن نباید بیش از ۴۸ ساعت باشد. سطح بند ناف با PBS به دقت شسته شده تا کاملاً از خون پاک شود. بند ناف در داخل یک پتری دیش استریل گذاشته شد با استفاده از یک تیغ استریل بند ناف به قطعات ۳ تا ۵ سانتی متری بریده شد. بعد از بریدن قطعات بند ناف به صورت طولی، عروق آن خارج شده و بقیه بند ناف با PBS خوب شستشو شد. در پتری‌دیش دوم به وسیله دو اسکالپل به صورت ضرب‌دری بند ناف به قطعه‌های ۱ تا ۲ سانتی متری قطعه قطعه شدند. قطعه‌های ریز شده به پتری‌دیش سوم حاوی PBS منتقل شده و در آنجا هم قطعه قطعه شدن ادامه داده شد. بدین صورت این قطعه‌های بندناف در داخل محلول PBS شسته شدند و خون داخل آنها بیرون آمد. تکه‌های بافت در داخل محلول شسته شدند و خون داخل آن ها بیرون آمد. تکه‌های بافت به داخل لوله فالکون ۱۵میلی لیتر ریخته شدند و ۳ سی سی از محلول آنزیم کلاژناز بر روی تکه‌های بافت ته فالکون ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه انکوبه شد تا سوسپانسون سلولی تشکیل گردد. بعد از آن لوله فالکون در داخل دستگاه سانتریفیوژ (دور ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه) قرار داده شد تا سلول‌های جدا شده و تکه‌های بافتی کوچک باقی مانده ته‌نشین شدند. محیط رویی برداشته شده و ته مانده با میکروپیپت خوب (suspense) شده در محیط کشت حاوی DMEM با FBS ده درصد کشت داده شدند. فلاسک‌های کشت در انکوباتور دارای رطوبت و با ۵٪ CO2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از سه روز سلول‌ها به بستر شیشه‌ای فلاسک چسبیده بودند ولی تعدادی از سلول‌ها در حین جداسازی مرده بودند که به صورت شفاف در سطح کشت نمایان گردیدند. در این زمان محیط کشت تعویض گردید. سلول‌های ماتریکس بند ناف بعد از پاساژ اول (در حدود ۵ روز از کشت اولیه) توسط کیت آلکالین فسفاتار مورد شناسایی قرار گرفت. محیط کشت خارج گردید و سلول‌ها به مدت ۲ دقیقه با فیکساتیو (پارافرمالدهید ۴ درصد) تثبیت شدند. بعد از ۲ دقیقه فیکساتیو خارج گردید و سلول‌ها با بافر شوینده PBS شستشو داده شدند. پس از خروج بافر شوینده، معرف (Naphthol/Fast Red Violet) تهیه شده در ظرف کشت ریخته شد تا جایی که کاملاً سطح را بپوشاند. عمل استفاده از معرف در تاریکی و در دمای اتاق ۱۵ دقیقه به طول انجامید. بعد از ۱۵ دقیقه معرف دور ریخته شد و سلول‌ها با بافر PBS شستشو داده شدند. در پایان مکان‌های حاوی سلول‌های بنیادی به رنگ قرمز تیره یا قهوه‌ای رنگ دیده شدند.

برای بررسی مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تأیید آن‌ها توسط فلوسایتومتری از سلول‌های کشت داده شده در پاساژ چهارم استفاده گردید. ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده ترپسینه شده و در دور rpm ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله محیط رویی دور ریخته شد و سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند و توسط لام نئوبار شمارش سلولی صورت گرفت. حدود $۵×۱۰^{۶}$ سلول همراه با ۲۰ میکرولیترآنتی بادی اختصاصی کونژوگه با فیکواریترین PE یا فلورسین ایزوتیوسیانیت (FITC) درون لوله جهت رنگ آمیزی ریخته شد و حدود ۳۰ دقیقه در انکوباتور و یا دمای تاریکی قرار گرفت. بعد از آن سانتریفیوژ در دور rpm ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه شد. پلاک سلولی در ۱۰۰ ماکرولیتر PBS حل و با دستگاه فلوسایتومتری آنالیز گردید. جهت حذف واکنش‌های غیراختصاصی از آنتی بادی‌های ایزوتیپ کنترل استفاده شد. در این بررسی مارکرهای CD90، CD105، CD13 و CD49e با فیکواریترین و مارکر CD73 با فلورسین ایزوتیوسیانیت نشاندار شدند.

