مقاله پژوهشی

جداسازی و بررسی ویژگی‌های بیولوژیکی و پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بند ناف انسان

سونا زارع[۱]، رحیم احمدی[۲و۳]* و دیبا صمدی[۴]

۱- مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران
۳- کالج بین المللی اویسینا، بوداپست، مجارستان
٤- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، واحد جنوب غرب تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول: رحیم احمدی، دکتری تخصصی، drrahahmadi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۸/۱۵ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۳

چکیده

پیشینه و هدف: علیرغم مطالعات متعدد در رابطه با ویژگی‌های بیولوژیکی و قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بند ناف، هنوز هم این بررسی‌ها به منظور دستیابی به یافته‌های جدیدتر ادامه دارد. بر این اساس مطالعه‌ی حاضر به بررسی ویژگی‌های بیولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بند ناف و توان تمایز آنها به سلول‌های استخوان و چربی می‌پردازد.

روش و بررسی: طی این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی، ۳۰ نمونه جفت کامل از مادران تحت سزارین تهیه و متعاقبا" بند ناف جداسازی و در شرایط استاندارد نگهداری شد. سلول‌های مزانشیمی به روش آنزیمی جداسازی شدند و ویژگی‌های مورفولوژیک آنها با استفاده از میکروسکوپ و اسپکتروسکوپی جذبی و ویژگی‌های بیولوژیک آنها به ویژه بیان مارکرهای CD با استفاده از فلو سایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت با استفاده از محیط کشت تمایزی اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی و چربی تمایز یافتند. داده ها با استفاده از آمار توصیفی بررسی گردیدند.

نتایج: بررسی های مورفولوژیک و فیزیکی توسط میکروسکوپ و اسپکتروسکوپی جذبی و نیز مثبت بودن مارکرهای CD44، CD73، CD90 و CD105 و منفی بودن مارکرهای CD34 و CD45 اثبات کننده ماهیت مزانشیمی سلول‌های بنیادی بود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به طور موفقیت آمیزی به سلول‌های استخوانی و چربی تمایز یافتند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف انسان توان تمایز به سلول‌های بالغ چربی و استخوان دارند. بر این مبنا، استفاده از سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از بند ناف می تواند در سلول-درمانی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بند ناف، تمایز، سلول استخوان، سلول چربی

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌هایی با جسم سلولی کوچک و زوائد نازک و بلند هستند که از بافت مزودرم مشتق می‌شوند. این سلول‌ها در مغز استخوان, بند ناف، مایع آمنیونی و بافت چربی یافت می‌شوند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای ظرفیت تمایزی بوده و در تنظیم سیستم ایمنی نقش دارند (Ciciarello *et al.*, 2019).

برای بررسی این سلول‌ها و به کارگیری آنها در درمان‌های کلینیکی، مطالعه ویژگی‌های این سلول‌ها و پتانسیل تمایزی آنها پس از جداسازی بسیار مهم است. در این راستا، بررسی ویژگی‌های بیولوژیک مشتمل بر زنده‌مانی، ویژگی‌های مورفولوژیک، مارکرهای سطح غشایی از اهمیت خاصی برخوردار است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای مارکرهای سطح غشایی مخصوص به خود می‌باشند که در شناسایی آنها به کار می‌آید. مارکرهای سطحی سلول‌ها تحت نام عمومی CD شناخته می‌شوند. این سیستم برای طبقه‌بندی بسیاری از آنتی بادی‌های مونوکلونال توسط آزمایشگاه‌های مختلف در سراسر جهان علیه اپی‌توپ‌های موجود در مولکول‌های سطحی سلول‌ها تولید شده‌اند و به عنوان پروتکل برای شناسایی و بررسی سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Haybar *et al.*, 2020). از طرفی بررسی زنده مانی سلول‌ها از دید اکسیداتیو و نیز پتانسیل مرگ سلولی مهم می باشد. در واقع زنده مانی سلول‌ها به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی تا حد بسیاری به میزان آپوپتوز آنها وابسته می‌باشد. فرایند آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول به عنوان روشی حفاظت شده، تحت کنترل ژن‌ها است که به منظور حذف سلول‌های ناخواسته یا غیرضروری در موجودات زنده به کار می‌رود (Cannavò *et al.*, 2019).

سلول‌های بنیادی به چهار نوع دسته بندی می‌شوند که شامل سلول‌های بنیادی رویانی، سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی بند ناف و سلول‌های بنیادی بالغ می‌باشند (Nadig, 2009; Hekmat *et al.*, 2012; Billing *et al.*, 2016; Yousefi *et al.*, 2016; Rohban and Pieber, 2017; Hekmat *et al.*, 2022). یکی از انواع سلول‌های بنیادی، سلول‌های مزانشیمی هستند که می‌توانند از منابع بافتی مختلف جداسازی شوند. مهمترین وجه شناسایی و اثباتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بیومارکرها هستند و از میان بیومارکرها، بیومارکرهای CD44، CD90، CD105، CD106 و CD166 تخصصی‌ترین شناسه‌های اثباتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند (Stoltz *et al.*, 2015; Li and Hua, 2017). سلول‌های بنیادی به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از دید سیستم ایمنی مخفی می‌مانند و بر این مبنا می‌توان از این قابلیت به عنوان یک تکنیک بیولوژیکی در ترمیم آسیب‌های بافتی یا پیوند بافت و اعضا استفاده نمود (Choudhery *et al.*, 2012; Fulle *et al.*, 2012; Le Blanc and Davies, 2015; Vladimirovna *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Li and Hua, 2017).

