خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۱ شماره ۲ تابستان ۹۳ (۱۰۲-۹۳)

مقاله پژوهشی

جداسازی و تعیین هویت سلول‌های بنیادی خونساز و مزانشیمی مشتق از بافت جفت انسانی

آزاده امید خدا[۱]، سعید کاویانی[۲]، مسعود سلیمانی[۳]، مهین نیکوگفتار ظریف[۴]، امیر آتشی[۳]، ناصر احمدبیگی[۵]، مصطفی جمالی[۶]، مژده نخلستانی[۷]

چکیده

سابقه و هدف

فراوانی کم سلول‌های بنیادی خونساز در خون بند ناف، مهم‌ترین فاکتور محدود کننده استفاده از این منبع در پیوند می‌باشد. اگر بتوان سلول‌های بنیادی خونساز و مزانشیمی موجود در جفت را جداسازی و به همراه سلول‌های خون بند ناف پیوند کرد، مشکل فراوانی کم سلول‌ها به دلیل افزایش تعداد اولیه سلول‌های بنیادی خونساز پیوندی و نیز لانه گزینی این سلول‌ها به واسطه همراهی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مرتفع خواهد شد. لذا در این مطالعه سعی شد که با استفاده از روش آنزیمی، حداکثر سلول بنیادی خونساز و مزانشیمی موجود در بافت جفت استحصال و خصوصیات این سلول‌ها بررسی شود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، تعداد ۵ نمونه بافت جفت مختلف را با آنزیم کلاژناز مجاور کرده و پس از حذف یاخته‌های سرخ آن با کمک بافر لیزکننده، سلول‌های باقی‌مانده از نظر وجود سلول‌های بنیادی خونساز و مزانشیمی بررسی شدند.

یافته‌ها

نتایج حکایت از آن داشت که ۰/۶ ± ۶/۰۲٪ سلول‌های استحصال شده، $CD34^+$ و ۰/۸ ± ۴/۷۸٪ $CD38^-CD34^+$ بودند. این سلول‌ها، انواع کلونی‌های خونساز را تشکیل دادند و از کشت سلول‌های حاصل از جفت، سلول‌های چسبنده استرومایی با ویژگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمد.

نتیجه گیری

وجود تعداد قابل توجه سلول‌های $CD34^+$ و مزانشیمی در بافت جفت، نشان می‌دهد که احتمالاً پیوند این سلول‌ها به همراه سلول‌های حاصل از خون بند ناف، در افزایش کیفیت پیوند مؤثر می‌باشد.

کلمات کلیدی: جفت، سلول‌های بنیادی خونساز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۲
تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۱۴

۱- دانشجوی PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسؤول: PhD خون‌شناسی ـ دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵
۳- PhD خون‌شناسی ـ دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۴- PhD خون‌شناسی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- PhD خون‌شناسی ـ پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۶- متخصص آسیب‌شناسی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۷- پزشک عمومی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

مقدمه

هر چند طی سال‌های گذشته، پیوند سلول‌های بنیادی خونساز، نقش مؤثری در درمان بیماری‌های مختلف به ویژه بدخیمی‌های خونی داشته است، اما محدودیت در یافتن منبع سلولی مناسب، این روش درمانی را با چالش مواجه کرده است. اگر چه سال‌ها، مغز استخوان و خون محیطی به عنوان دو منبع اصلی سلول‌های بنیادی خونساز برای پیوند به شمار می‌آمدند، اما محدودیت این منابع سبب شد تا منبع دیگری مد نظر قرار گیرد و بدین ترتیب استفاده از سلول‌های بنیادی خونساز خون بند ناف(UCB ، Umbilical Cord Blood) مطرح گردید(۱). علی‌رغم مزایای زیاد این منبع سلولی که از آن جمله می‌توان به جمع‌آوری راحت و غیر تهاجمی و کاهش بروز واکنش پیوند علیه میزبان اشاره کرد، میزان کم سلول‌های بنیادی خونساز موجود در یک نمونه خون بند ناف اهدایی، مهم‌ترین فاکتور محدود کننده استفاده از این منبع سلولی به ویژه در گیرندگان بزگسالان می‌باشد به طوری که تعداد کم سلول‌های پیوند شده، جوابگوی نیاز بیمار برای تولید سلول‌های خونی نبوده و در مواردی تعداد نوتروفیل‌ها و پلاکت‌های تولید شده حتی بعد از گذشت ماه‌ها از پیوند، به تعداد مورد نیاز نرسیده است که این امر ممکن است منجر به افزایش عفونت و حتی مرگ گیرنده شود(۳، ۲).