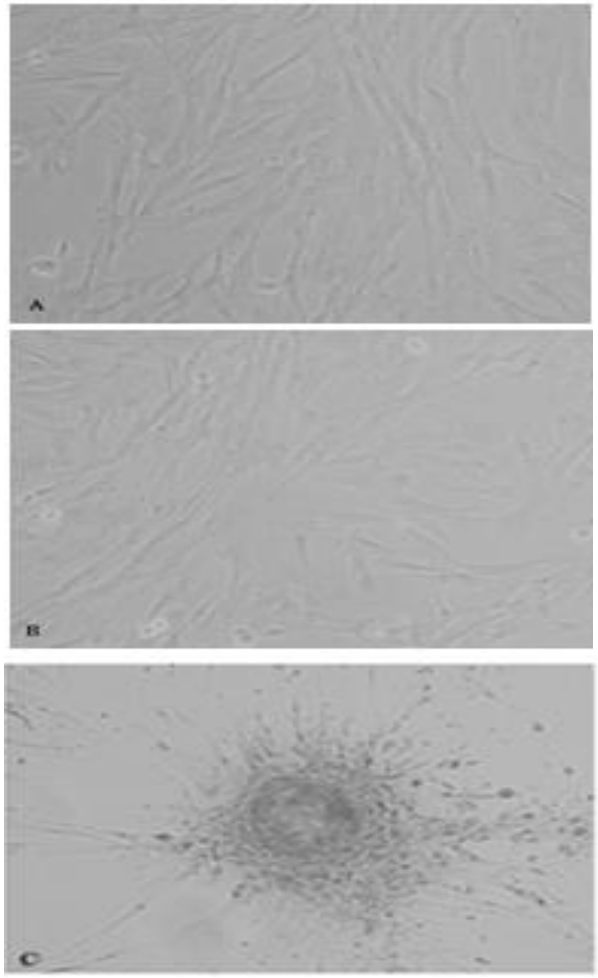
نتایج

سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف در پاساژهای اولیه سلولی در هفته اول بعد از کشت همانند سلول‌های مزانشیمال مغز استخوان فیبروبلاست شکل می‌باشند (شکل۱)، در طی پاساژهای بعدی و هفته‌های دوم این سلو ل‌های بنیادی باریک تر شده و بعد از ۵ روز از کشت اولیه تست آلکالین فسفاتاز انجام شد و بنیادی بودن این سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در نتیجه وجود فعالیت آلکالین فسفاتازی و داشتن ویژگی سلول-های بنیادی جنینی در سلول‌های بنیادی بند ناف نشان داده شد.

[۸] Fetal Cells

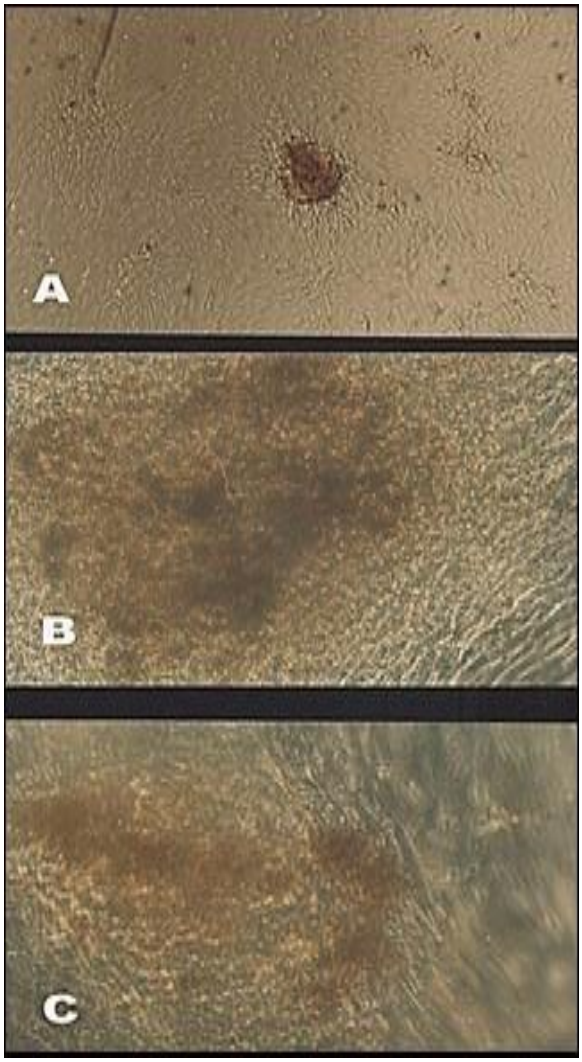
[Downloaded from saremjrm.com on 2024-10-06]

