Original Article

A Practical Protocol for the Isolation and Characterization of Small Extracellular Vesicles Derived from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells

Milad Khabareh[1], Mahsa Salehi[1] , Somaye Sadeghi[2]

[1]Biological Products and Blood Safety Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Received: 2026/01/31
Accepted: 2026/05/02

http://dx.doi.org/10.66224/bloodj.23.1.34

Citation:
Khabareh M, Salehi M, Sadeghi S. A Practical Protocol for the Isolation and Characterization of Small Extracellular Vesicles Derived from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells. J Iran Blood Transfus. 2026: 23 (1): 34-44

Correspondence: Sadeghi S, Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran.
Tel: (+9821) 82052155
E-mail:
s.sadeghi@tmi.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objectives

Mesenchymal stem cells (MSCs) and their small extracellular vesicles (sEVs)-based therapies have attracted considerable attention as novel therapeutic strategies in preclinical studies and clinical trials. sEVs exhibit therapeutic effects similar to their parental cells while offering higher safety, making them a promising alternative to direct cell transplantation. Consequently, identifying optimal cellular sources and developing efficient methods for sEV isolation are of critical importance. Human umbilical cord Wharton's jelly–derived MSCs (WJ-MSCs), represent a valuable source for sEV production due to ease accessibility; high proliferative capacity, and potent immunomodulatory properties. This study aimed to establish a practical, streaight forward, and cost-effective protocol for the isolation and characterization of WJ-MSC-derived exosomes to enhance precision and reproducibility of laboratory processes.

Materials and Methods

In this Experimental study, MSCs were isolated from two independent human umbilical cord Wharton's jelly specimens using the explant method. Following phenotypic characterization via assessment of surface markers expression (CD73, CD105, CD34 and CD45) and differentiation assays, sEVs were isolated from conditioned medium. Per batch, 15 mL of conditioned medium was collected from multiple culture flasks maintained under identical conditions, using a commercial kit. The morphological characteristics of the isolated sEVs were evaluated by scanning electron microscopy (SEM), and their protein concentration was determined using the Bradford assay.

Results

Flowcytometric analysis revealed high expression of MSC-associated markers CD73 (98.8%) and CD105 (93.8%), while hematopoietic markers CD34 and CD45 were expressed at levels below 2%. The osteogenic and adipogenic differentiation potentials of the cells were also confirmed. SEM images demonstrated preserved membrane integrity and spherical morphology of the isolated sEVs, with a size distribution falling within the expected range of approximately 40–60 nm. The protein concentration of the isolated sEVs was quantified at 500 µg/mL based on the Bradford assay (n = 3).

Conclusions

These findings indicate that the explant method, in conjunction with density gradient centrifugation–based commercial kits, provides a simple, cost-effective, and efficient approach for the isolation of WJ-MSCs and production of high-quality sEVs, thereby providing a practical platform for future preclinical and translational applications.

Key words: Umbilical cord, Wharton Jelly, Mesenchymal stem cell, Extracellular Vesicles

Copyright © 2025 Journal of Iranian Blood Transfusion, Published by Blood Transfusion Research Center.
This work is licensed under a Creative Common Attribution-Non Commercial 4.0 International license.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.34]

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۲۳ شماره ۱ بهار ۱۴۰۵ (۴۴-۳۴)

مقاله پژوهشی

دستورالعمل کاربردی جداسازی و مشخصه یابی وزیکول‌های خارج سلولی کوچک از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون بند ناف انسانی

میلاد خباره[۱]، مهسا صالحی[۲]، سمیه صادقی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی ـ مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی ـ استادیار مرکز تحقیقات فرآورده های بیولوژیک و سلامت خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- دکترای تخصصی ایمونولوژی پزشکی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۱/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۱۲

http://dx.doi.org/10.66224/bloodj.23.1.34

Citation:
Khabareh M, Salehi M, Sadeghi S. A Practical Protocol for the Isolation and Characterization of Small Extracellular Vesicles Derived from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells. J Iran Blood Transfus. 2026: 23 (1): 34-44

نویسنده مسئول:
دکتر سمیه صادقی. استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
E-mail: s.sadeghi@tmi.ac.ir

کد اخلاق:
IR.SBMU.ENDOCRINE.REC.1400.140

چکیده

سابقه و هدف

امروزه درمان‌های مبتنی بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) و وزیکول‌های خارج سلولی کوچک (sEVs) مشتق از آن‌ها به عنوان یک رویکرد درمانی نوین، توجه گسترده‌ای را در مطالعه‌های پیش بالینی و کارآزمایی‌های بالینی به خود جلب کرده‌اند. ذرات sEV ضمن دارا بودن اثرات درمانی مشابه با سلول‌های مادر از ایمنی بالایی برخوردارند. از این‌رو جایگزین مناسبی برای سلول درمانی مستقیم محسوب می‌شوند. شناسایی منبع سلولی مناسب و توسعه روش‌های کارآمد جهت استخراج این وزیکول‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژل وارتون بند ناف انسانی به دلیل دسترسی آسان، قدرت تکثیر بالا و خواص ایمنی تنظیمی مطلوب، به عنوان یکی از منابع ارزشمند در این زمینه مطرح هستند. هدف از این مطالعه، ارائه دستورالعمل کاربردی، آسان و مقرون به صرفه برای استخراج و مشخصه‌یابی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های مزانشیمی ژل وارتون بند ناف انسانی است تا دقت و تکرارپذیری فرآیندهای آزمایشگاهی ارتقا یابد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از دو نمونه مجزای بافت ژل وارتون بند ناف انسانی با روش Explant استخراج شدند. پس از تأیید فنوتیپ سلول‌ها از نظر بیان مارکرهای CD73، CD45، CD34، CD105 و پتانسیل تمایزی آن‌ها به سلول‌های چربی و استئوبلاست‌ها، جهت استخراج sEVs، در هر نوبت ۱۵ میلی‌لیتر از سوپرناتانت سلولی حاصل از چند فلاسک کشت تحت شرایط یکسان جمع‌آوری و با استفاده از کیت تجاری استخراج sEVs فرآوری شد. خصوصیات مورفولوژیک sEV ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)و غلظت پروتئینی آن‌ها با آزمون برادفورد مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های مشتق از سلول‌های مزانشیمی ژل وارتون بند ناف انسانی، بیان بالایی از مارکرهای CD73 (۹۸/۸٪) و CD73 (۹۳/۸٪) داشته در حالی که بیان مارکرهای خونساز CD34 وCD45 کمتر از ۲٪ بود. هم‌چنین، توان تمایز سلول‌ها به رده‌های استخوانی و چربی تأیید شد. تصاویرSEM ، حفظ تمامیت غشایی و مورفولوژی کروی ذرات sEV را در محدوده ابعادی مورد انتظار (۶۰-۴۰ نانومتر) نشان داد. غلظت پروتئینی وزیکول‌های خارج سلولی کوچک استخراج شده بر اساس آزمون برادفورد برابر با ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (n= ۳) محاسبه گردید.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که روش Explant به همراه استفاده از کیت‌های مبتنی بر سانتریفیوژ شیب چگالی، روشی ساده، مقرون به صرفه و کارآمد برای استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون و تولید ذرات وزیکول‌های خارج سلولی کوچک با کیفیت مناسب است و می‌تواند به عنوان یک راه‌کار عملی جهت تولید ذرات وزیکول‌های خارج سلولی کوچک مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بند ناف، ژل وارتون ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، وزیکول‌های خارج سلولی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.34]