از میان منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بند ناف انسان یکی از مهمترین منابع می باشد. در واقع این منبع به راحتی در دسترس می‌باشد و حاوی سلول‌های متعدد بنیادی است (Ding *et al.*, 2015). از طرفی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود از قبیل قدرت تحریکی کم سیستم ایمنی، به کارگیری به روش غیرتهاجمی و امکان کشت و تکثیر آسان از مهمترین سلول‌های بنیادی در حیطه سلول-درمانی محسوب می‌شوند (Li *et al.*, 2015). البته دور از اشاره نماند برخی گزارش‌ها مدعی هستند که تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف در نوبت اول باعث تحریک سیستم ایمنی نمی‌شود. اما با افزایش دفعات به تدریج باعث تحریک پاسخ ایمنی می‌گردد (Cho *et al.*, 2008) و از این نظر می‌تواند مشکلاتی ایجاد نماید. هم‌چنین در آزمایشات بالینی گزارش شده که تزریق مکرر سلول‌های مزانشیمی باعث ایجاد مقاومت نسبی می‌شود (Gao *et al.*, 2016). از سویی تحقیقات نشانگر آنند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابلیت تمایز به سلول‌های مختلفی از قبیل سلول‌های استخوان (Zajdel *et al.*, 2017)، سلول‌های کبد (Khosravi *et al.*, 2018) و سلول‌های اپی‌تلیال (Sierra-Sanchez *et al.*, 2018) دارند. در واقع، بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های بالغ، امروزه از عرصه‌های مهم تحقیقاتی به شمار می رود.

با توجه به کاربردهای بالقوه سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حیطه‌های تحقیقاتی و بالینی و نیز با توجه به اینکه بند ناف یکی از مهمترین منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی است که به راحتی در دسترس می‌باشد و همچنین از آنجا که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداسازی شده از بند ناف می‌توانند در حوزه سلول-درمانی مورد استفاده قرار گیرند و از طرفی با توجه به این امر که روش‌های متعدد جداسازی و کشت و تمایز برای سلول‌های بنیادی طرح و بررسی شده‌اند و هنوز هم این بررسی‌ها به منظور دستیابی به اطلاعات دقیق ادامه دارد؛ بنابراین، پژوهش حاضر به بررسی جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بند ناف انسان و بررسی ویژگی‌های بیولوژیک و قدرت تمایز آنها به سلول‌های استخوان و چربی می پردازد و طبعا نتایج حاصل از این پژوهش می‌توانند در حوزه سلول–درمانی مورد توجه قرار گیرند.

جمع‌آوری نمونه طی این تحقیق تجربی آزمایشگاهی، نمونه کامل جفت از ۳۰ اهدا کننده با رعایت شرایط اخلاق در پژوهش و کسب رضایت مادر پس از زایمان در بیمارستان اکبرآبادی و مهدیه تهران از بین زنان ۲۰ تا ۴۰ ساله تحت سزارین دریافت شد. متوسط سن حاملگی ۳۹ هفته (۴۷–۴۱ هفته) بود. ظرف‌های نمونه به روش استریل به آزمایشگاه منتقل شده و اجزای مختلف آن جهت کشت سلول‌های آن جدا شدند.

روش تهیه سلول‌های مزانشیمی: بافت بند ناف با قیچی کاملا خرد شده و سپس سانتریفوژ (RPM۱۷۵۰ و ۷ دقیقه) انجام گردید و

محیط رویی تخلیه شد. به ۱۰ میلی‌لیتر نمونه بافتی داخل لوله فالکون ۲۵ سی‌سی کلاژناز (۱ mg/ml) اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس فعالیت آنزیم با اضافه کردن حجم مساوی از محیط کشت ۱۰ درصد خنثی شد. محتویات لوله فالکون از قیف حاوی گاز به عنوان صافی عبور داده شده و تمام محتویات سلولی جمع‌آوری گردد. نمونه محتویات مورد سانتریفوژ (۱۷۵۰ RPMو ۷ دقیقه) قرار گرفت و محیط رویی تخلیه شده و بر روی پلت سلولی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM اضافه گردید.

بررسی میکروسکوپی سلول‌ها: سلول‌ها بعد جداسازی هر روز توسط میکروسکوپ اینورت (Olympus IX70) مورد ارزیابی و عکسبرداری قرار گرفته، نمونه¬های آلوده و مشکل‌دار حذف و نمونه‌های سالم جهت تعویض محیط و پاساژ نگهداری شدند. در مجموع سه پاساژ بر روی سلول‌ها انجام گرفت.

شمارش سلول‌ها و تعیین درصد سلول‌های زنده: شمارش سلول¬ها توسط لام هموسیتومتر و محلول تریپان بلو انجام گردید. برای این منظور ۰/۴ گرم رنگ تریپان بلو در ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حل شده و سپس جهت شمارش، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را با مقدار هم حجم رنگ تریپان بلو مخلوط کرده و در فضای بین لامل و لام نئوبار قرار داده شد و توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی 10 X شمرده شد و درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید.