[DOI: 10.61186/sjrm.7.3.157]



شکل ۱: نمایش دیجیتالی مورفولوژی سلول های بنیادی مزانشیمی ماتریکس بند ناف. A) مرحله‌ای از کشت سلول های بنیادی ماتریکس بند ناف در پاساژ اول. تعداد معدودی از سلول‌ها شناورند و هنوز به کف فلاسک نچسبیده-اند (بزرگنمایی۱۰۰x). B) مرحله ای از کشت سلول‌های بنیادی ماتریکس بندناف در پاساژ دوم. سلول‌ها به کف فلاسک چسبیده‌اند و دارای confluency تقریبی ۳۰ تا ۴۰ درصد می‌باشند (بزرگنمایی۱۰۰x). C) مرحله‌ای از کشت سلول‌های بنیادی ماتریکس بندناف در پاساژ سوم..سلول‌ها همگی به کف فلاسک چسبیده‌اند (بزرگنمایی۱۰۰x).

با استفاده از کیت شناسایی، مارکر آلکالین فسفاتاز که نشان‌دهنده وجود سلول‌های بنیادی جنینی تمایز نیافته در کشت بود که نشان داده شد و مکان‌هایی که در آن‌ها اجتماع سلول‌های بنیادی وجود داشتند به رنگ قرمز تند (قهوه‌ای) دیده شدند (شکل ۲). یافته‌ها نشان داد که سلول‌های مزانشیمی ماتریکس بند ناف انسان قادرند در محیط کشت علاوه بر تک لایه سلولی، کلنی‌های آلکالین فسفاتاز مثبت تشکیل دهند. به نظر می-رسد این سلول‌ها از نظر مرحله تمایز به سلول‌های بنیادی جنینی نزدیکتر باشند. شناسایی فعالیت آلکالین فسفاتازی در کشت‌های سلولی به تعداد ۳ بار انجام گرفت و در همه موارد نتایجی مشابه به دست آمد.



شکل ۲: بیان آلکالین فسفاتاز در کلونی متشکله از سلول‌های ماتریکس بندناف.

نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان‌دهنده ی بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول‌های جدا شده از ماتریکس بند ناف (ژله وارتون)می باشد. در این مطالعه، بیان مارکرهایی شاملCD90، CD13، CD49e، CD73 و CD105 در بین جمعیت سلولی ماتریکس بند ناف بررسی گردید (شکل ۳ در انتهای مقاله).

در این مطالعه بیش از ۸۰ درصد سلول‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی MSCs مشتق شده از جمعیت سلولی، سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف مارکرهای CD90، CD73، CD105،CD13 و CD49e را بیان کردند که میزان میانگین±انحراف معیار و معنی داری در سلول بنیادی ماتریکس بند ناف در جدول (۱) نشان داده شد.

جدول۱: میزان بیان مارکرهای ماتریکس بند ناف انسان.

Markers	UCM (%)
CD73	89± 0.6
CD90	93.6 ± 0.6
CD105	90.7 ± 0.7
CD13	80. ± 0.4
CD49e	60.9 ± 0.6

[Downloaded from saremjrm.com on 2024-10-06]
[DOI: 10.61186/sjrm.7.3.157]