طی سال‌های اخیر استراتژی‌های مختلفی برای تکثیر این سلول‌ها به منظور افزایش تعداد اولیه آن‌ها برای پیوند مطرح شده است که از آن جمله می‌توان به تکثیر این سلول‌ها، در محیط دو بعدی کشت همراه با فاکتورهای رشد مختلف و یا کشت توام این سلول‌ها با سلول‌های مزانشیمی به عنوان فیدر، اشاره کرد(۴). اما تکثیر بدون تمایز سلول‌های بنیادی خونساز در محیط دو بعدی کشت، با چالش جدی روبرو می‌باشد و این سلول‌ها در محیط دو بعدی کشت، در عدم همراهی آشیانه (نیچ) طبیعی خود به سرعت تمایز یافته و خصوصیات بنیادی خود را از دست می‌دهند(۵). عدم موفقیت تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز در محیط دو بعدی کشت به دلیل نبود نیچ یا ریز محیط مناسب، محققان را برآن داشت که به شبیه‌سازی ساختار نیچ در محیط آزمایشگاه بپردازند(۷، ۶). از آن جایی که سلول های بنیادی مزانشیمی یکی از مهم‌ترین سلول‌های تشکیل‌دهنده نیچ می‌باشند، از این سلول‌ها برای کشت توام استفاده گردید(۸). اگر چه نتایج این مطالعه‌ها نشان از بهبود نسبی پیوند در مطالعه‌های بالینی دارد، اما این مقدار بهبود، چشمگیر نبوده و حاکی از عدم موفقیت این روش می‌باشد(۱۰، ۹). از دیگر راه‌کارها جهت افزایش تعداد سلول‌های بنیادی خونساز خون بند ناف، می‌توان به پیوند دو یا چند کیسه خون بند ناف اشاره کرد که اگر چه مشکل تعداد کم سلول را بر طرف خواهد کرد اما با مشکلات دیگری از جمله عدم تطابق کامل آنتی‌ژن‌های سازگار نسجی بین کیسه‌های پیوندی و گیرنده و افزایش امکان رد پیوند همراه می‌باشد(۱۲، ۱۱). بنابراین افزایش تعداد سلول‌های مفید برای خونسازی در صورتی موفق خواهد بود که سلول‌های اضافه شده از همان منبعی باشند که خون بند ناف از آن استحصال شده است. یکی از منابعی که می‌تواند به عنوان منبع مکمل سلول‌های خون بند ناف مورد توجه قرار گیرد، بافت جفت می‌باشد. بافت جفت دارای بافت همبند متراکم بوده و مملو از عروق می‌باشد. هر چند که مطالعه‌های کمی مبنی بر وجود سلول‌های خونساز در بافت جفت وجود دارد اما وجود این سلول‌ها در جفت موش و اخیرا در جفت انسان مورد مطالعه قرار گرفته است(۱۴، ۱۳). در این مطالعه سعی شد که کمیت و کیفیت سلول‌های بنیادی خونساز و هم چنین مزانشیمی موجود در بافت جفت انسانی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول از بافت جفت به روش آنزیمی:

در این مطالعه که به صورت تجربی انجام گرفت، بافت جفت اهدایی از ۵ دهنده مورد بررسی قرار گرفت. این نمونه‌ها از بیمارستان میلاد و با گرفتن رضایت‌نامه کتبی تهیه گردید. مقدار ۲۰ گرم از بافت جفت در شرایط کاملاً استریل گرفته شده و در لوله فالکون حاوی PBS و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین ریخته شد. از این بافت میزان ۵ گرم جدا شده، با تیغ به قطعات خیلی ریز تقسیم شد. سه بار با PBS شسته شده و به آن ۵۰ میلی‌لیتر کلاژناز تیپIV به میزان ۰/۱٪ (وزنی ـ حجمی) اضافه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

گردید. این محلول به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس محلول فوق از گاز عبور داده شده و سوسپانسیون عبوری، ۲ بار با PBS شسته شد(آنزیم و سایر مواد از جیبکو، آمریکا). پس از شستشو، به منظور حذف یاخته‌های سرخ از سوسپانسیون سلولی، از بافر لیزکننده یاخته‌های سرخ استفاده گردید. ابتدا پلیت سلولی در ۱ میلی‌لیتر PBS به صورت سوسپانسیون درآمده، به آن ۴ میلی‌لیتر محلول لیزکننده یاخته‌های سرخ اضافه گشت و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت این محلول با PBS شسته شد. بعد از این مرحله، توده سلولی سفید رنگی پدید آمد.

شمارش سلولی و بررسی درصد زنده بودن سلول‌ها:

برای شمارش سلولی و تعیین درصد سلول‌های زنده، از رنگ تریپان‌بلو استفاده گردید. به این ترتیب که سلول و رنگ به میزان مساوی با یکدیگر مخلوط شده، سپس به کمک لام هماسیتومتر، تعداد کل سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده شمارش گردید.

هم چنین درصد سلول‌های زنده با استفاده از رنگ PI (بیوساینس ـ آمریکا) و با روش فلوسایتومتری نیز ارزیابی گردید.

بررسی وجود سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک در سلول‌های حاصل از جفت:

۱- بررسی مارکرهای سطحی:

به منظور بررسی مارکرهای سطحی، سوسپانسیون سلولی حاوی ۲۰۰۰۰۰ سلول در ۵۰ میکرولیتر آلبومین سرم گاوی تهیه و سپس به هر یک از لوله‌ها، ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی مورد نظر و یا آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل اضافه شد. این مارکرها شامل CD34 ، CD133 و CD117 کونژوگه با PE (Phyco Erythrin) و مارکرهای CD45 و CD38 کونژوگه با FITC (Fluorescein Iso Thio Cyanate) بود.