مقدمه

امروزه درمان مبتنی بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells : MSCs) و ترشحات آن‌ها، به ویژه وزیکول‌های خارج سلولی(Extracellular Vesicles : EVs)، به عنوان یک استراتژی نوظهور در پزشکی بازساختی شناخته می‌شوند. بر اساس بیانیه استاندارد انجمن بین‌المللی وزیکول‌های خارج سلولی (Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles : MISEV)، این وزیکول‌ها بر حسب اندازه به دو دسته کلی EVs بزرگ و EVs کوچک (sEVs یا smal EVs) تقسیم می‌شوند. ذرات sEV، وزیکول‌هایی با منشأ اندوزومی و محدوده اندازه ۴۰ تا ۱۵۰ نانومتر هستند که نقش حیاتی در ارتباطات بین سلولی و انتقال پیام‌های بیولوژیک ایفا می‌کنند (۳-۱).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی یکی از مهم‌ترین منابع جهت استخراج ذرات sEV محسوب می‌شوند. بر طبق تعریف انجمن بین‌المللی سلول درمانی (ISCT : International Society for Cellular Therapy)، سلول‌های MSC، به عنوان سلول‌های استرومایی چند توان با ویژگی‌های خود تجدید شوندگی، توانایی اتصال به پلاستیک در شرایط کشت استاندارد، ظرفیت تمایز به دودمان‌های سلولی متعدد و بیان نشانگرهای سطحی مانند CD105، CD73 و CD90 و عدم بیان مارکرهایی همچون CD34 و CD45 درنظر گرفته می‌شوند (۴). اگر چه این سلول‌ها از بافت‌های متنوعی نظیر مغز استخوان، چربی و خون قاعدگی قابل استخراج هستند، اما در سال‌های اخیر، بافت بند ناف انسان به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد، مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است (۷-۵). بند ناف شامل عروق خونی و غلاف آمنیوتیک است که توسط ماده ژلاتینی محافظی به نام ژل وارتون (Wharton's Jelly) احاطه شده‌اند (۸). سلول‌های بنیادی مشتق از ژل وارتون، به دلیل دسترسی آسان، روش جداسازی غیر تهاجمی، عدم وجود چالش‌های اخلاقی، خاصیت هتروژنیسیته محدودتر و توان تکثیر بالا، منبعی ایده‌آل برای استخراج ذرات sEV در مقیاس صنعتی و بالینی به شمار می‌روند (۱۰، ۹).

کاربرد درمانی sEVs به دلیل توانایی آن‌ها در انتقال اطلاعات بیولوژیک سلول‌های والد، پایداری بالا در برابر تخریب دارویی، سمیت ناچیز و قابلیت فرار از سیستم رتیکولوآندوتلیال، افق‌های جدیدی را در درمان بیماری‌های مختلف گشوده است (۱۰، ۹). با این حال، دستیابی به دستورالعمل‌های دقیق جهت جداسازی با کیفیت بالا هم‌چنان یک چالش کلیدی است. لذا در این مطالعه، با هدف ارتقای دقت در فرآیندهای آزمایشگاهی، دستورالعمل کاربردی، ساده و مقرون به صرفه برای استخراج سلول‌های WJ-MSC به روش مهاجرت سلول از قطعه بافتی (Explant) و متعاقب آن، جداسازی sEVs از سوپ رویی این سلول‌ها با استفاده از کیت‌های تجاری بر پایه سانتریفیوژ شیب چگالی پیاده‌سازی گردید. این روش برخلاف روش‌های آنزیمی، آسیب کمتری به سلول‌ها وارد کرده و منجر به تولید جمعیت‌های سلولی با خلوص و توان تمایزی بالا می‌شود. در نهایت، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، غلظت پروتئینی و ساختار مورفولوژیک وزیکول‌های حاصله جهت ارزیابی کارآمدی روش، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

فاز اول: استخراج sEVs

نمونه‌های بند ناف از نوزادان تازه متولد شده، از پژوهشگاه رویان تهران، تهیه و تحت شرایط استریل درون نرمال سالین به آزمایشگاه منتقل شدند و تمام آزمایش‌های شرح داده شده در ادامه، در شرایط استریل و زیر هود لامینار انجام شد. در این مطالعه از ۲ نمونه بافت ژل وارتون بند ناف انسانی مجزا با روش Explant (قطعات بافتی به طول تقریبی ۵ میلی‌لیتر) جهت استخراج سلول‌های MSC استفاده گردید. بدین صورت که، نمونه بند ناف با PBS حاوی پنی‌سیلین و استرپتومایسین به منظور از بین بردن آلودگی‌های باکتریایی شستشو داده شد. سپس رگ‌های خونی، شامل یک سیاهرگ بزرگ و دو سرخرگ کوچک، جداسازی شده و بافت ژل وارتون با قیچی به قطعات کوچکتر (۵ میلی‌متر) تقسیم گردید. سپس با شستن مکرر با PBS ، باقیمانده‌های خون پاک و قطعات کوچک بافتی (تعداد ۵ الی۶ قطعه) به فلاسک ۲۵ سانتی‌متری انتقال داده شد و به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا بیشترین میزان چسبندگی بین قطعات بافتی و کف فلاسک فراهم شود. جهت دست‌یابی به میزان حداکثر سلول آزاد شده از قطعات بافتی، عدم جابه‌جایی تکه‌های بافتی در پلیت یا فلاسک کشت نقش مهمی در خروج سلول‌ها از قطعات بافتی دارد، لذا توصیه می‌شود قبل از اضافه کردن محیط کشت به فلاسک کشت سلولی، ابتدا قطعات بافتی به مدت ۳ الی ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردد تا بیشترین میزان چسبندگی بین قطعات بافتی و کف فلاسک ایجاد شود (۱۱).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.34]

سپس، به هر فلاسک محیط کشت DMEM-F12 به همراه ۱۰ درصد FBS ، اضافه گردید. فلاسک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO_2 انکوبه شد و سپس محیط کشت آن‌ها با دقت و به آرامی تعویض شد. در طول زمان انکوباسیون، به تدریج سلول‌های بنیادی مزانشیمی شروع بـه خروج از قطعه‌های بافتی و انتشار در کف پلیت می‌کنند و معمولاً ۵ الی ۷ روز بعد از انکوباسیون، سلول‌های کوچک در اطراف قطعات بافت قابل رؤیت است. پس از این که جمعیت سلول‌های آزاد شده به تراکم مناسب رسید، قطعات بافتی از فلاسک کشت برداشته شد و به سلول‌های آزاد شده اجازه رشد داده شد تا به تراکم مناسب برسند. پس از آن که تراکم آن‌ها در محیط کشت به طور تقریبی به ۸۰ درصد رسید، سلول‌ها با استفاده از تریپسین-EDTA استخراج شدند (۱۲).