بحث

بسیاری از مطالعات به نقش نوظهور سلول های بنیادی مزانشیمی به عنوان یک جمعیت امیدوارکننده برای حمایت از مفاهیم بالینی جدید در سلول درمانی جلب کرده اند. با این حال، منابعی که این سلول ها را می توان از آنها جدا کرد هنوز مورد بحث است. در حالی که مغز استخوان به عنوان منبع اصلی سلول های بنیادی مزانشیمی ارائه می شود، با وجود روش تهاجمی مرتبط با این منبع، امکان جداسازی تعداد کافی از این سلول ها از بند ناف بحث برانگیز است. در اینجا، ما نتایج آزمایش‌هایی را با هدف جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی از ماتریکس بند ناف با استفاده از روش‌های مختلف جداسازی و کشت مختلف ارائه می‌کنیم. استفاده از بافت بندناف به عنوان منبع سلول های بنیادی مزانشیمی را می توان به سال ۲۰۰۰ ردیابی کرد [۱۲]. در این سال Erices و همکارانش نشان دادند که سلول های بندناف قادر به ایجاد دو نوع سلول چسبنده بودند که یکی از آنها آنتی ژن های معمولی سلول های بنیادی مزانشیمی را بیان می کرد. بندناف از یک بافت پیوندی موکوئیدی به نام ژله وارتون تشکیل شده است [۱۳]. ژله وارتون متشکل از سلول‌های استرومایی میوفیبروبلاست شکل میباشد. میوفیبروبلاست‌ها نقش مهمی در رشد، تکامل و ترمیم ایفا می‌کنند و در تمام قسمت‌های بدن وجود دارند [۶]. ژله وارتون از مزودرم خارج جنینی ایجاد می‌شود، رگ‌های بند ناف را می‌بندد و آن‌ها را دربر می‌گیرد و از آن‌ها در برابر پیچ خوردگی و فشار در دوران بارداری محافظت می‌کند. همچنین نقش رگ زایی و متابولیکی برای گردش خون را دارد. از سال ۱۹۹۰، سلول‌های استرومایی، که اساساً شبیه فیبروبلاست‌های مزانشیمی هستند که در طی رشد رحمی در جاهای دیگر یافت می‌شوند، در ژله وارتون انسان شناسایی شدند سلول‌های بنیادی ژله وارتون یک جمعیت سلولی استرومال اولیه هستند که ویژگی-های درمانی دارند [۱۴]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف، جزء سلول-های بنیادی چندتوان بوده که بنا به دلایلی از جمله دسترسی آسان و کم هزینه بودن تهیه آن، منبعی مناسب برای سلول‌های بنیادی می باشند. بنیادی بودن این سلول ها با تمایز آزمایشگاهی [۱۵] و شناسایی نشانگرهای اختصاصی غشای سلول های بنیادی مزانشیمی نشان داده شده است. علاوه بر این، این سلول‌ها نشانگرهای خونساز مانند CD34، CD45 و CD14 را بیان نمی‌کنند [۶، ۱۰، ۱۶]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف توان تمایزی به سلول‌های چربی، غضروفی، استخوانی، عضله قلبی، عضله اسکلتی و سلول‌های اندوتلیالی را در شرایط *In Vitro* دارند [۱۷]. سلول‌های استرومایی بند ناف که تازه کشت داده شده‌اند، ظاهری شبیه سلول‌های فیبروبلاستی نشان می‌دهند [۹، ۱۸]. در این پژوهش هم وقتی بند ناف قطعه قطعه شد و سلول های خونی و بنیادی از محیط حذف گردید. در محیط کشت به طور عمده، سلول‌های ماتریکس بند ناف و کمتر سلول‌های دیگر باقی ماندند که از نظر شکل ظاهری این سلول‌ها هم شبه فیبروبلاستی بودند و زواید سلولی خود را به اطراف گسترش داده و به بستر کشت چسبیده بودند. این شکل شبه فیبروبلاستی را حتی در پاساژهای بعدی هم نشان دادند که با نتایج کارهای گذشته در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی تشابه داشت. در طی تحقیقات گذشته آنالیز فلوسایتومتری نشان می دهد که سلول‌های مزانشیمی جدا