خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۲ شماره ۲ تابستان ۹۴ (۱۵۲-۱۴۳)

مقاله پژوهشی

یک روش سریع، ساده و مقرون به صرفه برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون با استفاده از فسفات بافر سالین(PBS)

بهاره بیکی[۱]، مرتضی ضرابی[۲]، مریم رادمنش[۲]

چکیده

سابقه و هدف

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ژله وارتون بدون آسیب رساندن به ساختار و گیرنده‌های سطح سلول با حفظ عملکرد، قدرت تکثیر، بقای سلول و صرف حداقل زمان برای مصارف تحقیقاتی و بالینی مهم است. در این مطالعه از روشی ساده، بدون تیمار آنزیمی و در مدت زمان کوتاه برای جداسازی این سلول‌ها از ژله وارتون استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، بند ناف هنگام زایمان جمع‌آوری و رگ‌های آن جدا گردید. قطعات بافت ژله وارتون در بافر PBS قرار داده شده و به مدت ۲ ساعت با دستگاه همزن بر روی هم ساییده شدند. پس از دور انداختن قطعات، سوسپانسیون باقیمانده سانتریفوژ شده و در محیط DMEM-LG حاوی ۱۰٪ سرم FBS به مدت ۵ روزکشت داده شد. سلول‌های مزانشیمی چسبیده به ظرف، از نظر وجود مارکرهای سطحی مزانشیمی مورد بررسی قرار گرفتند. برای اثبات ماهیت مزانشیمی، از تمایز به استخوان، غضروف و چربی استفاده شد.

یافته‌ها

۵ روز پس از کشت اولیه، جمعیت خالصی از سلول‌های مزانشیمی ظاهر شدند. زمان دو برابر شدگی جمعیت سلولی در پاساژهای دوم(۶ ± ۳۱ ساعت) و سوم (۱۵ ± ۵۸ ساعت) از دیگر پاساژها کمتر بود. این سلول‌ها مارکرهای مزانشیمی را بیان کرده، از نظر بیان مارکرهای خونی و آنتی‌ژن لوکوسیت انسانی منفی بودند و توانایی تمایز به هر سه رده استخوان، غضروف و چربی را نیز داشتند.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که با استفاده از این روش غیر آنزیمی، امکان تخلیص سلول‌های مزانشیمی از ژله وارتون با صرف حداقل زمان و هزینه وجود دارد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بند ناف، ژله وارتون

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۳۱
تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۵

۱- مؤلف مسؤول: PhD زیست‌شناسی تکوینی ـ شرکت فن‌آوری بن یاخته‌های رویان ـ بانک خون بند ناف ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۶۶۵۶۶۶۳۱۱
۲- پزشک عمومی ـ شرکت فن‌آوری بن‌یاخته‌های رویان ـ بانک خون بند ناف ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-04-29]

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا MSCs ، سلول‌های استرومایی چندتوانی هستند که می توانند به انواع سلول‌های مختلف از جمله: استئوبلاست‌ها(سلول‌های استخوانی)، کندروسیت‌ها(سلول‌های غضروفی) و آدیپوسیت‌ها (سلول‌های چربی) تمایز یابند.

مغز استخوان بالغ (BM)، رایج‌ترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای کاربردهای بالینی است(۱). این سلول‌های بنیادی را می‌توان از بافت‌های مختلفی از جمله بافت چربی، خون بند ناف، پالپ دندان و بافت پیوندی بند ناف که ژله وارتون(WJ) نام دارد نیز به دست آورد(۲). ژله وارتون بافت همبند مخاطی ابتدایی بند ناف است که بین اپیتلیوم آمنیوتیک و عروق بند ناف قرار گرفته است. این بافت برای اولین بار توسط توماس وارتون در سال ۱۶۵۶ شناسایی شد، این ماده ژلاتینی از پروتئوگلیکان‌ها و ایزوفرم‌های متفاوتی از کلاژن تشکیل شده است. نقش اصلی ژله وارتون جلوگیری از فشرده شدن، چرخش و خم شدن عروق بند ناف است(۵-۳). سلول‌های موجود در ژله وارتون، سلول‌های بنیادی مزانشیمی اولیه هستند که به احتمال زیاد درماتریکس بافت همبند طی مهاجرت از منطقه آئورت، گناد و مزونفروس(AGM) جنین طی تکوین بند ناف به دام افتاده‌اند(۵).

جوان‌ترین و ابتدایی‌ترین سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان از ژله وارتون و خون بند ناف به دست آورد(۵). بند ناف پس از تولد نوزاد به راحتی به دست آمده و به طور معمول به عنوان زباله پزشکی دور ریخته می‌شود(۶). سلول‌های بنیادی به دست آمده از این بافت، منبعی ایمن و غیر تهاجمی را برای درمان با سلول‌های بنیادی ارایه می‌دهد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف دارای خصوصیات ابتدایی بیشتری نسبت به دیگر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بزرگسالان که در مراحل بعدی زندگی به دست می‌آیند، می‌باشند. این سلول‌های بنیادی نه سلول‌های بنیادی جنینی(ESCs) و نه سلول‌های بنیادی سوماتیک بالغ(ASCs) هستند؛ آن‌ها دارای خصوصیاتی مابین سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ بوده و ویژگی‌های هر دو نوع سلول بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ را نشان می‌دهند، این سلول‌ها هم دارای خواص پرتوانی، و هم ترمیم و نگهداری بافت‌های چند توان هستند، که این می‌تواند آن‌ها را به عنوان منبع مفیدی از سلول‌های بنیادی برای کاربردهای بالینی قرار دهد(۷).