پتانسیل تمایز سلول‌های WJ-MSC :

به منظور رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب (۸۰٪) و اطمینان از خلوص و حفظ ویژگی‌هـای مورفولوژیک (دوکی شکل بودن) سلول‌های مزانشیمی، در طی پاساژهای اولیه از سلول‌های پاساژ ۲ استفاده و پس از رسیدن به تراکم ۸۰ درصد، پتانسیل تمایز سلول‌های WJ-MSC به استئوبلاست‌ها و سلول‌های چربی مورد بررسی قرار گرفت (۴).

بدین صورت که، با توجه به مدت زمان نسبتاً طولانی انکوباسیون سلول‌ها (۲۱ روز) جهت آزمایش‌های تمایزی و جهت جلوگیری از ریزش سلول‌ها در اثر تراکم بیش از اندازه سلولی، ۱۰ هزار سلول WJ-MSC در پاساژ ۲، به پلیت چهارخـانه منتقل و پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO_2 ، محیط کشت موجود در چاهـک‌ها با ۱ میلی‌لیتر محیط تمایز استئوژنیک [شامل دگزامتازون (۱۰۰ میلی‌مولار)، گلیسرول فسفات (۱۰ میلی‌مولار)، و اسید اسکوربیک (۵۰ میکرومولار) به همراه ۱۰ درصد FBS] و یـا محیط تمایز آدیپوژنیک [شامل ایندومتاسین (۱۰۰ میلی‌مولار)، ۳-ایزوبوتیل- متیل گزانتین (۰/۵ میلی‌مولار)، دگزامتازون (۲۵۰ میلی‌مولار)، و انسولین (۵ میلی‌مولار) بـه همراه ۱۰ درصد FBS] جایگزین شد. به مدت ۲۱ روز محیط تمایزی هر ۳ روز یک بار تعـویض گردید و پس از ۲۱ روز، تمایز سلول‌ها به بافت استخوان و چربی به ترتیب با رنگ‌آمیزی Alizarin Red و Oil Red O مورد سنجش قرار گرفت (۴). رنگ‌آمیزی Alizarin Red برای مشاهده تجمعات ترکیبات معدنی خارج سلولی و تایید تمایز به استخوان، و Oil Red O برای تایید تجمع قطرات لیپیدی (چربی) در داخل سلول‌های تمایز یافته انجام شد.

تجزیـــه و تحلیل فنوتیپ سـلول‌های WJ-MSC به کمک فلوسیتومتری:

برای تجزیه و تحلیل نشانگرهای سطحی، سلول‌های WJ-MSC در پاساژ دوم (حدود ۱×۱۰^{۶} سلول) به صورت سوسپانسیون تک سلولی با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه CD73، CD45، CD34، CD105 رنـگ‌آمیزی شدند. داده‌ها با نرم‌افزار Flowjo 7.6.1 تجزیه و تحلیل شد (۴).

تهیه سوپ سلولی WJ-MSC جهت جداسازی ذرات sEV :

ذرات sEV از محیط کشت سلول‌های WJ-MSC به دست آمد (۱۳). به طور خلاصه، جهت استخراج sEVs از سوپ سلولی حاصل از سلول‌های WJ-MSC در پاساژ دوم با تراکم ۸۰ درصد استفاده شد. هر ۲ الی ۳ روز، محیط کشت سلول‌ها با FBS کمتری جایگزین شد. بدین صورت که FBS محیط از ۱۵ درصد به صورت تدریجی به ۷ ، ۵ ، ۲ و صفر کاهش یافت تا سلول‌ها با محیط کشت بدون سرم سازگار شوند. در نهایت پس از این که میزان FBS محیط به صفر رسید، مایع رویی حاصل از چند فلاسک کشت سلولی که تحت شرایط یکسان کشت داده شده بودند، جمع‌آوری و با استفاده از فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتری فیلتر شد تا بقایای سلولی حذف شود و در نهایت در منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

استخراج ذرات sEV مشتق از سلول‌های WJ-MSC :

جداسازی MSC-sEV از مایع رویی تهیه شده با استفاده از دستورالعمل کیت Exocib (Cib Biotech Co.) انجـام شد. اساس عملکرد این کیت بر مبنای سانتریفیوژ شیب چگالی است. اساس این کیت ایجاد لایه‌هایی از محلول با چگالی متفاوت است که در آن ذرات sEV بر اساس وزن مخصوص خود در لایه مناسب قرار می‌گیرند. ابتدا ۱۵ میلی‌لیتر از مایع رویی فیلتر شده دفریز شد و با ۳ میلی‌لیتر معرف A موجود در کیت مخلوط شد. پس از گذشت یک شب انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، لوله‌ها به مدت ۴۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. در نهایت،

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13]
[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.34]

بسته به اندازه رسوب، ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر PBS به رسوب اضافه شد و مخلوط دوباره به حالت تعلیق درآمد.

عکسبرداری توسط میکروسکوپ الکترونی SEM:

برای مشاهده مورفولوژی ذرات sEV از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM (Scaning electron microscopy) استفاده شد. بدین منظور، سوسپانسیون sEVs ابتدا باPBS رقیق گردید (به نسبت ۱ به ۱۰). سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه روی لامل شیشه‌ای تمیز قرار داده شد و اجازه داده شد تا در دمای اتاق در شرایط خلأ خشک شود. پس از آماده‌سازی نمونه طبق دستورالعمل استاندارد دستگاه، (SEM-SDBON ، AIS- ۲۱۰۰) در دانشگاه امیرکبیر تصویربرداری انجام گرفت.

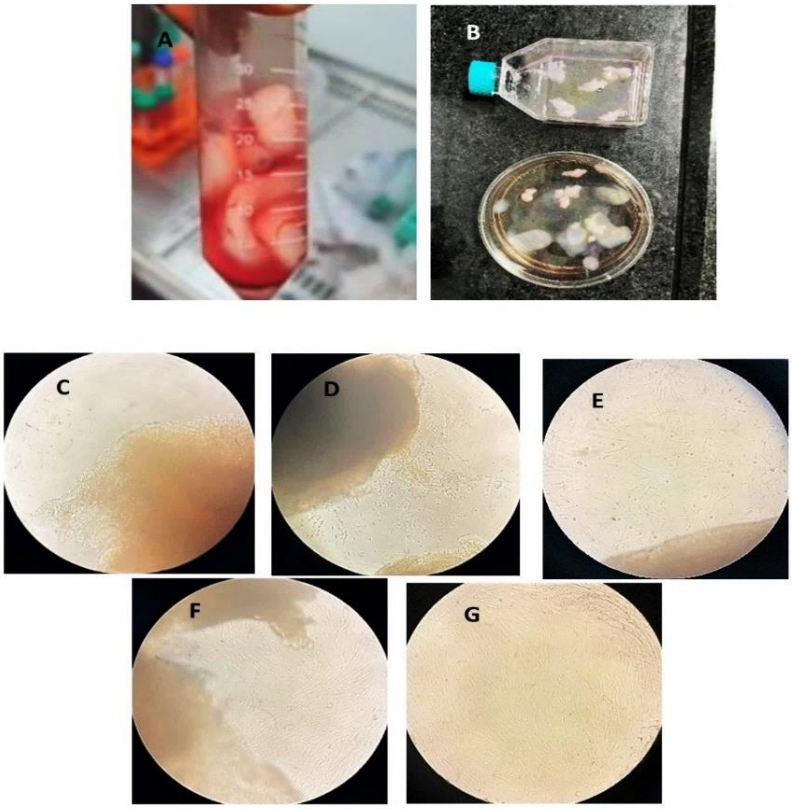
تعیین غلظت پروتئین sEV با استفاده از روش برادفود:

تعیین غلظت پروتئین sEVs مطابق با دستورالعمل کیت پروتوسیب انجام شد، بدین صورت که نمونه sEVs و یا رقت‌های متوالی پروتئین BSA به عنوان استاندارد (۱۲۵ میکرولیتر) با محلول کوماسی (۱۲۵ میکرولیتر) مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانش گردید و مقدار غلظت sEVs به کمک رسم نمودار از نمونه‌های استاندارد محاسبه شد.