هم‌چنین از آنتی‌بادی FITC-IgG1 و PE-IgG1 به عنوان کنترل منفی استفاده گردید(تمامی آنتی‌بادی‌ها از شرکت بیوساینس ـ آمریکا تهیه شد). سپس این لوله‌ها در دمای یخچال به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و بعد از سانتریفیوژ و دور ریختن مایع‌رویی، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول پارافرم آلدئید ۱٪ به آن اضافه گردید و در نهایت توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- بررسی قدرت تولید کلونی‌های خونساز:

به منظور بررسی وجود سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک با پتانسیل تولید رده‌های مختلف خونی، پس از زدن کلاژناز، عبور از قیف و اضافه کردن بافر لیزکننده، 2×10^5 سلول با ۱ میلی‌لیتر محیط نیمه جامد متیل سلولز(Methocult H4435 ، Stem cell technology و آمریکا) مخلوط و در دمای اتاق به درون چاهک‌های ۳۵ mm^2 ریخته شدند و برای ۱۴ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 قرار گرفتند. پس از این زمان، کلونی‌ها به کمک میکروسکوپ لوپ(ژاپن، نیکون) بررسی و شمارش شد.

بررسی وجود سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول‌های حاصل از جفت:

به منظور بررسی وجود سلول‌های بنیادی مزانشیمی از سلول‌های حاصل از بافت جفت، این سلول‌ها در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع ریخته شده و به آن محیط DMEM غنی شده با ۱۰٪ FBS اضافه شد(هر دو از BRL ، Grand Island ، NY ، آمریکا جیبکو) و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت، تمامی سلول‌های غیر چسبنده حذف و دوباره محیط کشت اضافه شد و بعد از آن هر سه روز یک بار تعویض محیط انجام شد. پس از مشاهده کلنی‌های سلولی، سلول‌ها به کمک آنزیم تریپسین از کف فلاسک جدا شده و به فلاسک‌های بزرگ‌تر منتقل شدند و بعد از پاساژ سوم سلول‌های حاصل از نظر مارکرهای سطحی و قدرت تمایزی مورد بررسی قرار گرفتند.

۱- بررسی مارکرهای سطحی :

برای بررسی مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی،

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

سلول‌ها در پاساژ سوم، با تریپسین از کف فلاسک جدا شده و سوسپانسیون سلولی حاوی ۲۰۰۰۰۰ در آلبومین سرم گاوی تهیه شد. از این سوسپانسیون در چند لوله هر کدام به میزان ۵۰ میکرولیتر ریخته شده و به هر یک از آن‌ها ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی مورد نظر شامل CD34 ، CD105، CD73 ، CD166 (کونژوگه با PE) و CD45 ، CD90 و CD29 (کونژوگه با FITC) اضافه شد. از آنتی‌بادی‌های FITC-IgG1 و PE-IgG1 نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

۲- بررسی پتانسیل تمایز به استخوان و چربی:

در پاساژ سوم، پتانسیل تمایز این سلول‌ها به دو رده چربی و استخوان نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی توانایی تمایز، تعداد ۲۰۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۴ خانه منتقل و بعد از اتصال آن‌ها به کف، محیط القاکننده به رده استخوانی و چربی به آن اضافه شد و هر سه روز یک بار و به مدت ۲۱ روز با این محیط‌ها تعویض محیط شد. محیط تمایزی چربی شامل دگزامتازون (۲۵۰ نانومولار) و ۳ ایزوبوتیل، ۱- متیل گزانتین (۰/۵ میلی‌مولار)، محیط تمایزی استخوان شامل اسید اسکوربیک (۵۰ میکروگرم در لیتر)، دگزامتازون(۱۰۰ نانو مولار) و بتا گلیسرول فسفات(۱۰ میلی‌مولار) می‌باشد. برای بررسی تمایز بعد از گذشت دوره ۲۱ روزه، سلول‌ها در کف فلاسک با پارافرم‌الدهید ۴٪ فیکس، سپس از رنگ آلیزارین رد برای بررسی وجود رسوب کلسیم در تمایز استخوان و از رنگ اویل رد برای بررسی قطرات چربی داخل سلولی در تمایز چربی استفاده شد و با میکروسکوپ مورد مشاهده قرار گرفت.

یافته‌ها

با روش آنزیمی می‌توان تعداد قابل توجه‌ای از سلول‌های تک هسته‌ای زنده را از بافت جفت جدا کرد:

شمارش سلولی با تریپان‌بلو حکایت از آن داشت که ۳ ± ۹۰ سلول حاصل از هضم آنزیمی بافت جفت زنده می‌باشند. این درصد با رنگ PI به ۲ ± ۸۹ درصد رسید. این درصد با توجه به تقسیم کردن بافت به قطعات کوچک توسط تیغ و استفاده از آنزیم مطلوب می‌باشد.

بافت جفت حاوی سلول‌هایی با مارکرهای سلول‌های بنیادی خونساز است:

آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های حاصل از بافت جفت بلافاصله پس از جداسازی این سلول‌ها صورت گرفت و این سلول‌ها از نظر مارکرهای رده خونی شامل CD34 ، CD45 ، CD133 ، CD117 مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حکایت از آن داشت که در ۵ نمونه، ۰/۸ ± ۴/۷۸٪ سلول‌ها $CD34^{+}CD38^{-}$ ، ۰/۶ ± ۱/۰۲٪ سلول‌ها $CD34^{+}CD45^{+}$ ، ۱/۱ ± ۲/۱٪ سلول‌ها $CD133^{+}CD45^{+}$ و ۰/۵ ± ۱/۱۶٪ سلول‌ها $CD117^{+}CD45^{+}$ می‌باشند.