بررسی آپاپتوز و نکروز در سلول‌ها: این مطالعه بر مبنای آنالیز سلول با استفاده از کیت انکسین (Annexin V) مورد بررسی قرار گرفت. در این راستا سلول‌ها در فلاسک ۲۵ (پاساژ ۳، تراکم ۸۰٪ و ۱۰۶ سلول) جهت بررسی میزان آپاپتوز و نکروز به آزمایشگاه فلوسایتومتری ارسال گردید. در روند آماده‌سازی نمونه ابتدا با بافر اتصال انکسین آماده شده و سپس سلول‌ها پس از جداسازی یک بار شستشو و سانتریفوژ شده و سپس مایع رویی دور ریخته شده و ۱۰۰ میکرولیتر بافر اتصال انکسین به سلول‌ها اضافه گردید. سپس انکسین Vو فسفاتیدیل (PI) اضافه شده (Zahedian *et al.*, 2022) و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد و در نهایت با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری میزان آپوپتوز بررسی شد.

بررسی مارکرهای سطحی: جهت بررسی CD مارکرها، نمونه به آزمایشگاه فلوسایتومتری ارسال شد. برای بررسی وجود یا عدم وجود CD مارکرها از آنتی‌بادی‌های کونژوگه با فلورسنت شامل آنتی‌بادی CD34-PE، آنتی‌بادی CD45-FITC، آنتی‌بادی CD44-FITC، آنتی‌بادی CD73-PE، آنتی‌بادی CD29-PE و آنتی‌بادی CD166-PE استفاده شد. نمونه‌ها پس از اضافه شدن آنتی‌بادی‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در در یخچال قرار داده شدند و سپس بررسی مارکرها انجام گرفت.

تمایز به سلول‌های چربی: جهت تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول های چربی، سلول‌ها در دو گروه کنترل و تجربی (تحت تمایز) کشت داده شده و وقتی به تراکم ۵۰-۴۰٪ رسیدند، به مدت ۱۵ روز در محیط تمایز به بافت چربی قرار داده شدند. محیط کشت تمایزی هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض شده و در روز ۱۶ یک میلی‌لیتر فرمالین بر روی سلول‌ها ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. سپس رنگ "اویل رد" (Oil-Red) بر روی سلول‌ها ریخته شد و پس از ۱۵ دقیقه نمونه با بافر مناسب شستشو داده شد. در نهایت سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت مورد ارزیابی و عکسبرداری قرار گرفتند.

تمایز به سلول‌های استخوان: جهت تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول های استخوان، سلول‌ها در دو گروه کنترل و تجربی (تحت تمایز) کشت داده شدند و وقتی به تراکم ۵۰-۴۰٪ رسیدند، برای ۱۵ روز در محیط تمایز به بافت استخوان قرار گرفتند. محیط کشت تمایزی هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض شده و در روز ۱۶ یک سی‌سی متانول بر روی سلول‌ها ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. سپس رنگ "آلیزارین رد" (Alizarin-Red) به مدت ۵-۲ دقیقه بر روی سلول‌ها ریخته شد و ۳ با بافر مناسب شستشو داده شد. در نهایت سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت مورد ارزیابی و عکسبرداری قرار گرفتند.

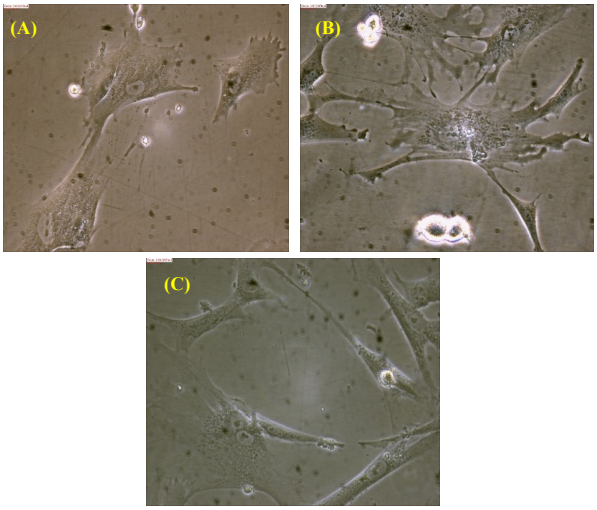
بررسی ویژگی‌های فیزیکی سلول‌ها: جهت ویژگی جذب سلولی به منظور اثبات ویژگی مزانشیمی سلول‌ها، روش اسپکتروسکوپی جذبی انجام گرفت. در این راستا، نمونه خالی از سلول جهت کالیبر دستگاه استفاده شده و نمونه حاوی سلول جهت خوانش جذب و بازتاب امواج مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز آماری: جهت بررسی‌های داده‌ها از آمار توصیفی استفاده شد.