جداسازی این سلول‌های فیبروبلاست شکل از ژله وارتون در اصل به سال ۱۹۹۱ برمی‌گردد(۸). از آغاز شناسایی این منبع، تعداد مطالعه‌های نسبتاً محدودی بر روی این سلول‌ها انجام شده است. روش‌های فنی برای جداسازی این سلول‌های بنیادی از ژله وارتون به میزان کمی بررسی شده و به طور چشمگیری با یکدیگر متفاوت است. اگر چه تیمار آنزیمی با کلاژناز روشی است که به طور گسترده برای جداسازی این سلول‌های استرومایی استفاده می‌شود، این تیمار نیز در مقالات مختلف بسیار متفاوت است(۱۴-۹). چندین گروه نیز از تیمار غیر آنزیمی استفاده کرده‌اند که مستلزم صرف مدت زمان زیادی می‌باشد(۱۶، ۱۵).

در این مطالعه از روش غیر آنزیمی، ساده و منحصر به فردی در حداقل زمان و بر اساس اثر PBS بر سست کردن و شکستن اتصالات بین سلولی برای رهایی سلول‌های مزانشیمی از ماتریکس کلاژنی ژله وارتون استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

۱- جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف از ژله وارتون و کشت آن‌ها:

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. تعداد ۷ نمونه بند ناف از بانک خصوصی خون بند ناف رویان تهیه گردید. اهداکنندگان بند ناف، مادران سالم(بر اساس پرسشنامه پزشکی فاقد بیماری‌های زمینه‌ای و ژنتیکی و بر اساس آزمایش‌های سرولوژی، عاری از بیماری‌های ویروسی، سیفلیس، HTLV I/II ، HBV ، HCV ، HIV و CMV) با دوره حاملگی کامل بودند. بند ناف هنگام زایمان جمع‌آوری و در شرایط استریل، داخل PBS (آلمان، گیبکو) حاوی ۱۰۰ mg/mL آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (آلمان، گیبکو) به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه، بند ناف با الکل شسته شده و با PBS خون باقی‌مانده در رگ‌های بند ناف به طور کامل تخلیه گردید.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-04-29]

بند ناف به قطعات ۲ سانتی‌متری بریده شده و رگ‌های آن که شامل یک سیاهرگ بزرگ و دو سرخرگ کوچک است جدا گردید و بافت ژله وارتون به دست آمد. قطعات کوچک بافت ژله وارتون در بافر PBS قرار داده شد و به مدت ۲ ساعت با دستگاه هموشیکر (شرکت دانش پژوهش فجر) با هم مخلوط و بر روی هم ساییده شدند. قطعات ژله وارتون دور انداخته شده و سوسپانسیون باقیمانده به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصله که حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی است در محیط DMEM-LG (آلمان، گیبکو) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو(Fetal Bovin Serum) (گیبکو) شستشو داده شد و تعداد و میزان سلول‌های زنده (Viability) با استفاده از لام نئوبار و تریپان بلو ۴٪ تعیین گردید.

سلول‌های جداسازی شده در پلیت ۶ خانه و در محیط DMEM-LG شامل FBS (۱۰٪)، ال‌گلوتامین(آلمان، گیبکو) (۲mM) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، به مدت ۵ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 کشت داده شدند. پس از آن سلول‌های مزانشیمی چسبیده به پلیت کشت جهت تکثیر، با استفاده از مخلوط ۰/۰۵٪ تریپسین ـ EDTA (آلمان، گیبکو) جدا شده و به میزان 10^5 سلول در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت و پاساژ داده شدند.

سلول‌ها در پاساژهای ۳ تا ۷ توسط لام نئوبار شمارش شدند و جهت اثبات سلول‌های بنیادی مزانشیمی، این سلول‌ها به سه رده استخوان، غضروف و چربی تمایز داده شد و از روش فلوسایتومتری برای بررسی ایمونوفنوتایپینگ و درصد بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شد.

تعیین زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی:

به منظور مقایسه سرعت رشد سلول‌های حاصل از هر پاساژ سلولی، زمان دو برابر شدن سلول‌ها در طول دوره کشت(پاساژ اول تا هفتم) اندازه‌گیری شد. برای این منظور از فرمول زیر استفاده گردید. در این رابطه ، PDT تعداد دو برابر شدن جمعیت سلولی(Population Doubling Time)، N0 تعداد سلول در شروع کشت، N تعداد سلول در پایان کشت و CT مدت زمان دوره کشت(Culture Time) به ساعت می‌باشد.

$$PDT=\frac{CT}{\text{Log}\frac{N}{N0}\times 3.31}$$

بررسی ایمونوفنوتیپ سلول‌ها:

برای بررسی ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های کشت یافته، تعداد 10^6 سلول مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی دو رنگ Mouse IgG1-FITC/Mouse IgG1-RPE/Isotype control (داکو) به 10^5 سلول در ۱۰۰ میکرولیتر PBS به عنوان ایزوتایپ کنترل و ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های Mouse Anti Human CD105-PE ، Mouse Anti Human CD90-FITC، Mouse Anti Human CD44-PE ، Mouse Anti Human CD73-PE ، Mouse Anti Human CD34/45-PE/FITC ، Mouse Anti Human HLA DR-PE و Mouse Anti Human CD133-PE (همه از شرکت بکتون دیکینسون آمریکا) به همان تعداد سلول در لوله‌های جداگانه اضافه شد. پس از ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و اتاق تاریک، ۱ میلی‌لیتر از محلول PBS جهت شستشو به لوله‌ها اضافه گردید و پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ در ۱۵۰۰ دور بر دقیقه، محلول رویی جدا و به رسوب سلولی حاصل ۳۰۰ میکرولیتر محلول PBS اضافه شد. نمونه‌های آماده شده در دستگاه فلوسایتومتری BD (آمریکا، بکتون دیکینسون) FACS Calibur در طول موج ۴۸۸ نانومتر، با فیلترهای nm BP ۵۳۰/۳۰ برای FITC و nm BP ۵۸۵/۴۲ برای PE به وسیله نرم‌افزار Flowing software مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

بررسی توان تمایزی سلول‌ها:

برای اثبات ماهیت مزانشیمی، سلول‌های تخلیص شده از ژله وارتون پس از ۵ روز کشت، پاساژ داده شدند، سپس سلول‌های جمع‌آوری شده، از پاساژ ۳ وارد محیط‌های تمایزی غضروف، چربی واستخوان شدند.

تمایز به استخوان:

برای تمایز به استخوان، سلول‌ها با تراکم ۱۰۰۰۰۰ سلول در چاهک یک پلیت ۱۲خانه و در محیط DMEM

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-04-29]

کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت، محیط تمایزی استخوان که شامل DMEM مکمل با ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آسکوربیک ۲- فسفات، ۱۰ نانو مولار دگزامتازون و ۱۰ نانومول بتا گلیسرول فسفات(همه از شرکت سیگما آمریکا) بود، به کشت سلول‌ها اضافه شد. هر سه روز یک بار تعویض محیط انجام گرفت، پس از سه هفته، از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، برای رنگ‌آمیزی و مشاهده ماتریکس معدنی شده استفاده شد.

تمایز به چربی:

برای تمایز به چربی، محیط DMEM حاوی ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین(همه از شرکت سیگما آمریکا) به کشت سلول‌ها در پاساژ ۳ افزوده شد. سه هفته بعد از شروع کشت، سلول‌ها در فرمالین ۴٪ در دمای اتاق فیکس شد و سپس با اتانول ۷۰٪ شسته شده ، با محلول اویل رد در ۹۹٪ ایزوپروپانول به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد.

تمایز به غضروف:

برای القای تمایز به غضروف، سلول‌های پاساژ ۳ در دور g ۳۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد، به رسوب حاصله محیط DMEM حاوی ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر TGF-β3 ، ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر BMP6 ، ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر انسولین+ ترانسفرین+ سلنیوم + پرمیکس، ۱/۲۵ میلی‌گرم آلبومین سرم گاوی (همه از شرکت سیگما آلمان) و ۱٪ FBS کشت شدند. سه هفته بعد از کشت، رسوب سلولی برداشته شد و وارد فرایند فیکس شدن با فرمالین ۱۰٪، آبگیری با غلظت‌های تصاعدی اتانول، شستشو در زایلن، قرارگیری در موم پارافین و برش‌گیری در برش‌های ۵ میکرومتری شد. این برش‌ها سپس به وسیله تولیدین‌بلو به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شد.

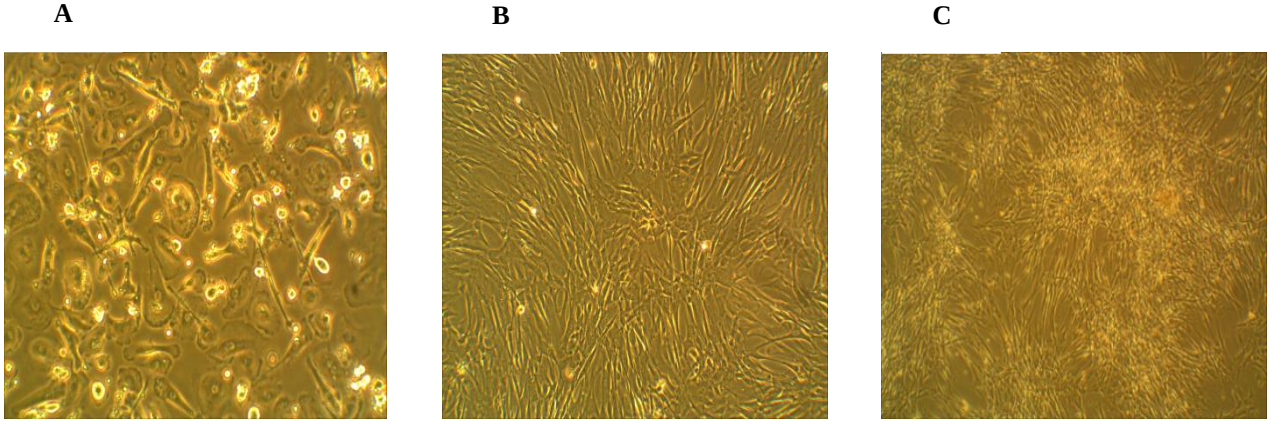
آنالیز آماری:

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ استفاده شد و نتایج بر اساس روش One-way ANOVA با میزان $p< ۰/۰۵$ گزارش شد.