یافته‌ها

جداسازی سلول‌های WJ-MSC با روش Explant:

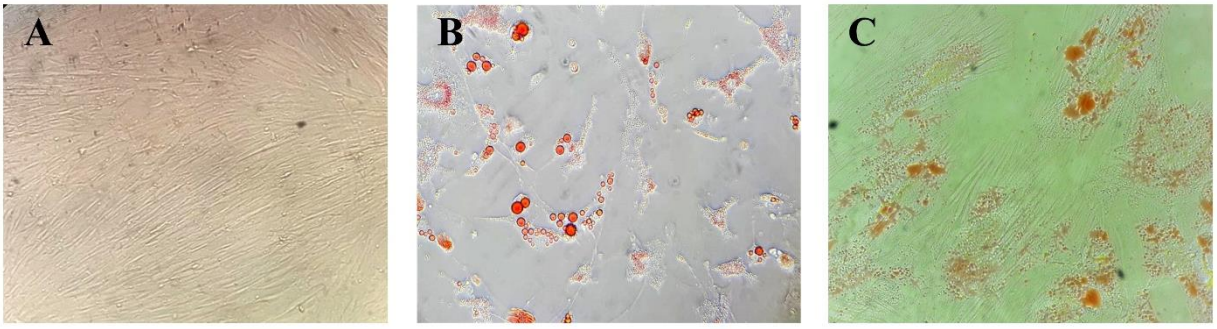
جداسازی سلول‌های MSC با استفاده از قطعات بافت ژل وارتون بند ناف انسان صورت گرفت (شکل ۱). بعد از قرار دادن قطعات بافتی در فلاسک‌های کشت، در روزهای ۵ الی ۷، اولین مهاجرت سلولی در اطراف بافت قابل مشاهده بود. در ابتدا مورفولوژی سلول‌ها گرد و سپس تغییر شکل داده و تبدیل به سلول‌های دوکی شدند. پس از حصول تراکم سلولی در اطراف هر قطعه بافتی (روزهای ۱۰ الی ۱۴)، قطعات بافت ژل وارتون از فلاسک‌ها خارج گردید تا سلول‌های آزاد شده تکثیر و گسترش یابند (شکل ۱).



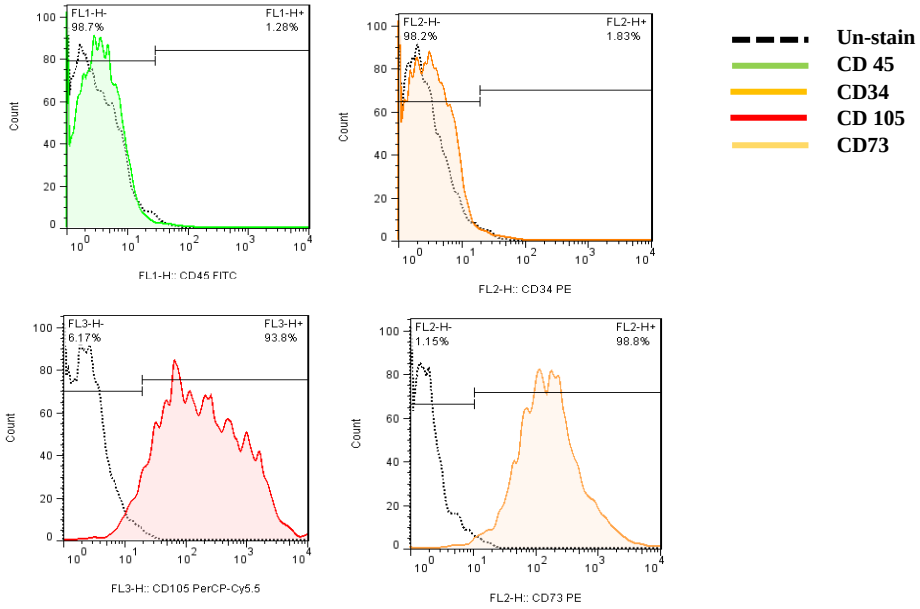
شکل ۱: جداسازی سلول‌های WJ-MSC از بافت ژل وارتون انسانی. A) نمایی از نمونه بند ناف انسانی، B) قطعات ژل وارتون برش داده شده به ابعاد ۵ میلی‌متری. بررسی مهاجرت سلول‌ها از قطعات بافتی در روزهای C) ۱ و D) ۵، E) 7 F) ۱۰ و G) ۱۴روز پس از کشت.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13]

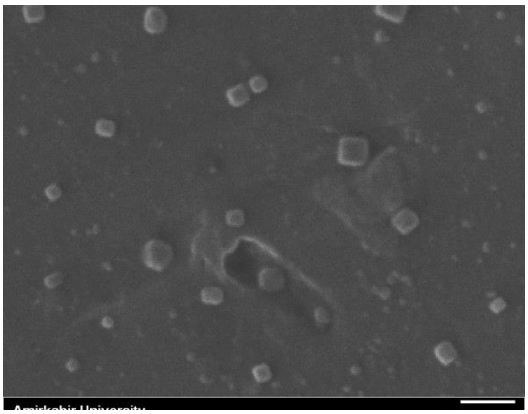
[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.34]



شکل ۲: نمای میکروسکوپی از سلول‌های WJ-MSC و تایید تمایز آن‌ها: A) مورفولوژی دوکی شکل سلول‌های WJ-MSC (پاساژ دوم) پس از گذشت یک هفته در محیط کشت. B) نمای تشکیل قطرات چربی در داخل سلول‌ها پس از گذشت ۲۱ روز در محیط تمایزی القاکننده آدیپوسیت و رنگ‌آمیزی Oil red O . C) نمای رسوب ترکیبات معدنی در اطراف سلول‌ها پس از ۲۱ روز کشت در محیط تمایزی القاکننده استئوسیت و رنگ‌آمیزی Alizarin red .