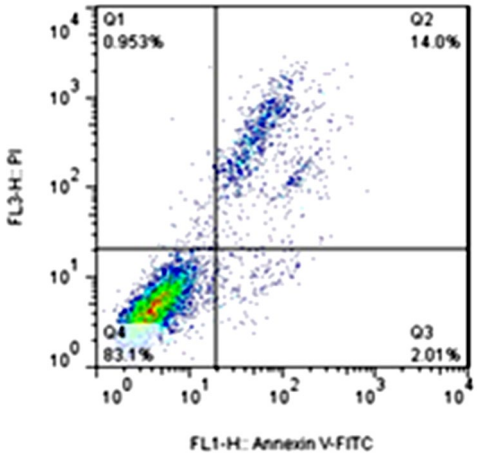
نتایج

سلول‌های مزانشیمی از بند ناف انسان با موفقیت جدا شده و کشت داده شدند. در کشت‌های اولیه سلول‌های مزانشیمی قابل مشاهده عمدتا" دارای مورفولوژی سلول‌های آندوتلیال بودند اما پس از گذشت ۱۰ روز، رفته رفته سلول‌های شبه آندوتلیالی از بین رفته و سلول‌های

مزانشیمی شبه فیبروبلاستی جایگزین آن‌ها شدند. پس از دو هفته جمعیت نسبتا یکسانی از سلول‌های مزانشیمی تشکیل گردید. از سویی، در پاساژهای مختلف، کلونی‌های تشکیل شده با هم متفاوت بودند به گونه‌ای که در پاساژ دوم نسبت به پاساژ اول کلونی‌های تشکیل شده بزرگ‌تر بوده، اما در پاساژ سوم و اول رشد کلونی‌ها تقریبا یکسان بود. شکل ۱ نشان دهنده مورفولوژی سلول‌ها در پاساژهای ۱، ۲ و ۳ است. در این تحقیق جهت بررسی ویژگی‌های سلولی، سلول های پاساژ۳ مورد استفاده قرار گرفتند.

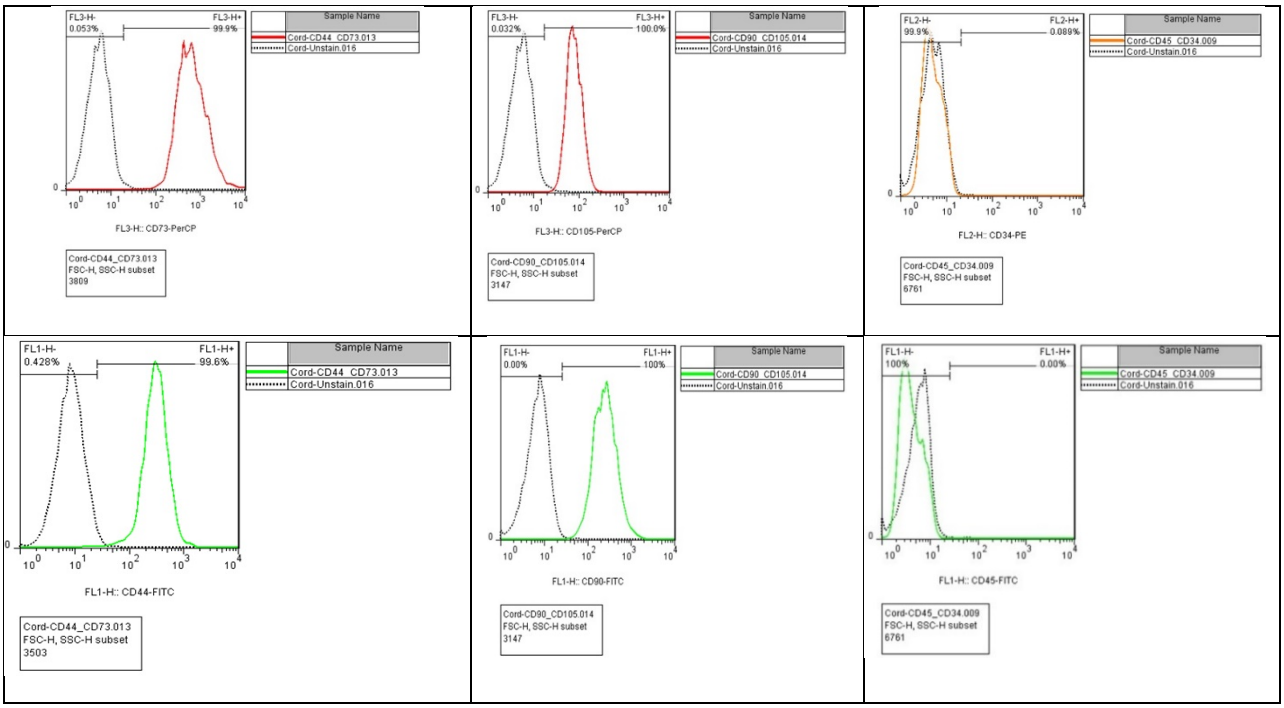


شکل ۱– تصاویر A، B و C به ترتیب سلول‌ها را در پاساژ ۱، ۲ و ۳ نشان می‌دهند (بزرگنمایی X۲۰).



شکل ۲– بررسی میزان آپاپتوز در سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف.

بررسی آپوپتوز در سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف نشان داد که ۸۳ درصد از سلول‌ها زنده بوده و تنها حدود ۱۴ درصد آنها دچار آپوپتوز شده بودند (شکل ۲). در بررسی بیان مارکرهای تخصصی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف نتایج فلوسایتومتری نشان دادند که این سلول‌ها مارکرهای CD44، CD73، CD90 و CD105 را بیان می‌کنند و از نظر بیان مارکرهای CD34 و CD45 منفی هستند (شکل ۳). این امر اثبات کننده ماهیت مزانشیمی سلول‌های مشتق از بند ناف بود.