یافته‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش استفاده از PBS:

در کشت اولیه پس از ۵ روز سلول‌های دوکی شکل مزانشیمی چسبیده به ظرف ظاهر شدند که در هفته دوم تکثیر شده و تمامی سطح ظرف کشت را پر کردند (شکل ۱).



شکل ۱: کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون: A) کشت اولیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از ۵ روز که سلول‌های منفرد چسبیده به ظرف قابل مشاهده می‌باشند. B) کشت تک لایه سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاساژ ۲. C) کلنی‌های سلول‌های مزانشیمی در پاساژ ۳.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-04-29]

جدول ۱: میانگین PDT سلول‌های مزانشیمی در پاساژهای متوالی طی ۷ تکرار

پاساژ	شماره	متوسط PDT	SD
P1→ P2	۷	۹۷/۷۳	۲۱/۷۱
P2→ P3	۷	۷۵/۱۵	۲۲/۲۷
P3→ P4	۷	۳۱/۸۱	۶/۹۲
P4→ P5	۷	۵۸/۶۴	۱۵/۸۵
P5→ P6	۷	۸۷/۱	۱۸/۸۳
P6→ P7	۷	۱۱۵/۸۹	۲۸/۹۳

زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی:

بر اساس نتایج حاصل، سلول‌های پاساژ اول به طور متوسط هر ۲۱ ± ۹۷ ساعت یک بار دوبله شدند، سلول‌های پاساژ دوم هر ۲۲ ± ۷۵ ساعت یک بار، سلول‌های پاساژ سوم هر ۶ ± ۳۱ ساعت یک بار، سلول‌های پاساژ چهارم هر ۱۵ ± ۵۸ ساعت یک بار، سلول‌های پاساژ پنجم هر ۱۸ ± ۸۷ ساعت یک بار و سلول‌های پاساژ ششم هر ۲۸ ± ۱۱۵ ساعت یک بار دوبله شدند که در مجموع این زمان در پاساژ سوم از همه پاساژهای دیگر کوتاهتر بوده و این تفاوت از نظر آماری معنادار بود($p< ۰/۰۵$). این نتایج نشان‌دهنده خلوص و افزایش توانمندی تکثیر این سلول ها در پاساژ سوم نسبت به پاساژهای دیگر است(نمودار ۱ و جدول ۱).

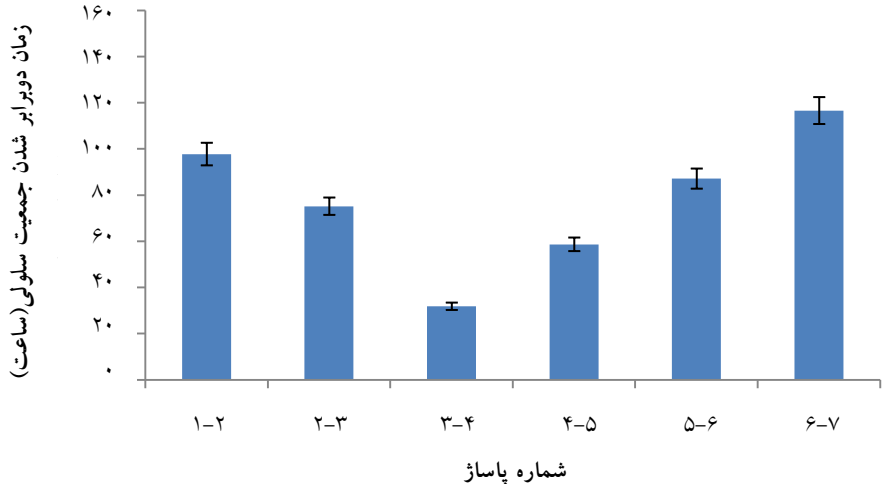
بررسی مارکرهای سطحی سلول:

به منظور بررسی جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ژله وارتون، بیان مارکرهای سطحی مزانشیمی در سه نمونه بند ناف با دستگاه فلوسایتومتری مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان داد که این سلول‌ها مارکرهای مزانشیمی CD44 (۹۸/۴۴٪)، CD105 (۹۶/۶٪) ، CD90 (۹۸/۶۵٪) و CD73 (۸۵/۹۴٪) را بیان کرده و از نظر بیان مارکرهای خونی CD34/CD45 (۰/۰۲٪)، CD133 (۰/۶۴٪) و آنتی‌ژن لوکوسیت انسانی HLA-DR (۰/۰۱٪) منفی هستند (نمودارهای ۲ و ۳).

بررسی ویژگی‌های تمایزی:

در کشت سلول‌های مزانشیمی در پاساژ سوم که به مدت سه هفته در محیط تمایزی استخوان قرار گرفته بودند، به تدریج تجمعات سلولی به شکل گره پدیدار شد که رنگ‌آمیزی با آلیزارین رد در پایان ۲۱ روز القاء تمایز، حاکی از معدنی شدن گره‌ها بود(شکل A ۲).