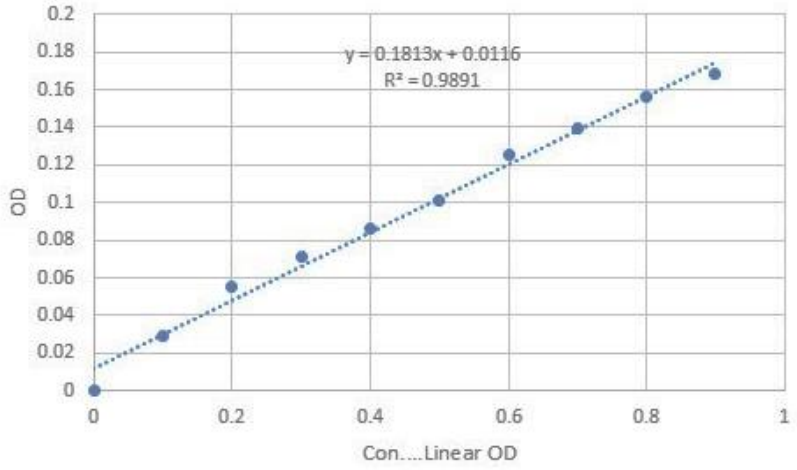
شکل ۳: بیان مارکرهای سطحی در سلول‌های WJ-MSC به کمک فلوسیتومتری



شکل ۴: میکروگراف میکروسکوپ الکترونی SEM از ذرات sEV

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.34]



شکل ۵: منحنی استاندارد آزمون برادفورد به همراه معادله محاسبه غلظت نشان داده شده است.

تجزیه و تحلیل تمایز سلول‌های WJ-MSC به سلول‌های استخوانی و چربی:

سلول‌های جدا شده از قطعات بافت ژل وارتون انسانی، با ویژگی چسبندگی به کف فلاسک کشت رشد کرده و در هفته دوم کشت به ۸۰٪ تراکم رسیدند. در این مرحله سلول‌ها پاساژ داده شدند و به فلاسک جدید انتقال داده شدند. این سلول‌ها موفولوژی دوکی شکل را نشان دادند و ویژگی‌های مورفولوژیکی این سلول‌ها در طی پاساژهای متوالی حفظ شد (شکل ۲A). سلول‌های WJ-MSC در پاساژ دوم، از نظر توانایی تمایز به رده سلولی تأیید شدند. بدین صورت که توانایی تمایز این سلول‌ها پس از ۲۱ روز از انکوباسیون سلول‌ها در محیط تمایزی القای استئوسیت و آدیپوسیت بررسی شد. تجمع قطرات لیپیدی در سلول‌های تمایز یافته با استفاده از روش رنگ‌آمیزی Oil Red O تأیید شد (شکل ۲B). هم‌چنین، تجمعات ترکیبات معدنی خارج سلولی با رنگ‌آمیزی Alizarin Red S مشاهده گردید (شکل ۲C).

بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های WJ-MSC با روش فلوسیتومتری:

فنوتیپ سلول‌های WJ-MSC به کمک فلوسیتومتری بررسی گردید. نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌ها به لحاظ بیان مارکرهای CD73 (۹۸/۸٪) و CD105 (۹۳/۸٪) مثبت بودند (شکل ۳). در حالی که بیان مارکرهای CD34 (۱/۸۳٪) و CD45 (۱/۲۸٪) منفی بود (شکل ۳).

بررسی ذرات sEV های جداسازی شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM:

نتایج حاصل از میکروگراف‌های میکروسکوپ الکترونی نشان داد که بیشترین وزیکول‌های استخراج شده با ظاهری کروی و محدوده اندازه بین ۶۰-۴۰ نانومتر تأیید گردید (شکل ۴).

تعیین غلظت sEV به کمک برادفورد:

به منظور انجام آزمایش برادفورد، همان طور که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شد، پس از مشخصه‌یابی سلول‌ها، جهت استخراج ذرات sEV، در هر نوبت ۱۵ میلی‌لیتر از سوپرناتانت سلولی جمع‌آوری و با استفاده از کیت Exocib فرآوری شد. بسته به اندازه رسوب، ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر PBS به رسوب اضافه و سوسپانسیون مجدداً به حالت تعلیق درآمد. برای آزمایش برادفورد و به منظور تعیین غلظت پروتئینی ذرات sEV، رسوب‌های حاصل از چندین نوبت استخراج (که هر کدام در ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر PBS تعلیق شده بودند) جهت یکنواخت‌سازی میانگین غلظت، تجمیع (Pool) گردیدند. سپس، جهت انجام آزمایش برادفورد، مقدار مورد نیاز مطابق با کیت (۱۲۵ میکرولیتر) از سوسپانسیون نهایی sEVs برداشته شد. غلظت پروتئین sEVs با ترسیم منحنی استاندارد کیت و در سه تکرار مستقل (n= ۳) تعیین شد (شکل ۵). میانگین غلظت پروتئین sEVs به دست آمده حدود ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

لازم به ذکر است که این آزمایش میزان پروتئین در

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.34]

نمونـه را نشان می‌دهد و جهت بررسی اختصاصی پروتئین‌های sEVs توصیه می‌شود از روش‌های اختصاصی‌تر هم چون روش وسترن بلات استفاده کرد.

بحث

ذرات sEV مشتق از سلول به دلیل ویژگی‌های کلیدی خود مـانند ایمنی‌زایی کم، پایداری فیزیکوشیمیایی بالا و امکان نگهداری طولانی مدت، ظرفیت نفوذ بـه بافت‌ها و ظرفیت ذاتی برای برقراری ارتبـاط طولانی مدت با سایر سلول‌ها، عدم خطرات و محدودیت‌های مرتبط با درمان بر پایـه سلول، کاندیدای درمانی امیدوارکننده‌ای در زمینه پزشکی مدرن محسوب می‌شود (۱۴).

با این وجود، عملکرد و خلوص و خواص فیزیکوشیمیایی ذرات sEV تحت تأثیر منشاء سلولی مناسب و انتخاب روش‌های جداسازی اگزوزم قرار می‌گیرد. لذا، امکان تولید sEVs در مقیاس بـالا و ضرورت وجود یک منبع سلولی مناسب مورد توجه محققان و دانشمندان است (۱۵، ۴). سلول‌های بنیادی مزانشیمی یکی از بهترین منابع sEVs محسوب می‌شوند. به طور عمده، سلول‌های MSC به راحتی از تمام بافت‌های انسانی به دست می‌آیند و به واسطه گسترش آسان در مقادیر زیاد بدون از دست دادن خواص بازسازی خود، به عنوان یک منبع مقیاس پذیر و درازمدت از sEVs در نظر گرفته می‌شوند (۱۵، ۴).

در میان منابع مختلف جهت جداسازی سلول‌های MSC، بند ناف یک منبع سلولی مناسب، در دسترس و فاقد مشکلات اخلاقی است (۱۶). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که در مقایسه با سلول‌های MSC استخراج شده از سایر بافت‌ها، سلول‌های WT-MSC دارای پتانسیل تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی قوی‌تر و تکثیر بالاتری هستند (۱۸، ۱۷). شایان ذکر است که سلول‌های MSC مستخرج از خون بند ناف ویژگی‌های مشابهی با سلول‌های WJ-MSC دارند، با این حـال، به دلیل فراوانی کم، نرخ تکثیـر ضعیف و محدودیت‌های کشت، برای کاربردهـای بالینی جذابیت کمتری دارند. هم‌چنین استفاده از روش‌های غیر تهاجمی و بـدون درد در استخراج سلول‌های WJ-MSC، آن‌ها را به عنوان جـایگزین بهتری برای کاربردهای بالینی تبدیل کرده است (۱۹). از آن جایی که خون بند ناف منبع غنی از سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز خونساز است و میزان سلول‌های MSC پـایینی دارد، در مقایسه با ژل وارتون، استخراج سلول‌های MSC از خون بند ناف دشوار و با راندمان پایین است در حالی کـه ژل وارتون منبع غنی از این سلول‌ها است. علاوه بر این، تنوع زیـاد در مورفولوژی سلول‌های استخراج شده از خون بند ناف، سبب کارآیی پایین این منبع سلولی می‌شود (۲۲-۲۰).