شکل ۳– بررسی بیان مارکرهای تخصصی در سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف.

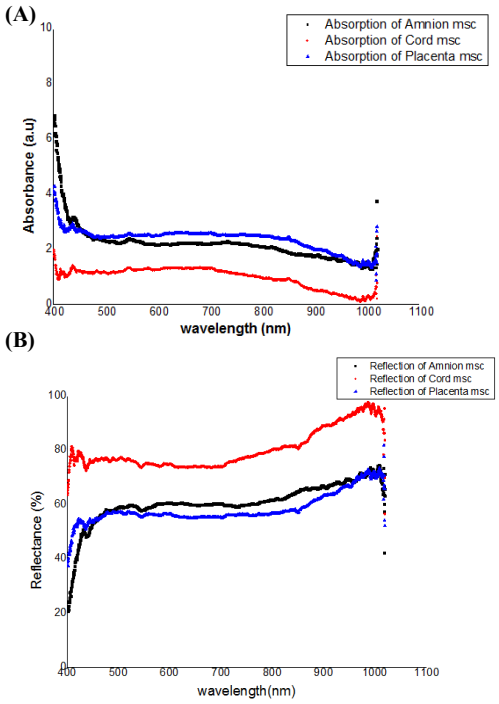
اسپکتروسکوپی جذبی انجام شده بر روی سلول‌های مشتق شده از بند ناف نیز ثابت کرد که سلول‌های کشت شده از نوع سلول‌های مزانشیمی هستند (شکل۴).

بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف به سلول‌های چربی و استخوان نشان داد این سلول‌ها قابلیت تمایز به سلول‌های استخوان و چربی را دارا می‌باشند (شکل ۵). در این راستا نتایج رنگ‌آمیزی سلول‌های تمایز یافته به استخوان با "آلیزارین رد" نشانگر وجود توده‌های قرمز رنگ و اثبات کننده مورفولوژی سلول استخوانی بود، اما در کشت کنترل هیچ گونه توده قرمز رنگی ایجاد نشد. از طرفی نتایج رنگ آمیزی سلول‌های تمایز یافته به سلولهای چربی با "اویل رد" نشانگر وجود واکوئل های چربی به رنگ زرد و اثبات کننده مورفولوژی سلول چربی بود حال آنکه در کشت کنترل اثری از وجود چنین واکوئل هایی وجود نداشت.

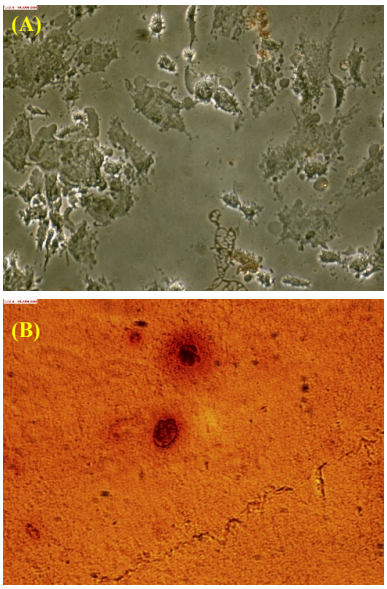
بحث

نتایج این پژوهش نشان دادند که با استفاده از روش به کار برده شده در این تحقیق می‌توان سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداسازی شده از بند ناف را در محیط کشت مناسب، کشت و تکثیر داد و متعاقبا" پس از اثبات ماهیت مزانشیمی و قابلیت زنده‌مانی و تکثیر مناسب این سلول‌ها، می‌توان آنها را به سلول‌های بالغ چربی و استخوان تمایز داد. همراستا با یافته های این پژوهش مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهند که می‌توان سلول‌های مزانشیمی را از بخش‌های مختلف بند ناف جداسازی نمود و به به سلول‌های بالغ تمایز داد (Nagamura-Inoue and He, 2014; Pires *et al.*, 2016). در واقع سلول‌های بنیادی مزانشیمی اساسا" در مغز استخوان وجود دارند اما این سلول‌ها را می‌توان از بافت‌های دیگری از قبیل بافت چربی و بند ناف نیز استحصال نمود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای مورفولوژی اختصاصی بوده، همچنین این سلول‌ها نیازمند به بیان مارکرهای CD73، CD90 و CD105 هستند و در عین حال فاقد مارکرهای CD34 و CD45 می‌باشند (Kobolak *et al.*, 2016).

طی مطالعه حاضر جهت بررسی ماهیت بنیادی مزانشیمی سلول‌های جدا شده از بند ناف به ویژه از نظر مارکرهای تخصصی از روش فلوسایتومتری استفاده شد که نتایج مبین بیان مارکرهای مزانشیمی و عدم بیان مارکرهای آندوتلیالی و هماتوپوئتیک در سلول‌های تحت بررسی بودند و این امر اثبات کننده ماهیت مزانشیمی سلول‌های جداسازی شده از بند ناف بود. مطالعات قبلی انجام یافته در خصوص بررسی بیومارکرهای اختصاصی سلول‌های مزانشیمی نیز همسو با نتایج تحقیق حاضر بود. (Ding *et al.*, 2015; Kargozar *et al.*, 2018) تحقیقات قبلی و دقیقا" منطبق بر یافته‌های این پژوهش نشان داده اند که سلول‌های مزانشیمی بیومارکرهای اختصاصی خود از قبیل مارکرهای CD44، CD73، CD90 و CD105 را بیان می کنند و در مقابل مارکرهای دیگری از قبیل CD34 و CD45 را بیان نمی‌کنند (Nishikawa *et al.*, 2016; Hoffmann *et al.*, 2017).