در کشت سلول‌های مزانشیمی تحت تیمار محیط تمایزی چربی، پس از ۲-۳ روز اولین وزیکول‌های چربی مشاهده شد و با گذشت زمان تعداد آن‌ها زیاد شد، به

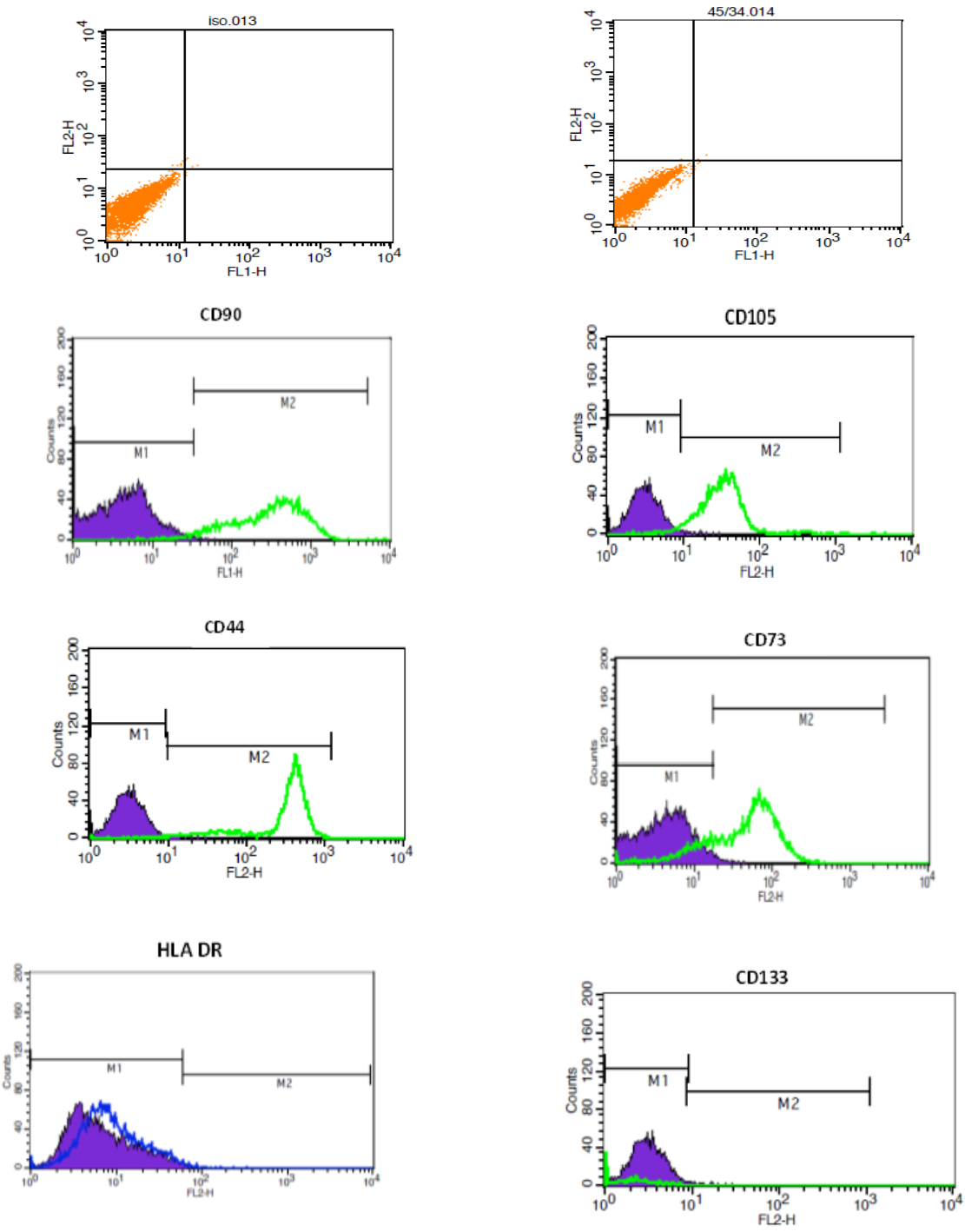


نمودار ۱: مقایسه زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی(PDT). در پاساژهای متوالی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های پاساژ سوم به طور معناداری PDT کوتاهتری داشتند($p< ۰/۰۵$).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-04-29]