در مقایسه با سلول‌های مزانشیمی مشتق از جفت (P-MSCs = Placental mesenchymal stem cells)، علی‌رغم شباهت در مورفـولوژی، ایمونوفنوتیپ و پتانسیل تمایز به استئوبلاست‌ها و آدیپوسیت‌ها، سلول‌های WJ-MSC زمان دو برابر شدن سلولی کوتاه‌تر، نرخ تکثیر بالاتر و نرخ تشکیل کلونی بیشتری دارند، که نشان‌دهنده چشم‌انداز کاربردی بهتر برای این سلول‌ها است (۲۴، ۲۳). از طرفی، جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جفت، پیچیده بوده و احتمال آلودگی بـا سلول‌های مادری زیاد است، که این موضوع نشان‌دهنده مزیت سلول‌های WJ-MSC از نظر سهولت جداسازی و خلوص در مقایسه با منابع جفتی است (۲۵). هم‌چنین درمطالعه‌ای در مقایسه بین سلول‌های BM-MSC، WJ-MSC و AT-MSC، گزارش شده است که سلول‌های WT-MSC و BM-MSC دارای قدرت تکثیر بالاتری در مقایسه با سلول‌های AT-MSC بوده و الگوی بیان ژن در سلول‌های WT-MSC مشابه با سلول‌های AT-MSC می‌باشد (۲۶).

امروزه با توجه به اهمیت روش‌های نوین درمان و توسعه مبتنی بر سلول، شناسایی و دستیابی به روش‌های مناسب جهت استخراج و تکثیر این سلول‌ها در مقیاس بالا بسیار حائز اهمیت است. در حال حاضر، روش‌های مختلفی جهت استخراج سلول‌های MSC در مطالعه‌های مختلف گزارش و مقایسه شده‌اند از جمله روش‌های آنزیمی و Explant (۲۹-۲۷). روش‌های آنزیمی متعدد بر پایه استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند کلاژناز، تریپسین و آنزیم‌های دیگر نظیر هیالورونیداز در جهت حذف ماتریکس خارج سلولی و آزادسازی سلول‌ها استواراست (۳۰). در روش Explant قطعات کوچک بافتی در محیط کشت قرار داده می‌شود تا سلول‌ها به تدریج از بافت خارج شوند. در مقایسه با روش آنزیمی، روش Explant آسانتر، و مقرون به صرفه‌تر بوده و سلول‌ها با آسیب‌دیدگی کمتر مواجه می‌شوند و درصد زنده‌مانی بالاتری دارند و هم‌چنین این سلول‌ها میزان رشد بیشتری را در مدت زمان کوتاه پس از استخراج نشان می‌دهند (۲۹). در مطالعه‌های بسیاری این دو روش بـه منظور استخراج سلول‌های MSC مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته‌اند. در مطالعه پریا و همکاران نشان داده شده است که

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.34]

سلول‌های به دست آمده از این دو روش از نظر بیان مارکرهای سطحی (CD34، CD44، CD73، CD90، CD105 و HLA-DR) و فعالیت‌های ایمنی تفاوت کمی دارند، به طوری که هر دو روش تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood : PBMC mononuclear cell) را تحریک نکرده و تکثیر لنفوسیت‌ها را سرکوب می‌کنند. با این وجود، درصد بسیار پایین سلول‌های $HLA\text{-}DR^+$ خونی در پاساژ اول از سلول‌های MSC استخراج شده با روش Explant نشان‌دهنده جمعیت یکنواخت‌تر سلول‌های MSC است (۳۱). روش Explant منجر به برداشت سلول‌های خالص‌تر و کم‌هتروژن‌تر با نرخ تکثیر بالاتر نسبت به روش آنزیمی می‌شود، در حالی که هضم آنزیمی علاوه بر جداسازی سلول‌های استم سل شبه فیبروبلاست (Fibroblast-like stem cells)، موجب آزادسازی سلول‌های اندوتلیال و پری‌سیت‌ها نیز می‌گردد (۳۲). لذا تجمع سلولی یکنواخت‌تر و آسیب کمتر ناشی از آنزیم‌ها، دلیل افزایش نرخ تکثیر سلول‌هایMSC به دست آمده از روش Explant است (۳۲، ۳۱).

یون و همکاران نیز در مطالعه خود گزارش کردند که تعداد اولیه سلول‌ها در روش Explant بیشتر بوده است (تا ۲/۸ برابر بیشتر در پاساژ P0) (۳۳). جینگ و همکاران نشان دادند که تعداد سلول‌ها در دو روز اول پس از استخراج به کمک روش Explant کم است، اما به سرعت در روزهای بعد افزایش می‌یابد و در نهایت سلول‌های اولیه به دست آمده با دو روش تقریباً هم‌زمان به کانفلوئنسی ۸۰٪ رسیدند. آن‌ها نشان دادند که روش Explant بازده بیشتری از سلول‌های استرومال نسبت به روش هضم آنزیمی ارائه می‌دهد، که احتمالاً به دلیل کاهش قابلیت چسبندگی سلول‌های قرار گرفته در معرض آنزیم و از دست رفتن سلول‌ها در طول فرآیندهای فیلتراسیون و شستشو در روش هضم آنزیمی است (۳۴). لذا استفاده از روش‌های غیر آنزیمی در جهت جداسازی سلول‌های MSC توصیه می‌شود. در این مطالعه نیز از روش Explant در جهت استخراج سلول‌های WT-MSC استفاده گردید و معیارهای اصلی در جهت تائید و خلوص سلول‌های MSC بر اساس انجمن بین‌المللی سلول درمانی (ISCT)، هم‌چون بررسی مورفولوژی و توانایی چسبندگی این سلول‌ها به سطح، میزان تکثیر و قدرت تمایز آن‌ها به بافت چربی و استخوان و حضور مارکرهای مختص سلول‌های MSC (CD73 و CD105) و عدم حضور مارکرهای غیراختصاصی (CD34 و CD45) مورد تائید قرار گرفت.