شده از بند ناف مارکرهای (CD44، CD105) مارکرهای اینتگرین (CD29، CD51) را بیان می‌کنند اما مارکرهای سلول‌های خونساز (CD34، CD45) را بیان نمی‌کنند. بطور قابل توجه‌ای این سلول‌ها مقدار معنی‌داری از مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمال (CD73، CD105) را بیان می‌کنند [۶]. تا به حال مطالعات زیادی در ارتباط با شناسایی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان انجام گرفته است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف مارکرهای زیادی برای شناخته شدن دارند که مهمترین آنها شامل مارکر CD105 بعنوان یک مارکر سلول‌های بنیادی مزانشیمی چند توان و همچنین مارکر سلول‌های اندوتلیال است. از این رو پیشنهاد شده که CD105 بعنوان یک مارکر جدید در وضعیت تمایزی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف انسان مفید است [۱۹]. مارکر CD73 مارکر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می باشد و نقش مهمی در ارتباطات سلولی در مغز استخوان دارا می‌باشد [۳، ۱۴]. مارکر CD13 به عنوان یک مارکر فیبروبلاستی است که در سلول-های بنیادی مزانشیمال بیان می‌شود [۲۰]. همچنین، مارکر سلول‌های بنیادی خونساز می باشد [۲۱]. مارکر CD49e به عنوان یک مارکری است که در سلول‌های بنیادی مزانشیمال بیانش مثبت می باشد [۳]. مارکر CD90 یک مارکر سلول‌های بنیادی غیرخونساز و همچنین یک مارکر برای سلول‌های بنیادی مزانشیمال میباشد بعنوان یک مارکر تمایزی در سلول‌های بنیادی مزانشیمال است [۲۲]. البته باید توجه کرد که نشانگرهای گفته شده برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان بوده است. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که مارکرهای CD73، CD90 و CD105 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بعد از تمایزات به سلول‌های استخوان، چربی و غضروف کاهش می‌یابد ولی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف فقط مارکر CD105 بعد از تمایز به این سه نوع سلول کاهش یافت بنابراین CD105 بعنوان یک مارکر جدید سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف در درمان سلول بنیادی ارزشمند خواهد بود [۲۳]. یک نظریه رایجی وجود دارد که بیان می‌کند CD90، CD73 و CD105 بطور خیلی بالایی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مارکرهای ویژه‌ای هستند [۲۰]. نویسندگان مشاهده کردند که سلول های جدا شده قادر به تمایز در شرایط آزمایشگاهی به استئوسیت، چربی و غضروفی بودند [۲۴]، اما هیچ مطالعه ای در مورد خصوصیات مولکولی آنها انجام نشده است [۲۵]. با استفاده از RT-PCR، مشاهده کرد که سلول های بنیادی مزانشیمی ازبندناف CD105، CD29 و CD44 را بیان می کنند و برای نشانگر خونساز CD34 منفی بودند. بسیاری از دانشمندان بر منابع جایگزین سلول های بنیادی از بافت های مزانشیمی مختلف، مانند سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بافت چربی [۲۶] و بند ناف تمرکز کرده اند [۲۷]. سلول های بنیادی مزانشیمی نشانگرهای آنتی ژن سطح سلولی مشخصی دارند. همانطور که توسط انجمن بین المللی سلول درمانی گزارش شده است، جمعیت های سلول های بنیادی مزانشیمی CD73، CD90 و CD105 را بیان می کنند. سلول های بنیادی مزانشیمی از ماترکس بندناف و مغز استخوان قادر به تمایز به سلول های