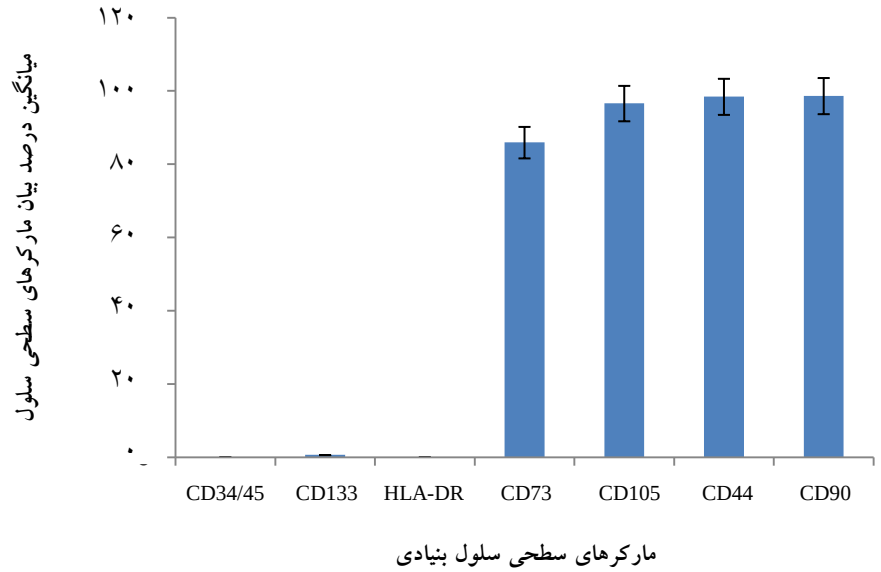
طوری که پس از ۱۰ روز سیتوپلاسم سلول‌ها از چربی انباشته شد. برای اثبات ماهیت چربی وزیکول‌های مشاهده شده، سلول‌ها پس از ۲۱ روز با اویل رد رنگ شدند و قرمز شدن سیتوپلاسم آن‌ها آدیپوسیت بودن آن‌ها را تایید کرد(شکل B ۲).

سلول‌های مزانشیمی پس از ۲۱ روز کشت در محیط تمایزی غضروف و رنگ‌آمیزی با رنگ تولوییدن بلو، خاصیت متاکرومازی از خود نشان دادند(شکل C ۲).

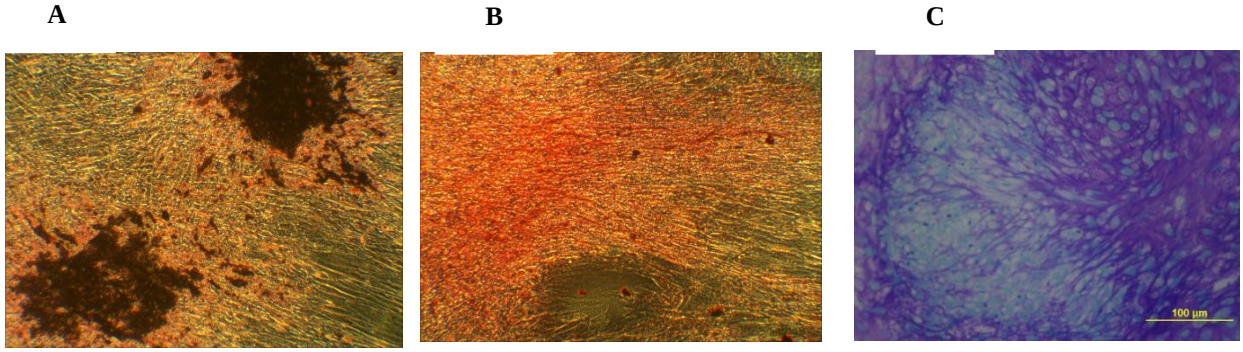


نمودار ۲ : نمودارهای فوق بیان مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را طبق نتایج فلوسایتومتری نشان می‌دهد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-04-29]



نمودار ۳: میانگین درصد بیان مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی. در این سلول‌ها درصد بیان مارکرهای مزانشیمی (CD73 ، CD105 ، CD90 ، CD44) بالا و درصد بیان مارکرهای خونی (HLA-DR ، CD133 ، CD34/45) پایین است.



شکل ۲: A) تمایز سلول‌های مزانشیمی انسانی به بافت استخوان، رسوب‌های کلسیمی استخوان با رنگ آلیزارین رد به رنگ قرمز درآمده است. B) تمایز سلول‌های مزانشیمی انسانی به بافت چربی و رنگ‌آمیزی واکوئل‌های چربی موجود در سیتوپلاسم با اویل رد. C) تمایز سلول‌های مزانشیمی به بافت غضروف، سلول‌های غضروفی با رنگ تولوییدین‌بلو به رنگ آبی درآمده است.

بحث

از بین منابع سلول‌های بنیادی پری‌ناتال، ژله وارتون دارای پتانسیل بسیار زیادی به عنوان یک منبع مفید سلول‌های بنیادی برای درمان بیماری‌های مختلف است. این بافت دارای مزایای متعددی از جمله در دسترس بودن، امکان جمع‌آوری بدون درد از اهداکنندگان، امکان استفاده برای پیوند اتولوگ در سلول درمانی و در معرض خطر آلودگی کمتر می‌باشد.

تعاریف و روش‌های زیادی برای جداسازی و شناسایی این سلول‌های بنیادی توسط محققان ارایه شده است. در سال ۲۰۰۶، به منظور استانداردسازی این تعاریف ، کمیته سلول‌های بنیادی بافت و مزانشیم (ISCT)، معیارهای حداقلی را برای شناسایی این سلول‌های بنیادی پیشنهاد داد که شامل قابلیت چسبیدن به سطح ظرف کشت، بیان مارکرهای سطحی ویژه(CD44 ، CD73 ، CD105 و CD90) و توانایی تمایز به انواع بافت‌ها از جمله رده‌های غضروف، استخوان و چربی می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون برخلاف سلول‌های مزانشیمی بالغ، دارای توانایی بیان مارکرهای ویژه سلول‌های بنیادی جنینی (SOX-2 ، Nanog،

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-04-29]