علاوه بر انتخاب منبع مناسب، تولید مقیاس‌پذیر و جداسازی sEVs ها با بازده و خلوص بالا و هم‌چنین حفظ ساختار آن‌ها چالش اصلی مرتبط با درمان‌های مبتنی بر sEVs است. علاوه بر این، روش جداسازی باید مقرون به صرفه باشد و با فرآیند تولید با توان بالا سازگار باشد (۱۴). امروزه روش‌های مختلفی بر مبنای توانایی مؤثر در جهت جداسازی ذرات sEV و حذف پارتیکل‌های اضافی در جهت جداسازی sEVs وجود دارد (۳۵). در اغلب مطالعه‌ها، دو روش اولترا سانتریفیوژ و روش سانتریفیوژ شیب چگالی مورد مقایسه قرار گرفته‌اند. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از اولترا سانتریفیوژ دارای مزایایی هم‌چون ظرفیت بالای استخراج، خلوص بالا و آلودگی کمتر است. از طرفی، نیاز به تجهیزات گران قیمت و امکان آسیب به ذرات sEV در نتیجه سرعت بالای سانتریفیوژ از معایب استخراج sEV به کمک اولتراسانتریفیوژ محسوب می‌شود (۳۶). سهولت بالا و عدم نیاز به تجهیزات ویژه از مزایای روش‌های سانتریفیوژ شیب چگالی محسوب می‌شود که البته رسوب پروتئین و آلودگی sEVs به همراه پروتئین از جمله معایب این روش در نظر گرفته می‌شود (۳۷).

در این مطالعه از کیت اگزوسیب در جهت جداسازی ذرات sEV موجود درسوپ سلولی سلول‌های WT-MSC استفاده شد، که اساس روش این کیت بر مبنای سانتریفیوژ شیب چگالی است. پس از جداسازی، خصوصیات مورفولوژی ذرات sEV به کمک میکروسکوپ الکترونی تایید شد و عدم آسیب به ساختار وزیکول‌ها و یکپارچگی غشا آن‌ها قابل رؤیت بود.

محدودیت‌های مطالعه:

علی‌رغم دستاوردهای مطلوب در استخراج ذرات sEV از سلول‌های WJ-MSC، این مطالعه با محدودیت‌هایی مواجه بود که باید در تفسیر نتایج و مطالعه‌های آتی مد نظر قرار گیرند: در این مطالعه، سنجش کمی پروتئین صرفاً بر اساس روش برادفورد (سنجش پروتئین کل) انجام شد. اگرچه این روش برای تعیین دوز اولیه و اثبات بازدهی استخراج کافی است، اما عدم استفاده از روش‌هایی نظیر وسترن بلات یا فلوسیتومتری برای شناسایی مارکرهای غشایی اختصاصی sEVs و هم‌چنین روش NTA برای تعیین دقیق توزیع اندازه ذرات، از محدودیت‌های فنی این پژوهش محسوب می‌شود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.34]

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر تائید می‌کند که سلول‌های WJ-MSC، به دلیل دسترسی غیر تهاجمی و توان تکثیری بالا، منبعی ایـده‌آل و مقرون به صرفه برای استخراج ذرات sEV در مقیاس آزمایشگاهی هستند. هم‌چنین نتایج نشان داد که استفاده از دستورالعمل جداسازی معرفی شده در این پژوهش، منجر به استحصال ذرات sEV با ساختار مورفولوژیک سالم و غلظت پروتئینی مناسب می‌گردد با این حـال، باید به محدودیت‌هایی در این مطالعه نظیر اکتفا به سنجش پروتئین کل به جای شناسایی مارکرهای اختصاصی (مانند وسترن بلات) اشاره نمود که پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های آینده، بـا استفاده از حجم‌های بالاتری از بافت اولیه، مشخصه‌یـابی پروتئینی دقیق‌تر و بررسی‌های عملکردی بر روی این ذرات sEV صورت پذیرد.

حمایت مالی

این پروژه توسط مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و معاونت علمی، فناوری و اقتصاد دانش بنیان ریاست جمهوری تأمین مالی شده است.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم ـ دانشگاه علوم پزشکـــی شهیـــد بهشتی کد اخلاق دریافت کرده است (IR.SBMU.ENDOCRINE.REC.1400.140).

عدم تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

نقش نویسندگان

میلاد خباره: انجام مراحل پژوهش، جمع‌آوری داده‌ها، تحلیل داده‌ها، تهیه گزارش، نگارش مقاله

دکتر مهسا صالحی: نگارش و ویرایش مقاله

دکتر سمیه صادقی: طراحی مطالعه، انجام مراحل پژوهش، تحلیل داده‌ها، هدایـــــت و راهنمایی پژوهش، نگارش و ویرایش مقاله

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر، حاصل بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون (شماره ۱۴۱۴) می‌باشد. هزینه اجرای طرح توسط مؤسسه عالی طب انتقال خون و حمایت مالی معاونت علمی، فناوری و اقتصاد دانش بنیان ریاست جمهوری تحت شماره گرنت (CT1402080876) در تهران، ایران، انجام شده است. بدین وسیله، از کلیه حمایت‌های بی‌دریغ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و معاونت علمی، فناوری و اقتصاد دانش بنیان ریاست جمهوری کمال تشکر را داریم.

References:

1- de Abreu RC, Fernandes H, da Costa Martins PA, Sahoo S, Emanueli C, Ferreira L. Native and bioengineered extracellular vesicles for cardiovascular therapeutics. Nat Rev Cardiol . 2020; 17(11): 685-97. [DOI:10.1038/s41569-020-0389-5] [PMID] []
2- Trubiani O, Marconi GD, Pierdomenico SD, Piattelli A, Diomede F, Pizzicannella J. Human oral stem cells, biomaterials and extracellular vesicles: a promising tool in bone tissue repair. Int J Mol Sci. 2019; 20(20): 4987. [DOI:10.3390/ijms20204987] [PMID] []
3- Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. Cell Biosci. 2019; 9:1-18. [DOI:10.1186/s13578-019-0282-2] [PMID] []
4- Sadeghi S, Mosaffa N, Hashemi SM, Naghizadeh MM, Ghazanfari T. The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells on long term pulmonary complications in an animal model exposed to a sulfur mustard analog. Int Immunopharmacol. 2020; 80: 105879. [DOI:10.1016/j.intimp.2019.105879] [PMID]
5- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(25): 13625-30. [DOI:10.1073/pnas.240309797] [PMID] []
6- Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br J Haematol. 2000; 109(1) :235-42. [DOI:10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x] [PMID]
7- Baksh D, Yao R, Tuan RS. 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- 92. [DOI:10.1634/stemcells.2006-0709] [PMID]
8- Meyer FA Laver-Rudich Z, Tanenbaum R. Evidence for a mechanical coupling of glycoprotein microfibrils with collagen fibrils in Wharton's jelly. Biochim Biophys Acta. 1983; 755(3): 376-87. [DOI:10.1016/0304-4165(83)90241-6] [PMID]
9- Shafiee A, Moradi L, Lim M, Brown J. Coronavirus disease 2019: a tissue engineering and regenerative medicine perspective. Stem Cell Transl Med. 2021; 10(1):27-38. [DOI:10.1002/sctm.20-0197] [PMID] []
10- Zhang S, Zhu D, Mei X, Li Z, Li J, Xie M, et al. Advances in biomaterials and regenerative medicine for primary ovarian insufficiency therapy. Bioact Mater. 2021; 6(7): 1957-72. [DOI:10.1016/j.bioactmat.2020.12.008] [PMID] []
11- Ahangari F , Mirsanei Z, Soudi S, Ghaffari Khaligh S,

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.34]

Soufi S , Seyed Mahmoud Hashemi SM. Isolation of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) from Wharton's Jelly (WJ) Tissue of Human Umbilical Cord (hUC); a Protocol. School of Medicine Students' Journal. 2022; 5: e42169.