هم‌چنین از سلول‌های حاصل از جفت، ۰/۶ ± ۶/۰۲٪ $CD34^{+}$ ، ۰/۸ ± ۱۴/۱۴٪ $CD133^{+}$ و ۰/۴ ± ۲/۰۱٪ $CD117^{+}$ بودند. طبق شکل ۱ که در آن نتایج یک نمونه از ۵ نمونه انجام شده دیده می‌شود، بیان مارکرها بر روی سلول‌های بنیادی حاصل از جفت به شرح ذیل می‌باشد: (۵/۲۳٪) $CD34^{+}CD38^{-}$ ، (۰/۵۳٪) $CD34^{+}CD45^{+}$ ، (۲/۴٪) $CD133^{+}CD45^{+}$ و (۰/۷۷٪) $CD117^{+}CD45^{+}$.

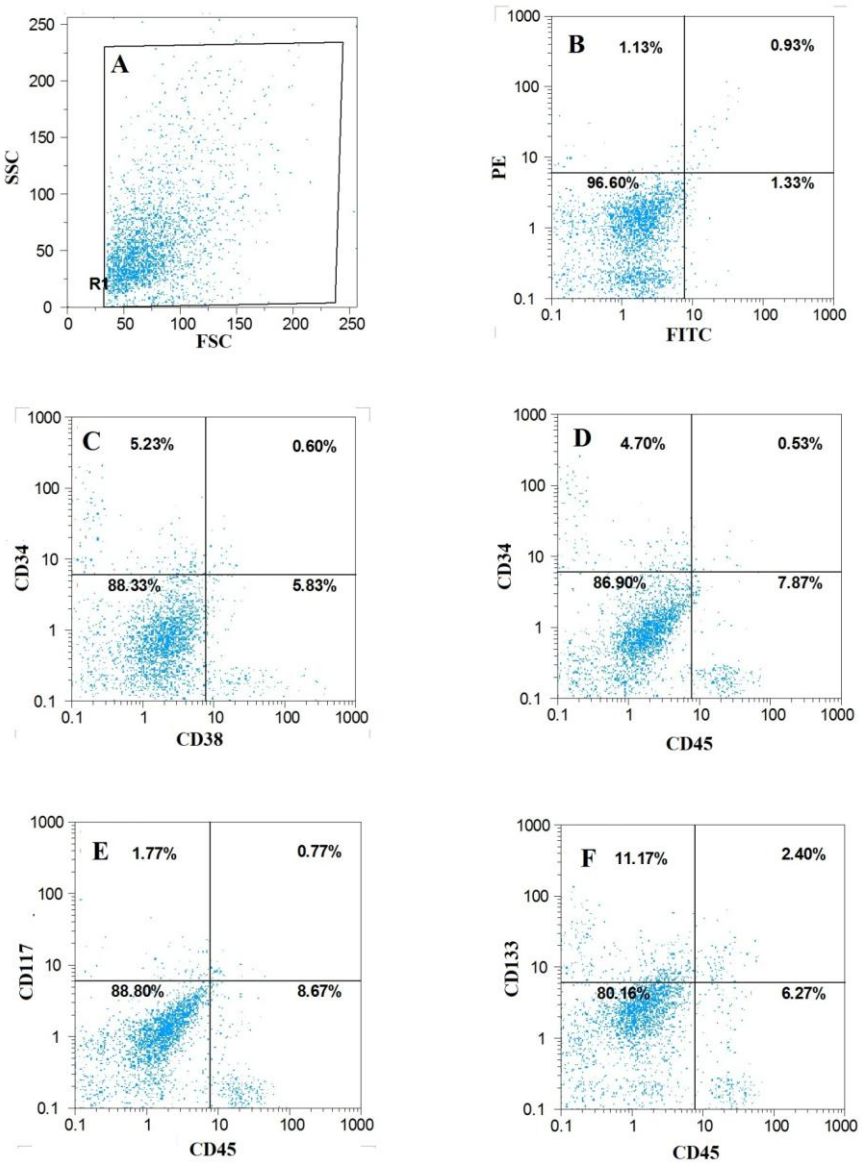
سلول‌های بنیادی خونساز حاصل از جفت پتانسیل تمایز به رده‌های مختلف خونی را دارند:

نتایج سنجش کلونی نیز نشان از آن داشت که این سلول‌ها توانایی تشکیل تمامی انواع کلونی‌های خونساز شامل CFU - GEMM ، CFU - GM و CFU-E را دارا می‌باشند.

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، کلونی‌های خونساز اریتروییدی(CFU-E) درسمت چپ شکل، کلونی‌های خونساز مخلوط (CFU-GEMM) در بخش میانی شکل و کلونی‌های میلوئیدی- مونوسیتی (CFU-GM) در سمت راست شکل دیده می‌شوند.

میزان تشکیل این کلونی‌ها به ترتیب ۲ ± ۱۶ (CFU-GEMM) ، ۳ ± ۱۸ (CFU-GM) و ۲ ± ۷ (CFU-E) به ازای ۲×۱۰^{۵} سلول مشتق شده از بافت جفت بود(نمودار ۱).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