شکل ٤- نمودار A نشان دهنده‌ی ناحیه‌ی جذب و نمودار B نشان دهنده‌ی ناحیه‌ی بازتاب است.



شکل ٥- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف به سلول‌های چربی (A) و استخوان (B).

یکی دیگر از شاخص سلول‌های مزانشیمی توان تمایز آن‌ها به سلول‌های بالغ دیگر از قبیل سلول‌های استخوان و چربی می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان دادند سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از بند ناف در پاساژ سوم می‌توانند در محیط کشت اختصاصی به طور موفقیت آمیزی به سلول‌های استخوان و چربی تبدیل شوند. مطالعات پیشین نیز نشان داده اند که حداکثر قدرت تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بین پاساژهای ۲ و ۶ می‌باشد و در پاساژهای بالاتر توان تمایزی به شدت کاهش می‌یابد (Dennis and Charbord, 2002; Martin *et al.*, 2002). از سویی بررسی‌ها حکایت از آن دارند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابلیت تمایز به سلول‌های بالغ مختلف از قبیل استئوسیت، هپاتوسیت و سلول‌های اپی‌تلیالی دارند. (Zajdel *et al.*, 2017; Khosravi *et al.*, 2018; Sierra-Sanchez *et al.*, 2018). همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند در محیط کشت مناسب به سلول‌های غضروفی نیز تمایز یابند (Hassan *et al.*, 2018). مطالعات قبلی انجام یافته بر روی بند ناف نیز نشان دادند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف دارای قدرت تمایز به سلول‌های استخوان و چربی می‌باشند (Tsagias *et al.*, 2011; Fujii *et al.*, 2017)

بر مبنای پژوهش‌های پیشین تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی طی مراحلی اتفاق می افتد. در ابتدا تکثیر سلولی رخ می‌دهد و سپس در مرحله بعدی تمایز ابتدایی رخ می‌دهد که با بیان پروتیین‌های ویژه‌ای همراه است. در ادامه استئوبلاست‌ها شکل می‌گیرند و در نهایت با بیان پروتیین استئوکالسین و رسوب کلسیم و فسفات سلول‌های استخوان پدید می‌آیند (Huang *et al.*, 2007; Krause *et al.*, 2011). از طرفی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی نیز طی دو مرحله کلی اتفاق می‌افتد. در این راستا ابتدا سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های پیش‌ساز تخصصی و متعهد تبدیل شده آنگاه این سلول‌ها وارد مسیر تمایزی شده و به سلول‌های بالغ چربی متمایز می‌شوند (Chen *et al.*, 2016).

تحقیق حاضر در محدوده بررسی ویژگی‌های بیولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بند ناف و بررسی تمایز آنها به سلول‌های بالغ چربی و استخوان انجام گرفته و تفسیر نتایج در این حیطه قابل تبیین می‌باشد. با توجه به محدودیت پشتیبانی مالی و تسهیلات در دسترس محققین این پژوهش، امکان بررسی موضوع در سطح ریزتر سلولی و مولکولی به ویژه بررسی بیومارکرهای بیشتر و بیان ژن‌های تخصصی و نیز مطالعات میکروسکوپ الکترونی فراهم نگردید، امید است در آینده امکان بررسی این موضوع در سطوح ریزتر سلولی و مولکولی به ویژه از نظر بررسی بیان ژن‌ها و پروتئین‌های موثر در تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوان و چربی فراهم آید.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان دادند که می‌توان با استفاده از روش به کار رفته در این تحقیق سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از بند ناف انسان جداسازی کرد. همچنین این سلول‌ها با تکثیر در محیط کشت مناسب مارکرهای اختصاصی خود را بیان می نمایند که بدان واسطه اثبات ماهیت مزانشیمی آنها به سادگی امکان پذیر می‌باشد. از طرفی سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بند ناف می توانند در محیط کشت اختصاصی به سلول‌های بالغ چربی و استخوان تمایز یابند. بر این مبنا، استفاده از سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از بند ناف می‌تواند در سلول-درمانی به ویژه در حیطه ترمیم آسیب‌های استخوانی و بافتی مورد توجه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با پشتیبانی مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته، بدینوسیله از پشتیبانی معنوی و حمایت‌های مالی این مرکز تقدیر و تشکر به عمل می آید.

در این پژوهش مجوز کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی از طرف سازمان معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران با شناسه IR.TUMS.VCR.REC.1397.506 و نیز از طرف سازمان پزشکی قانونی کشور با شناسه IR.LMO.REC.1397.021 دریافت شد.

مراجع

Billing, A.M., Ben Hamidane, H., Dib, S.S., Cotton, R.J., Bhagwat, A.M., Kumar, P., Hayat, S., Yousri, N.A., Goswami, N. and Suhre, K. 2016. Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers. Scientific reports, 6(1): 1-15.