12- Zolfaghar M, Mirzaeian L, Beiki B, Naji T, Moini A, Eftekhari-Yazdi P, et al. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells differentiate into oocyte like cells in vitro by follicular fluid and cumulus cells conditioned medium. Heliyon. 2020; 6(10):e04992. [DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e04992] [PMID] []

13- Ding C, Zhu L, Shen H, Lu J, Zou Q, Huang C, et al. Exosomal miRNA-17-5p derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells improves ovarian function in premature ovarian insufficiency by regulating SIRT7. Stem Cells. 2020; 38(9): 1137-48. [DOI:10.1002/stem.3204] [PMID]

14- Sadeghi S Soudi S, Shafiee A, Hashemi SM. Mesenchymal stem cell therapies for COVID-19: Current status and mechanism of action. Life Sci. 2020:262: 118493. [DOI:10.1016/j.lfs.2020.118493] [PMID] []

15- Sadeghi S, Ramezani Tehrani F, Tahmasebi S, Shafiee A, Hashemi SM. Exosome engineering in cell therapy and drug delivery. Inflammopharmacology 2023 ;169:31 :145-169. [DOI:10.1007/s10787-022-01115-7] [PMID] []

16- Zhou T, Yuan Z, Weng J, Pei D, Du X, He C, et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. J Hematol oncol. 2021; 14: 1-24. [DOI:10.1186/s13045-021-01037-x] [PMID] []

17- Varaa N, Azandeh S, Khodabandeh Z, Gharravi AM .Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell: Various Protocols for Isolation and Differentiation of Hepatocyte-Like Cells; Narrative Review.Iran J Med Sci. 2019; 44(6): 437-48.

18- Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, Phillips N, Kay MA, Eiermann T, et al. Immunogenicity and Immunomodulatory Properties of Umbilical Cord Lining Mesenchymal Stem Cells . Cell Transplant. 2011; 20(5):655-67. [DOI:10.3727/096368910X536473] [PMID]

19- Drobiova H, Sindhu S, Ahmad R, Haddad D, Al-Mulla F, Al Madhoun A. Wharton's jelly mesenchymal stem cells: a concise review of their secretome and prospective clinical applications. Front Cell Dev Biol. 2023; 11 :1211217. [DOI:10.3389/fcell.2023.1211217] [PMID] []

20- Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. Mech Ageing Dev. 2001; 122(7): 713-34. [DOI:10.1016/S0047-6374(01)00224-X] [PMID]

21- Manca M, Zwart I, Beo J, Palasingham R, Jen L, Navarrete R, et al. Characterization of mesenchymal stromal cells derived from full-term umbilical cord blood. Cytotherapy. 2008; 10(1): 54-68. [DOI:10.1080/14653240701732763] [PMID]

22- Varaa N, Azandeh S, Khodabandeh Z, Gharravi AM. Wharton's jelly mesenchymal stem cell: Various protocols for isolation and differentiation of hepatocyte-like cells; narrative review. Iran J Med Sci. 2019; 44(6): 437-448.

23- Guan Y-T, Xie Y, Li D-S, Zhu Y-Y, Zhang X-L, Feng Y-L, et al. Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human umbilical cord and decidua parietalis. Mol Med Rep. 2019; 20(1): 633-9. [DOI:10.3892/mmr.2019.10286]

24- Beeravolu N, McKee C, Alamri A, Mikhael S, Brown C, Perez-Cruet M, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. J Vis Exp. 2017 (122): 55224. [DOI:10.3791/55224-v] [PMID] []

25- Kim MJ, Shin KS, Jeon JH, Lee DR, Shim SH, Kim JK, et al. Human chorionic-plate-derived mesenchymal stem cells and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: a comparative analysis of their potential as placenta-derived stem cells. Cell Tissue Res. 2011; 346(1): 53-64. [DOI:10.1007/s00441-011-1249-8] [PMID]

26- Wang Q ,Yang Q, Wang Z, Tong H, Ma L, Zhang Y, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Warton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy.Hum Vaccin Immunother. 2016; 12(1): 85-96. [DOI:10.1080/21645515.2015.1030549] [PMID] []

27- Can A, Balci D. Isolation culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal,stem cells. Methods Mol Biol. 2011; 698: 51-62. [DOI:10.1007/978-1-60761-999-4_5] [PMID]

28- Tong CK, Vellasamy Sh, Tan BC, Abdullah M, Vidyadaran Sh, Seow HF, et al. Generation of mesenchymal stem, method. Cell Biol Int, 2011; 35(3): 221-6. [DOI:10.1042/CBI20100326] [PMID]

29- De Bruyn C, Najar M, Raicevic G, Meuleman N, Pieters K, Stamatopoulos B, et al. A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. Stem Cells Dev. 2011; 20(3): 547-57. [DOI:10.1089/scd.2010.0260] [PMID]

30- Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. Methods Cell Biol. 2008; 86: 101-19 . [DOI:10.1016/S0091-679X(08)00006-X] [PMID]

31- Priya N, Sarcar S, Majumdar AS, SundarRaj S. Explant culture: a simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and lipoaspirate. J Tissue Eng Regen Med. 2014; 8(9): 706-16. [DOI:10.1002/term.1569] [PMID]

32- Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. Cell Tissue Res. 2013; 353(1): 65-78. [DOI:10.1007/s00441-013-1630-x] [PMID]

33- Yoon JH, Roh EY, Shin S, Jung NH, Song EY, Chang JY, et al. Comparison of Explant-Derived and Enzymatic Digestion-Derived MSCs and the Growth Factors from Wharton's Jelly. BioMed res Int. 2013; 2013(1): 428726. [DOI:10.1155/2013/428726] [PMID] []

34- Jing W, Xiao J, Xiong Z, Yang X, Huang Y, Zhou M, et al. Explant culture: an efficient method to isolate adipose-derived stromal cells for tissue engineering. Artif Organs. 2011; 35(2): 105-12. [DOI:10.1111/j.1525-1594.2010.01054.x] [PMID]

35- Zhang Z, Wang C, Li T, Liu Z, Li L. Comparison of ultracentrifugation and density gradient separation methods for isolating Tca8113 human tongue cancer cell line - derived exosomes. Oncol Lett. 2014; 8(4): 1701-06. [DOI:10.3892/ol.2014.2373] [PMID] []

36- Skottvoll FS, Berg H, Bjorseth K, Lund K, Roos N, Bekhradnia S, et al. Comparison of ultracentrifugation and a commercial kit for isolationof exosomes derived from glioblastoma and breast cancer cells. bioRxiv. 2018; 274910. [DOI:10.1101/274910] [PMID] []

37- Weng Y, Sui Z, Shan Y, Hu Y, Chen Y, Zhang L, et al. Effective isolation of exosomes with polyethyleneglycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. Analyst. 2016; 141(15): 4640-6. [DOI:10.1039/C6AN00892E] [PMID]

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13]

[DOI: 10.66224/bloodj.23.1.34]