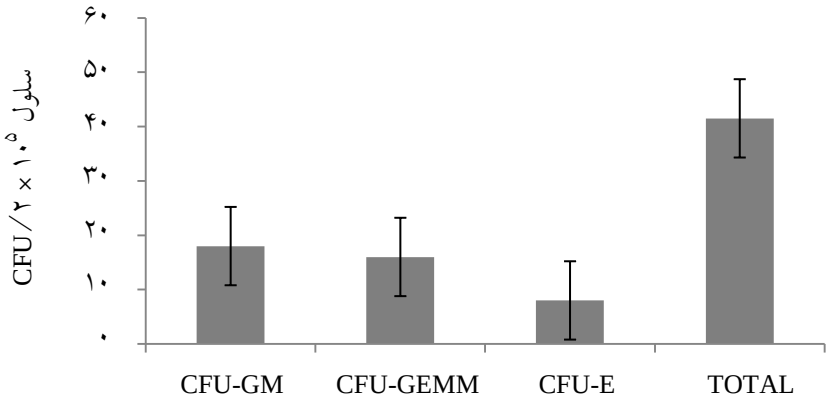


شکل۱: مارکرهای سطحی سلول‌های بافت جفت. سلول‌های به دست آمده از بافت جفت، بلافاصله پس از جداسازی از نظر مارکرهای سلول‌های بنیادی خونساز مورد بررسی قرار گرفتند. A) : جمعیت بررسی شده B) : کنترل منفی C) : CD34CD38 ، D) : CD34 ، CD45 ، E) : CD117 ، CD45 ، F) : CD133 ، CD45

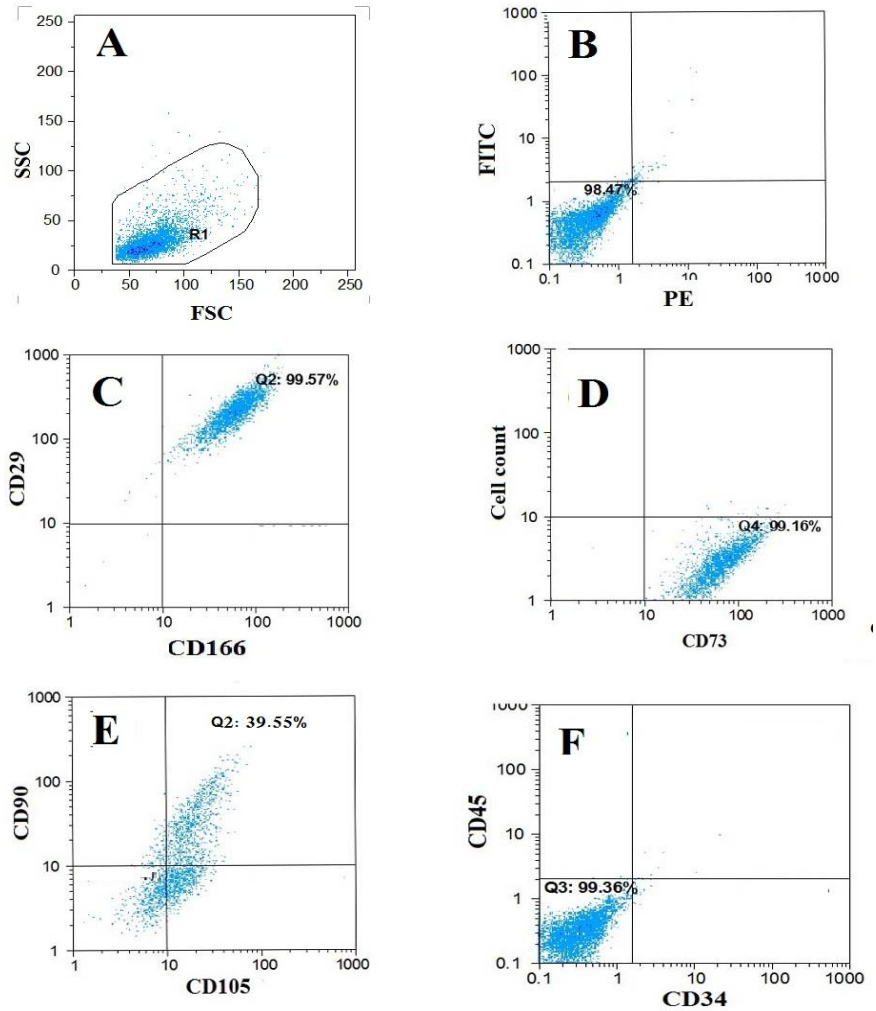


شکل۲: توانایی سلول‌های جفت در تشکیل کلنی‌های مختلف خونساز A) کلنی‌ها دارای سلول‌های اریتروییـد(CFU-E) ، B) کلنی‌ها دارای سلول‌های مخلوط میلوئید، اریتروئید و مگاکاریوسیت (CFU- GEMM) ، C) کلنی‌ها دارای سلول‌های میلوئید- منوسیت (CFU- GM) بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکرومتر

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

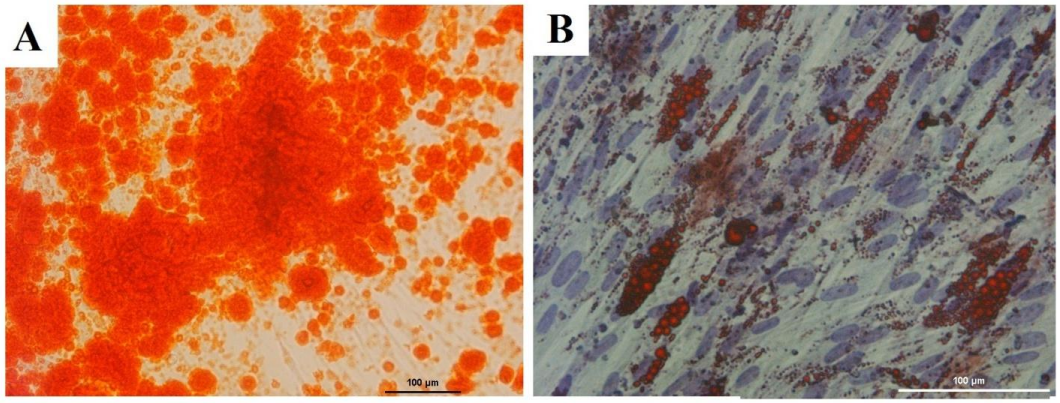


نمودار ۱: میانگین تعداد کلونی‌های مختلف خونساز مشتق شده از سلول‌های بافت جفت



شکل۳: مارکرهای سطحی سلول‌های چسبنده بافت جفت. سلول‌های چسبنده پس از پاساژ سوم از نظر مارکرهای مثبت و منفی مزانشیمی مورد بررسی قرار گرفتند. A): جمعیت بررسی شده B): کنترل منفی، C) : CD166، CD29 ، D): CD73 ، E): CD90 ، CD105 ، F): CD34 و CD45

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]



شکل۴: سلول‌های چسبنده جدا شده از بافت جفت توانایی تمایز به استخوان و چربی را دارا می‌باشند. A) تمایز به رده استخوانی که از طریق رسوب کلسیم رنگ شده با alizarin red مشخص شده است. B) تمایز به رده چربی که از طریق گرانول‌های چربی رنگ شده با oil red مشخص شده است.

بافت جفت حاوی سلول های بنیادی مزانشیمی است:

بعد از برداشت سلول‌های غیر چسبنده در روز اول پس از کشت، تعداد کمی سلول چسبنده به کف فلاسک مشاهده گردید. اگر چه تعداد این سلول زیاد نبود اما رفته رفته تکثیر شده و فلاسک را پر کردند. این سلول‌ها پتانسیل تکثیری خود را تا پاساژ ۲۰ در طول مدت سه ماه حفظ کردند. برای تایید ماهیت این سلول‌ها، پانلی از مارکرهای مثبت و منفی مشخص شده برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی انتخاب شد. آنالیز فلوسایتومتری در ۵ نمونه نشان داد که این سلول‌ها برای مارکرهای (۰/۵ ± ۰/۹۹٪) CD29 ، (۱ ± ۰/۹۹٪) CD166 ، (۱ ± ۰/۹۹٪)CD73 ، (۳ ± ۶۹٪) CD105 ، (۵ ± ۴۳٪) CD90 مثبت و برای مارکرهای رده خونی شامل(۰/۴ ± ۰/۵٪) CD45 و (۰/۳ ± ۰/۶٪) CD34 منفی می‌باشند. طبق شکل ۳ که در آن نتایج یک نمونه از ۵ نمونه انجام شده دیده می‌شود، ۹۹/۵۷٪ سلول‌ها CD29 ، CD166 مثبت(C)، ۹۹/۱۶٪ سلول‌ها CD73 مثبت (D)، ۳۹/۵۵٪ سلول‌ها CD90 ،CD105 مثبت(E) و ۹۹/۳۶٪ سلول‌ها از نظر مارکرهای خونسازی مانند CD45 و CD34 منفی(F) می‌باشند.

هم چنین در بررسی پتانسیل تمایزی این سلول‌ها به رده استخوانی، بعد از اضافه کردن محیط القایی، تقریباً از روز دهم کریستال‌های کلسیم با رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد مشاهده شد. کریستال‌های کلسیم تشکیل شده با این رنگ‌آمیزی به رنگ قرمز مشاهده می‌شوند و همان طور که در شکل ۴ سمت چپ (A)دیده می‌شود، در پایان دوره تمایز سطح پلیت کاملاً با رسوب قرمز رنگ پوشیده شد که حاکی از تمایز این سلول‌ها به رده استئوبلاستی می‌باشد. در بررسی پتانسیل تمایزی این سلول‌ها به رده چربی، پس از اضافه کردن محیط تمایز چربی، از روز پنجم واکوئل‌های چربی در سیتوپلاسم سلول‌ها مشاهده و همان طور که در شکل ۴ سمت راست (B) دیده می‌شود، در پایان دوره تمایز واکوئل‌های چربی تشکیل شده در این سلول‌ها، با رنگ‌آمیزی oil red به رنگ قرمز دیده شدند.

بحث

از آنجایی که میزان کم سلول‌های بنیادی خونساز موجود در یک نمونه خون بند ناف، مهم‌ترین فاکتور محدود کننده استفاده از این منبع در پیوند می‌باشد، یافتن منبع دیگری از سلول‌های بنیادی خونساز که بتواند به عنوان مکمل سلول‌های خون بند ناف این کمبود را جبران کند، ضروری به نظر می‌رسد. یکی از منابعی که می‌تواند در این راستا مورد توجه قرار گیرد، بافت جفت می‌باشد. اگر جفت منبعی از سلول‌های بنیادی خونساز عملکردی باشد، پیوند هم زمان سلول‌های آن به همراه سلول‌های خون بند ناف خواهد توانست مشکلات ناشی از کمبود سلول‌های بنیادی خونساز خون بند ناف را مرتفع نماید. لذا

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

در این مطالعه سعی شد که امکان جداسازی سلول‌های بنیادی خونساز و مزانشیمی مناسب برای پیوند از بافت جفت انسانی مورد بررسی قرار گیرد.