Cannavò, S.P., Tonacci, A., Bertino, L., Casciaro, M., Borgia, F. and Gangemi, S. 2019. The role of oxidative stress in the biology of melanoma: A systematic review. Pathology-Research and Practice, 215.۲۸-۲۱ :(۱)

Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Velletri, T. and Zhang, X. 2016. Fate decision of mesenchymal stem cells: Adipocytes or osteoblasts? Cell Death & Differentiation, 23(7): 1128-1139.

endometrial stem cells. Inorganic and Nano-Metal Chemistry: 1-14.

Hekmat, A., Saboury, A.A. and Divsalar, A. 2012. The effects of silver nanoparticles and doxorubicin combination on DNA structure and its antiproliferative effect against t47d and mcf7 cell lines. Journal of biomedical nanotechnology, 8(6): 968-982.

Hoffmann, A., Floerkemeier, T., Melzer, C. and Hass, R. 2017. Comparison of in vitro-cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 11(9): 2565-2581.

Huang, Z., Nelson, E.R., Smith, R.L. and Goodman, S.B. 2007. The sequential expression profiles of growth factors from osteroprogenitors to osteoblasts in vitro. Tissue engineering, 13(9): 2311-2320.

Kargozar, S., Mozafari, M., Hashemian, S.J., Brouki Milan, P., Hamzehlou, S., Soleimani, M., Joghataei, M.T., Gholipourmalekabadi, M., Korourian, A. and Mousavizadeh, K. 2018. Osteogenic potential of stem cells-seeded bioactive nanocomposite scaffolds: A comparative study between human mesenchymal stem cells derived from bone, umbilical cord wharton's jelly, and adipose tissue .Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 106(1): 61-72.

Khosravi, M., Azarpira, N., Shamdani, S., Hojjat-Assari, S., Naserian, S. and Karimi, M.H. 2018. Differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to hepatocyte cells by transfection of mir-106a, mir-574-3p, and mir-451. Gene, 667: 1-9.

Kobolak, J., Dinnyes, A., Memic, A., Khademhosseini, A. and Mobasheri, A. 2016. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. Methods, 99: 62-68.

Krause, U., Seckinger, A. and Gregory, C.A. 2011. Assays of osteogenic differentiation by cultured human mesenchymal stem cells. Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications: 215-230.

Le Blanc, K. and Davies, L.C. 2015. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. Immunology letters, 168(2): 140-146.

Li, F., Cao, J., Zhao, Z., Li, C., Qi, F. and Liu, T. 2017. Mesenchymal stem cells suppress chronic rejection in heterotopic small intestine transplant rat models via inhibition of cd68, transforming growth factor-β1, and platelet-

Cho, P.S., Messina, D.J., Hirsh, E.L., Chi, N., Goldman, S.N., Lo, D.P., Harris, I.R., Popma, S.H., Sachs, D.H. and Huang, C.A. 2008. Immunogenicity of umbilical cord tissue–derived cells. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 111(1): 430-438.

Choudhery, M.S., Khan, M., Mahmood, R., Mehmood, A., Khan, S.N. and Riazuddin, S. 2012. Bone marrow derived mesenchymal stem cells from aged mice have reduced wound healing, angiogenesis, proliferation and anti-apoptosis capabilities. Cell biology international :(۸)۳٦ , .۷٥۳-۷٤۷

Ciciarello, M., Corradi, G., Loscocco, F., Visani, G., Monaco, F., Cavo, M., Curti, A. and Isidori, A. 2019. The yin and yang of the bone marrow microenvironment: Pros and cons of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. Frontiers in oncology, 9: 1135.

Dennis, J.E. and Charbord, P. 2002. Origin and differentiation of human and murine stroma. Stem cells, 20(3): 205-214.

Ding, D.-C., Chang, Y.-H., Shyu, W.-C. and Lin, S.-Z. 2015. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: A new era for stem cell therapy. Cell transplantation, 24(3): 339-347.

Fujii, S., Miura, Y., Iwasa, M., Yoshioka, S., Fujishiro, A., Sugino, N., Kaneko, H., Nakagawa, Y., Hirai, H. and Takaori-Kondo, A. 2017. Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from cryopreserved umbilical cord blood cells. Journal of clinical and experimental hematopathology: 16019.

Fulle, S., Centurione, L., Mancinelli, R., Sancilio, S., Antonio Manzoli, F. and Di Pietro, R. 2012. Stem cell ageing and apoptosis. Current pharmaceutical design, 18(13): 1694-1717.

Gao, F., Chiu, S., Motan, D., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H., Tse, H., Fu, Q.-L. and Lian, Q. 2016. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. Cell death & disease, 7(1): e2062-e2062.

Hassan, G., Bahjat, M., Kasem, I., Soukkarieh, C. and Aljamali, M. 2018. Platelet lysate induces chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. Cellular & Molecular Biology Letters, 23(1): 1-9.

Haybar, H., Maleki Behzad, M., Shahrabi, S., Ansari, N. and Saki, N. 2020. Expression of blood cells associated cd markers and cardiovascular diseases: Clinical applications in prognosis. Laboratory Medicine, 51(2): 122-142.