Tral-60 ، SSEA-4 ، Oct-4) بوده و آنتی‌ژن لوکوسیت انسانی کلاس دو (MHC class II) -HLA-DR را که در رد پیوند دخیل می‌باشد، بسیار کم بیان می‌کنند(۱۷، ۵، ۳). استفاده از این سلول‌های مزانشیمی همانند سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان نیاز به تطبیق بافتی ندارند، در نتیجه می‌توانند به عنوان منبع سلول‌های آلوژنیک از هر اهداکننده‌ای به فرد دیگر بدون خطر رد پیوند و یا نیاز به داروهای مهارکننده سیستم ایمنی پیوند شوند(۱۷). این مشخصه نشان می‌دهد که این بافت را می‌توان به عنوان یک منبع جامع و کافی از سلول‌های بنیادی در نظر گرفت. مطالعه‌های متعدد حضور این سلول‌های بنیادی را در ۱۰۰٪ نمونه‌های مورد مطالعه ژله وارتون ثابت کرده‌اند(۱۹، ۱۸، ۱۳). با این حال، هیچ روش استانداردی برای جداسازی این سلول‌های بنیادی از بافت ژله وارتون وجود ندارد. تا به امروز، بسیاری از گروه‌ها از تیمارآنزیمی با استفاده از پروتئازهایی مانند کلاژناز، هیالورونیداز و یا تریپسین با یا بدون حذف مکانیکی عروق خونی برای به دست آوردن این سلول‌ها استفاده کرده‌اند، به عنوان مثال ونگ و همکارانش از تیمارکلاژناز به مدت ۱۶ ساعت برای جداسازی سلول‌های مزانشیمی استفاده کردند(۹). پیررا و همکارانش نیز از تیماری مشابه اما بر روی همزن در مدت زمان کمتر و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده کردند(۱۱). اما مشخص شده که هضم بیش از حد بافت توسط آنزیم ممکن است سبب کاهش زنده ماندن و عملکرد سلولی، تخریب گیرنده‌های سطح سلول و تغییرساختار سلول شود(۲۰). علاوه‌بر این، می‌بایست از آنزیم‌های به دست آمده از گونه‌های غیرانسان برای تهیه سلول‌ها به منظور مقاصد درمانی اجتناب شود. امکان به دست آوردن MSCs از بافت بند ناف با روش‌های غیر آنزیمی که اولین بار توسط روکا و همکارانش در سال ۲۰۰۹ توضیح داده شد، نیز روش دیگری است که هنوز به صورت استاندارد درنیامده است(۱۵). او و همکارانش در این روش بند ناف را به قطعات ۱-۲ سانتی‌متری برش داده و آن‌ها را در ظرف مخصوص کشت به مدت ۱۵ روز در انکوباتور قرار دادند و منتظر ماندند که سلول‌ها از بافت به درون ظرف مهاجرت کنند. گروه‌های دیگری نیز همین روش را با حذف عروق خونی بند ناف انجام داده‌اند(۲۳-۲۱). این روش با وجودی که معایب استفاده از تیمار آنزیمی را ندارد اما مستلزم صرف مدت زمان زیادی است. بنابراین یافتن روشی ساده، ایمن با حداقل صرف زمان که بیشترین تعداد سلول‌ها را جداسازی کرده و کمترین آسیب را به این سلول‌ها وارد کند، دارای اهمیت زیادی است.

در این مطالعه از روشی غیر آنزیمی، ساده و منحصر به فرد براساس اثر بافر نمکی فسفات بافر سالین(PBS) بر سست کردن و شکستن اتصالات بین سلولی برای رهایی سلول‌های مزانشیمی از ماتریکس کلاژنی ژله وارتون استفاده کردیم که بدون استفاده از آنزیم و صرف هزینه زیاد، توانستیم سلول‌های مزانشیمی را از تمامی نمونه‌های بند ناف طی مدت زمان کوتاه ۵ روز جداسازی کنیم. بررسی ایمونوفنوتیپ این سلول‌ها بیان بالای مارکرهای سطحی سلول‌های مزانشیمی را نشان داد و محاسبه مدت زمان دو برابر شدگی سلول‌ها اثبات کرد که این سلول‌ها توانایی تکثیر خود را طی پاساژهای متوالی حفظ کرده و در پاساژهای ۳ و ۴، بهترین توانمندی را دارا هستند. هم چنین نشان داده شد که این سلول‌ها مانند سلول‌های مزانشیمی منابع بافتی دیگر دارای ویژگی چندتوانی(تمایز به استخوان، غضروف و چربی) هستند. در مجموع با توجه به نتایج تحقیق حاضر به نظر می‌رسد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداسازی شده با روش فوق‌الذکر بتوانند بعد از مطالعه خصوصیات سلولی، جهت کارآزمایی‌های بالینی و پژوهشی مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که استفاده از روش غیر آنزیمی جداسازی سلول‌ها با بافر PBS ، روشی مناسب و مقرون به صرفه برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ژله وارتون باشد و می‌تواند این سلول‌ها را در مدت زمان کوتاه ۵ روز، از ۱۰۰٪ نمونه‌های بند ناف جداسازی کند.