[Downloaded from saremjrm.com on 2024-10-06]

[DOI: 10.61186/sjrm.7.3.157]

چربی، استئوسیت ها و هپاتوسیت ها بودند. پتانسیل گسترش برای سلول های بنیادی مزانشیمی از ماترکس بندناف بالاترین بود. دو جمعیت سلولی دارای فنوتیپ با بیان CD90، CD73 و CD105 بودند. و این تحقیق نشان داد ماتریکس بندناف غنی از سلولهای بنیادی مزانشیمی است [۲۸].

نتیجه گیری

جمعیت سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف یک مورفولوژی فیبروبلاست شکل را نشان دادند. در این مطالعه ما میزان بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمال شامل CD90، CD73، CD13، CD105 و CD49e را در جمعیت سلول‌های بنیادی ژله وارتون انسان ارزیابی کردیم. بیش از ۸۰ درصد جمعیت سلول بنیادی مشتق شده از ماتریکس بند ناف این مارکرهای سلول های بنیادی مزانشیمی را بیان کردند. این نتایج به وضوح ماتریکس بندناف را به عنوان منبع غنی، غیر تهاجمی و فراوان MSC پیشنهاد می کند.

منابع

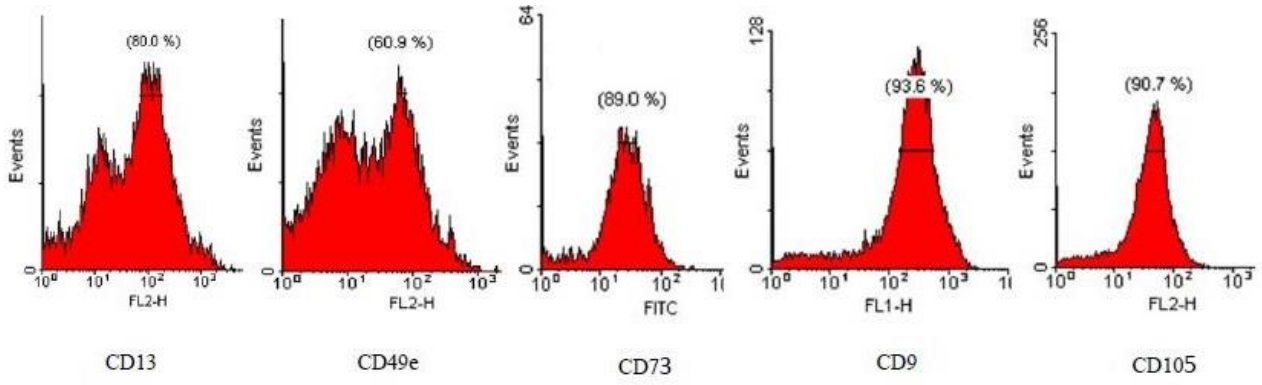
1. Mahabadi, J.A., et al., Derivation of male germ cells from induced pluripotent stem cells by inducers: A review. Cytotherapy, 2018. 20(3): 279-290.
2. Baksh, D., L. Song, and R.S. Tuan, Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. Journal of cellular and molecular medicine, 2004. 8(3): 301-316.
3. Barry, F.P. and J.M. Murphy, Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. The international journal of biochemistry & cell biology, 2004. 36(4): 568-584.
4. Tropel, P., et al., Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. Experimental cell research, 2004. 295(2): 395-406.
5. ML, T.D.W., Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population Stem Cells 26591 2008. 9. Troyer, DL, and Weiss, ML Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells, 2008. 26: 591.
6. Fu, Y.-S., et al., Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. Stem cells, 2006. 24(1): 115-124.
7. Baksh, D., R. Yao, and R.S. Tuan, Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. Stem cells, 2007. 25(6): 1384-1392.
8. Wang, J.-F., et al., Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34 (+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. haematologica, 2004. 89(7): 837-844.
9. Sarugaser, R., et al., Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem cells, 2005. 23(2): 220-229.
10. Weiss, M.L., et al., Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. Stem cells, 2006. 24(3): 781-792.
11. Qiao, C., et al., Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. Cell biology international, 2008. 32(1): 8-15.
12. Erices, A., P. Conget, and J.J. Minguell, Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. British journal of haematology, 2000. 109(1): 235-242.
13. Jiang, Y., et al., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature, 2002. 418(6893): 41-49.
14. Troyer DL‡Weiss, M., Wharton′ s jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells‡2008‡26 (3): 591-599.
15. Lu, L.-L., et al., Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. haematologica, 2006. 91(8): 1017-1026.
16. Secco, M., et al., Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! Stem cells, 2008. 26(1): 146-150.
17. Can, A. and S. Karahuseyinoglu, Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. Stem cells, 2007. 25(11): 2886-2895.
18. Karahuseyinoglu, S., et al., Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem cells, 2007. 25(2): 319-331.
19. Kern, S., et al., Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem cells, 2006. 24(5): 1294-1301.
20. Jones, E. and D. McGonagle, Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. Rheumatology, 2008. 47(2): 126-131.
21. Solter, D. and B.B. Knowles, Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978. 75(11): 5565-5569.

[Downloaded from saremjrm.com on 2024-10-06]
[DOI: 10.61186/sjrm.7.3.157]

22. Wiesmann, A., et al., Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. Head & face medicine, 2006. 2: 1-6.
23. Jin, H.J., et al., Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. Biochemical and biophysical research communications, 2009. 381(4): 676-681.
24. Koch, T.G., et al., Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. BMC biotechnology, 2007. 7: 1-9.
25. Lovati, A.B., et al., Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. Veterinary research communications, 2011. 35: 103-121.
26. Seo, M.J., et al., Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. Biochemical and biophysical research communications, 2005. 328(1): 258-264.
27. Romanov, Y.A., V.A. Svintsitskaya, and V.N. Smirnov, Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem cells, 2003. 21(1): 105-110.
28. Zeddou, M., et al., The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. Cell biology international, 2010. 34(7): 693-701.

[Downloaded from saremjrm.com on 2024-10-06]

[DOI: 10.61186/sjrm.7.3.157]



شکل ۳: نتایج بررسی فلوسایتومتری میزان بیان مارکرهای سطح سلولی ماتریکس بند ناف.

[Downloaded from saremjrm.com on 2024-10-06]

[DOI: 10.61186/sjrm.7.3.157]