Hekmat, A., Hatamie, S. and Saboury, A.A. 2022. The effects of synthesized silver nanowires on the structure and esterase-like activity of human serum albumin and their impacts on human

Sierra-Sanchez, A., Ordonez-Luque, A., Ibanez, O.E., Ruiz-Garcia, A. and Santiago, S.A. 2018. Epithelial in vitro differentiation of mesenchymal stem cells. Current Stem Cell Research & Therapy, 13(6): 409-422.

Stoltz, J.-F., de Isla, N., Li, Y., Bensoussan, D., Zhang, L., Huselstein, C., Chen, Y., Decot, V., Magdalou, J. and Li, N. 2015. Stem cells and regenerative medicine: Myth or reality of the ۲۱th century. Stem cells international, 2015.

Tsagias, N., Koliakos, I., Karagiannis, V., Eleftheriadou, M. and Koliakos, G. 2011. Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes. Transfusion Medicine, 21(4): 253-261.

Vladimirovna, I.L., Sosunova, E., Nikolaev, A. and Nenasheva, T. 2016. Mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells: Common traits in immune regulation. Journal of Immunology Research, 2016.

Yousefi, A.-M., James, P.F ,.Akbarzadeh, R., Subramanian, A., Flavin, C. and Oudadesse, H. 2016. Prospect of stem cells in bone tissue engineering: A review. Stem cells international, 2016.

Zahedian, S., Hekmat, A., Tackallou, S.H. and Ghoranneviss, M. 2022. The impacts of prepared plasma-activated medium (pam) combined with doxorubicin on the viability of mcf-7 breast cancer cells: A new cancer treatment strategy. Reports of Biochemistry & Molecular Biology, 10(4): 640.

Zajdel, A., Kałucka, M., Kokoszka-Mikołaj, E. and Wilczok, A .۲۰۱۷ .Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and wharton's jelly of the umbilical cord. Acta Biochimica Polonica, 64(2): 365-369.

derived growth factor expression. Exp Clin Transplant, 15(2): 213-221.

Li, N. and Hua, J. 2017. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. Cellular and Molecular Life Sciences, 74(13): 2345-2360.

Li, T., Xia, M., Gao, Y., Chen, Y. and Xu, Y. 2015. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: An overview of their potential in cell-based therapy. Expert opinion on biological therapy, 15(9): 1293-1306.

Martin, D.R., Cox, N.R., Hathcock, T.L., Niemeyer, G.P. and Baker, H.J. 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. Experimental hematology, 30(8): 879-886.

Nadig, R.R. 2009. Stem cell therapy–hype or hope? A review. Journal of conservative dentistry: JCD, 12(4): 131.

Nagamura-Inoue, T. and He, H. 2014. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. World journal of stem cells, 6(2): 195.

Nishikawa, E., Matsumoto, T., Isige, M., Tsuji, T., Mugisima, H. and Takahashi, S. 2016. Comparison of capacities to maintain hematopoietic stem cells among different types of stem cells derived from the placenta and umbilical cord. Regenerative Therapy, 4: 48-61.

Pires, A.O., Mendes-Pinheiro, B., Teixeira, F.G., Anjo, S.I., Ribeiro-Samy, S., Gomes, E.D., Serra, S.C., Silva, N.A., Manadas, B. and Sousa, N. 2016. Unveiling the differences of secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells, adipose tissue-derived stem cells, and human umbilical cord perivascular cells: A proteomic analysis. Stem cells and development, 25(14): 1073-1083.

Rohban, R. and Pieber, T.R. 2017. Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: Tissue specificity and regenerative potential. Stem Cells International, 2017.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 2, Issue 4, 2022 Pages 12-18

Research Article

Isolation and Evaluation of Biological Properties and Differentiation Potential of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells

Sona Zare [1], Rahim Ahmadi [2,3*], and Diba Samadi[4]

[1] Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Department of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
[3] Avicenna International College, Budapest, Hungary
[4] Department of Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Tabriz Southern West Branch, Azarbayjan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Correspondence to Rahim Ahmadi, Ph.D., drrahahmadi@yahoo.com

Received 6th November 2021 Revised 6th January 2022 Accepted 22nd February 2022

Abstract

Background and Aim: Despite numerous studies on the biological properties and differentiability of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, these studies are still ongoing in order to achieve new findings. Therefore, the present study investigates the biological properties of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and their ability to differentiate into osteocyte and adipocyte.

Materials and Methods: In this experimental laboratory study, 30 whole placenta specimens were prepared from the mothers under cesarean section and kept under standardized conditions. The mesenchymal cells were isolated by enzymatic method and their morphological characteristics were examined by microscopy and absorption spectroscopy and their biological properties, in particular expression of CD markers, were determined by flow cytometry. Finally, mesenchymal stem cells were cultured in specific media in order to differentiate into osteocyte and adipocyte. Data were analyzed using descriptive statistics.

Results: Morphological and physical examinations by microscope and absorption spectroscopy as well as presenting of CD44, CD73, CD90, and CD105 markers and lacking CD34 and CD45 markers demonstrated the mesenchymal entity of stem cells. Mesenchymal stem cells successfully differentiated into osteocyte and adipocyte.

Conclusion: Human cord-derived mesenchymal stem cells can differentiate into adult fat and bone cells. In this respect, the use of cord-derived mesenchymal cells could be of significant interest in cell therapy.

***Keywords*:** Mesenchymal stem cells, Umbilical cord, Differentiation, Osteocyte, Adipocyte