تشکر و قدردانی

این روش جدید در سال ۹۱ در اداره کل مالکیت صنعتی ایران به ثبت رسیده است. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی شرکت فن‌آوری بن

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-04-29]

یاخته‌های رویان تشکر و قدردانی می‌نمایند. هم چنین از مهندس اشکان مزدگیر مسئول تضمین کیفیت بانک خون بند ناف رویان که در تجزیه و تحلیل آماری نتایج این طرح همکاری داشته‌اند و آقای فاضل سامانی مسؤول آزمایشگاه فلوسایتومتری رویان سپاسگزاریم.

References :

1- Sensebe´ L, Bourin P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. Transplantation 2009; 87(9 Suppl): S49-53.
2- Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. J Tissue Eng Regen Med 2008; 2(4): 169-83.
3- Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. Stem Cells 2007; 25(11): 2886-95.
4- Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells 2008; 26(3): 591-9.
5- Wang XY, Lan Y, He WY, Zhang L, Yao HY, Hou CM, Tong Y, *et al*. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. Blood 2008; 111(4): 2436-43.
6- 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(1): 105-10.
7- Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. Reprod Biol Endocrinol 2006; 4: 8.
8- McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, McLean WH. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. Biochem Soc Trans 1991; 19(1): 29S.
9- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, *et al*. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells 2004; 22(7): 1330-7.
10- Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, *et al*. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells 2007; 25(2): 319-31.
11- Pereira WC, Khushnooma I, Madkaikar M, Ghosh K. Reproducible methodology for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord and its potential for cardiomyocyte generation. J Tissue Eng Regen Med 2008; 2(7): 394-9.
12- Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem Cells 2005; 23(2): 220-9.
13- 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. Haematologica 2006; 91(8): 1017-26.
14- Kadam SS, Tiwari S, Bhonde RR. Simultaneous isolation of vascular endothelial cells and mesenchymal stem cells from the human umbilical cord. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2009; 45(1-2): 23-7.
15- La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, *et al*. Isolation and characterization of Oct-4=HLA-G mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. Histochem Cell Biol 2009; 131(2): 267-82.
16- Valencic E, Piscianz E, Andolina M, Ventura A and Tommasini A. The immunosuppressive effect of Wharton's jelly stromal cells depends on the timing of their licensing and on lymphocyte activation. Cytotherapy 2010; 12(2): 154-60.
17- Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, *et al*. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. Stem Cells 2008; 26(11): 2865-74.
18- Zeddou M, Briquet A, Relic B, Josse C, Malaise MG, Gothot A, *et al*. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. Cell Biol Int 2010; 34(7): 693-701.
19- Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, *et al*. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! Stem Cells 2008; 26(1): 146-50.
20- Hung CT, Mauck RL. Biological Assays: Cellular Level. In: Moore J, Zouridakis G. Biomedical Technology and Devices Handbook. Boca Raton, FL: CRC Press; 2004. p. 1-15, 39.
21- Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, Harnprasopwat R, Kido M, Sugimoto M, *et al*. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. Int J Hematol 2009; 90(2): 261-9.
22- Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, *et al*. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells 2003; 21(1): 50-60.
23- Penolazzi L, Vecchiatini R, Bignardi S, Lambertini E, Torreggiani E, Canella A, *et al*. Influence of obstetric factors on osteogenic potential of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. Reprod Biol Endocrinol 2009; 7: 106.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-04-29]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2015; 12(2): 143-152

Original Article

A rapid, simple and economical method for the isolation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly by phosphate buffer saline

Beiki B.[1], Zarrabi M.[1], Radmanesh M.[1]

[1]Cord Blood Bank, Royan Stem Cell Technology, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

The isolation of mesenchymal stem cells (MSCs) from the Wharton jelly (WJ) without degradation of cellular surface receptors and with the protection of cellular function, proliferation, and viability is important for research and clinical applications. In this study we have established a simple and rapid protocol without enzymatic treatment taking less time for MSCs from WJ to be isolated.

Materials and Methods

Human umbilical cords were collected after full-term deliveries and transported to the laboratory in sterile phosphate-buffered saline (PBS). After the removal of cords vessels, the WJ sectioned were transferred into PBS and put on a shaker for 2 hours. The cord segments were discarded and the suspension was centrifuged and cultured in DMEM-LG supplemented with 10% FBS for 5 days. The plastic adherent cells were investigated for surface markers. Adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiations were performed to investigate the mesenchymal nature.

Results

After 5 days, purified populations of spindle-shape mesenchymal stem cell appeared and the cells were then expanded until they reached subconfluence. The cell population doubling time at third (31 ± 6h) and fourth (58 ± 15h) passages was lower than other passages. The expanded cells were positive for CD 90, CD105, CD73, and CD44 , and negative for CD34/45, CD133, and HLA-DR surface markers. WJ-MSCs showed the potential of the multilineage cell differentiation into adipogenic, osteogenic, and chondrogenic phenotypes.

Conclusions

This study indicates that this non-enzymatic protocol can result in the efficient isolation of MSCs from Wharton jelly with less time taken. The expanded cells expressed characteristic markers and presented typical functional properties of MSCs such as the differentiation capacities.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, umbilicla cord, Wharton Jelly

Received: 21 May 2014
Accepted: 26 Nov 2014

Correspondence: Beiki B., PhD of Developmental Biology. Cord Blood Bank, Royan Stem Cell Technology. P.O.Box: 16656-66311, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22514052; Fax: (+9821) 89781308
E-mail: *bahar_beigy58715@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-04-29]