نتایج حکایت از آن داشت که سلول‌های به دست آمده از بافت جفت دارای سلول‌های پیش ساز بالغ خونساز $CD34^+ CD38^+$ و پیش‌ساز نابالغ خونساز $CD34^+ CD38^-$ بودند. ۰/۶ ± ۶/۰۲٪ سلول‌ها $CD34^+$ و ۰/۸ ± ۴/۷۸٪ آن‌ها $CD34^+ CD38^-$ بودند. هم چنین سلول‌های این بافت، سایر مارکرهای سلول‌های بنیادی خونساز شامل CD133 (۰/۸ ± ۱۴/۱۴٪) و CD117 (۰/۴ ± ۲/۰۱٪) را نیز بیان کردند. این سلول‌ها توانایی تشکیل تمامی کلون‌های خونساز را دارا بودند. توانایی تشکیل کلون‌های خونساز در کشت از مهم‌ترین خصوصیات سلول‌های بنیادی خونساز برای پیوند می‌باشد. هم چنین کشت این سلول‌ها و بررسی مارکرها و قدرت تمایزی آن‌ها نشان داد که این بافت دارای سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز می‌باشد. این نتایج با نتایج مطالعه‌های قبلی در این زمینه هم‌خوانی دارد به طوری که نقش حمایتی بافت جفت در تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز ابتدا در سال ۲۰۰۳ توسط آلوارز سیلوا مطرح گردید(۱۵). سپس گکاس و همکارانش نشان دادند که سلول‌های خونساز $C\text{-}Kit^+$ و $CD34^+$ در سطح جنینی جفت موش وجود داشته و احتمال این که بافت جفت به همراه کبد، منبع اولیه تولید سلول‌های بنیادی خونساز مغز استخوان باشند را مطرح کردند(۱۳). پس از آن روبین و همکارانش وجود این سلول‌ها را در جفت انسان مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این بافت از ۶ هفتگی دارای سلول‌های بنیادی خونساز بوده و این سلول‌ها توانایی بازگرداندن خونسازی را در موش‌های اشعه دیده دارا می‌باشند(۱۴). آن‌ها هم چنین درصد سلول‌های $CD34^+ CD38^-$ موجود در بافت جفت به همراه عروق آن را ۰/۲ ± ۱/۶٪ اعلام کردند. نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که درصد سلول‌های $CD38^-$ و $CD34^+$ بافت جفت ۰/۸ ± ۴/۷۸٪ می‌باشد که این عدد افزایش تقریبی ۲/۹ برابری این سلول‌ها نسبت به مطالعه روبین و همکارانش را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که علت این اختلاف، در روش جداسازی سلول‌ها از بافت جفت باشد. روبین و همکارانش بافت جفت را تحت تاثیر کلاژناز قرار داده و پس از استفاده از فایکول برای حذف یاخته‌های سرخ، سلول‌های تک هسته‌ای حاصل از آن را از نظر وجود درصد سلول‌های $CD34^+ CD38^-$ مورد بررسی قرار دادند اما از آن جایی که امکان حذف تعدادی از سلول‌های بنیادی توسط فایکول وجود دارد، در مطالعه حاضر از بافر لیزکننده برای حذف یاخته‌های سرخ استفاده شده و پس از این مرحله سلول‌های حاصل از آن، از نظر درصد سلول‌های $CD34^+ CD38^-$ بررسی شدند.

درصد بالای سلول‌های $CD34^+ CD38^-$ موجود در بافت جفت و هم‌چنین بیان سایر مارکرهای سلول‌های بنیادی خونساز شامل CD133 و CD117 که در سلول‌های بنیادی خونساز مغز استخوان هم بیان می‌شود، نشان‌دهنده وجود سلول‌های بنیادی خونساز عملکردی در این بافت می‌باشد و لذا احتمالاً بافت جفت با داشتن سلول‌های بنیادی خونساز می‌تواند به عنوان منبع سلولی مکمل در پیوند سلول‌های بنیادی خونساز خون بند ناف مد نظر قرار گیرد. این احتمال وجود دارد که با استفاده از این راه‌کار، تعداد اولیه سلول‌های بنیادی خونساز خون بند ناف افزایش یابد و از آن جا که جفت و خون بند ناف از یک دهنده هستند، مسایل مطرح در استفاده از دو یا چند کیسه خون بند ناف از قبیل بروز GVHD از بین خواهد رفت. از طرفی بافت جفت دارای سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز می‌باشد که این سلول‌ها نقش مهمی در حمایت از خونسازی دارند(۱۶). این سلول‌ها به رده‌های مختلف سلول‌های استرومایی تشکیل‌دهنده نیچ تمایز یافته، بستر و یا آشیانه مناسبی را در مغز استخوان فرد گیرنده ایجاد کرده و شرایط را برای لانه گزینی و فعالیت سلول‌های خونساز پیوند شده فراهم می‌کنند(۱۷).

با توجه به مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که اگر سلول‌های مزانشیمی مشتق از جفت به همراه سلول‌های بنیادی خونساز جفت و خون بند ناف پیوند شوند، احتمالاً نیاز گیرنده به سلول خونساز را با حمایت از خونسازی کاهش داده و به این ترتیب سلول‌های مزانشیمی پیوند شده ممکن است به صورت غیر مستقیم در خونسازی و موفقیت پیوند نقش داشته باشند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

نتیجه‌گیری

تعداد قابل توجه سلول‌های $CD34^{+}$ $CD38^{-}$، توانایی تشکیل انواع کلونی‌های خونساز و وجود سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بافت جفت نشان می‌دهد که این بافت احتمالاً می‌تواند به عنوان منبع مکمل سلول‌های بنیادی خونساز در پیوند مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین استخراج سلول‌های بنیادی جفت و فریز آن‌ها به همراه سلول‌های خون بند ناف، می‌تواند استراتژی جدید بانک‌های خون بند ناف در رفع محدودیت فراوانی کم سلول‌های ذخیره شده از یک نمونه باشد.

References:

1- Pelosi E, Castelli G, Testa U. Human umbilical cord is a unique and safe source of various types of stem cells suitable for treatment of hematological diseases and for regenerative medicine. Blood Cells Mol Dis 2012; 49(1): 20-8.
2- Barcena A, Muench MO, Kapidzic M, Gormley M, Goldfien GA, Fisher SJ. Human placenta and chorion: potential additional sources of hematopoietic stem cells for transplantation. Transfusion 2011; 51 Suppl 4: 94S-105S.
3- Gluckman E, Ruggeri A, Volt F, Cunha R, Boudjedir K, Rocha V. Milestones in umbilical cord blood transplantation. Br J Haematol 2011; 154(4): 441-7.
4- Zandstra PW, Conneally E, Petzer AL, Piret JM, Eaves CJ. Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(9): 4698-703.
5- Dahlberg A, Delaney C, Bernstein ID. *Ex vivo* expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 2011; 117 (23): 6083-90.
6- Hackney JA, Charbord P, Brunk BP, Stoeckert CJ, Lemischka IR, Moore KA. A molecular profile of a hematopoietic stem cell niche. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(20): 13061-6.
7- Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, *et al*. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature 2003; 425(6960): 836-41.
8- McNiece I, Harrington J, Turney J, Kellner J, Shpall EJ. *Ex vivo* expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. Cytotherapy 2004; 6(4): 311-7.
9- Li N, Feugier P, Serrurrier B, Latger-Cannard V, Lesesve JF, Stoltz JF, *et al*. Human mesenchymal stem cells improve *ex vivo* expansion of adult human CD34_ peripheral blood progenitor cells and decrease their allo stimulatory capacity. Exp Hematol 2007; 35(3): 507-15.
10- Kelly SS, Sola CB, de Lima M, Shpall E. *Ex vivo* expansion of cord blood. Bone Marrow Transplant 2009; 44(10): 673-81.
11- Sideri A, Neokleous N, Brunet De La Grange P, Guerton B, Le Bousse Kerdilles MC, Uzan G, *et al*. An overview of the progress on double umbilical cord blood transplantation. Haematologica 2011; 96(8): 1213-20.
12- Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, *et al*. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. Blood 2005; 105(3): 1343-7.
13- Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH, Mikkola HK. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. Dev Cell 2005; 8(3): 365-75.
14- Robin C, Bollerot K, Mendes S, Haak E, Crisan M, Cerisoli F, *et al*. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. Cell Stem Cell 2009; 5: 385-95.
15- Alvarez-Silva M, Belo-Diabangouaya P, Salaun J, Dieterlen-Lievre F. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. Development 2003; 130(22): 5437-44.
16- Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, *et al*. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. Blood 2006; 107(5): 1878-87.
17- Quesenberry PJ. Stromal cells in long-term bone marrow cultures. In: Tavassoli M. Handbook of the Hematopoietic Microenvironment. Clifton, NJ: Humana Press; 1989. p. 253-85.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2014; 11(2): 93-102

Original Article

Isolation and characterization of hematopoietic and mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue

Omidkhoda A.[1], Kaviani S.[1], Soleimani M.[1], Nikougoftar M.[2], Atashi A.[1], Ahmadbeigi N.[3], Jamali M.[2], Nakhlestani M.[2]

[1]Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[3]Digestive Disease Research Institute, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

The low frequency of hematopoietic stem cells in umbilical cord blood is the main factor of its application to be restricted for transplantation. If hematopoietic and mesenchymal stem cells of placenta can be isolated and transplanted with cord blood cells, the problem of cell dose limitation will be solved due to increase in the number of primary hematopoietic stem cells and homing of cells through mesenchymal stem cells. Thus in this study, we tried to isolate the maximum number of hematopoietic and mesenchymal stem cells from placenta by enzymatic methods and evaluate their properties.

Materials and Methods

Five different placenta tissues were treated with collagenase and their red blood cells were omitted with the lysis buffer; then, the remaining cells were studied for the presence of hematopoietic and mesenchymal stem cells.

Results

The result showed that 6.02 ± 0.6 and 4.78 ± 0.8 percent of isolated cells were $CD34^+$ and $CD34^+$ together with $CD38^-$, respectively. These cells having generated all hematopoietic lineages and adherent stromal cells with the property of mesenchymal stem cells were obtained from the culture of placenta cells.

Conclusions

The presence of a remarkable number of $CD34^+$ cells and mesenchymal stem cells in placenta tissue showed that transplantation of these cells with umbilical cord blood cells can increase the quality of transplantation.

Key words: Placenta, Hematopoietic Stems Cells, Mesenchymal Stem Cells

Received: 13 Jul 2013
Accepted: 5 Nov 2013

Correspondence: Kaviani S., PhD of Hematology. Associate Professor of Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82883832; Fax: (+9821) 82884507.
E-mail: *kavianis@modares.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]