(مقالهٔ پژوهشی)

جداسازی و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون بند ناف انسانی

محمود هاشمی‌تبار[۱]، الهام اله‌بخشی[۲*]، داریوش بیژن‌نژاد[۳]، فرشته نژاد دهباشی[۴]، سعید آزنده[۳]

۱- دانشیار گروه علوم تشریح.
۲-دانشجوی دکترای زیست‌شناسی.
۳- استادیار گروه علوم تشریح.
۴-دانشجوی دکتری مهندسی بافت.

۱و۳و۴-گروه علوم تشریح، دانشکدهٔ پزشکی،مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۲-گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، فارس، ایران.

* نویسندهٔ مسؤول:
الهام اله‌بخشی؛ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، فارس، ایران
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۱۱۳۷۶۷۹
Email: eallahbakhshi@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های مزانشیمی بنیادی مشتق از بند ناف همانند سایر منابع سلول‌های مزانشیمی به دلیل دارا بودن ویژگی‌های منحصر به فردی از قبیل: قابلیت خود نوزایی، پلاستیسیتی بالا، تمایز به دودمان‌های مختلف، تعدیل پاسخ‌های ایمنی و انعطاف‌پذیری برای اصلاح ژنتیکی، منبع سلولی ایده‌آل و امیدبخشی برای پزشکی ترمیمی می‌باشند.

روش بررسی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ژل وارتون بند ناف با استفاده از روش مهاجرت سلول از تکه بافتی(Explant) جداسازی و سپس با تمایز سلول‌ها به دودمان‌های مختلف، آنالیز فلوسایتومتری و تکنیک Real time PCR ظرفیت چند توانی، مارکرهای خاص و قابلیت خود نوزایی آن‌ها شناسایی و اثبات گردید.

یافته‌ها: جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با موفقیت انجام شد. نتایج نشان داد که این سلول‌ها در محیط القایی مناسب قادر به تمایز به دودمان‌های چربی و استخوان هستند. نتایج فلوسایتومتری بیان مارکر CD73 و عدم بیان مارکر CD31 را نشان داد. همچنین نتایج Real time PCR بیان معنی دار مارکرهای تمایز نیافتگی Nanog و Oct4 را در این سلول ها نسبت به بافت تمایز یافته نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به روش‌های نوین درمان جداسازی، شناسایی ویژگی‌های اختصاصی و دست‌یابی به روش‌های مناسب جهت تکثیر این سلول‌ها در مقیاس بالا از اهمیت بسیاری برخوردار است. سلول‌های مزانشیمی مشتق از ژل وارتون بند ناف می‌توانند به عنوان یک منبع مناسب و ایده‌آل برای سلول درمانی و نیز مطالعات تحقیقاتی مورد استفاده قرار گیرند.

کلید واژگان: ژل وارتون، سلول بنیادی مزانشیمی، بند ناف.

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۱/۲۹ **دریافت مقاله‌ی اصلاح‌شده: ۱۳۹۲/۷/۷** **اعلام قبولی: ۱۳۹۲/۱۰/۲۵**

مقدمه

بند ناف انسان یک بافت پیوندی خارج جنینی است که شامل سه قسمت می‌باشد: غشای آمنیوتیک، بافت پیوندی موکوسی (ژل وارتون) و رگهای خونی (دو سرخرگ و یک سیاهرگ). ژل وارتون در زیر پردهٔ آمنیون و اطراف رگهای خونی قرار گرفته است. ژل وارتون ماتریکسی از بافت پیوندی موکوسی است که دارای سلول‌های استرومایی شبه فیبروبلاستی، فیبرهای کلاژن و پروتئوگلیکان‌ها (عمدتاً هیالورونیک اسید) می‌باشد و روی‌هم‌رفته یک بافت حمایت کنندهٔ نرم را در اطراف رگهای خونی به‌وجود می‌آورند (۱). سلول‌های مزانشیمی بنیادی مشتق از بند ناف (WJ-MSCs) سلول‌های شبه فیبروبلاستی هستند که دارای ویژگی-های نظیر چسبندگی به سطوح پلاستیک، مارکرهای سطحی ویژهٔ سلولهای مزانشیمی و نیز قابلیت تمایز به دودمان‌های مختلف از جمله استئوسیت (۲،۳)، آدیپوسیت (۳،۴)، کندروسیت(۲)، میوسیت اسکلتی(۴)، هپاتوسیت (۵)، کاردیومیوسیت(۲، ۳) و سلول‌هایی با فنوتیپ عصبی (۶-۸) می‌باشند.

بند ناف انسان یکی از منابع جایگزین بالقوهٔ سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. WJ-MSCs همانند سایر منابع سلول‌های مزانشیمی به دلیل دارا بودن ویژگی‌های منحصر به فرد مثل: قابلیت خود نوزایی، پلاستیسیتی بالا، تعدیل پاسخ‌های ایمنی و انعطاف‌پذیری برای اصلاح ژنتیکی، منبع سلولی ایده‌آل و امیدبخشی برای پزشکی ترمیمی می‌باشند (۹). همچنین WJ-MSCs به دلیل دسترسی آسان، روش برداشت غیر تهاجمی برای اهدا کنندگان و خطر پایین آلودگی‌های ویروسی و امکان تکثیر در مقیاس بالا نسبت به سایر سلول‌های بنیادی مزانشیمی گزینهٔ مناسب‌تری جهت تحقیقات در زمینهٔ تمایز و در نهایت استفادهٔ کلینیکی برای سلول درمانی محسوب می‌شوند. همچنین از آنجایی‌که بند ناف معمولاً به عنوان ضایعات کلینیکی در نظر گرفته می-شود، استفاده از آن دارای مشکلات اخلاقی و نیز محدودیت تهیهٔ نمونه نمی‌باشد (۸، ۹).

MSCs می‌توانند اثر مهارگری ایمنی از طریق اثر بر همهٔ عوامل مؤثر بر ایمنی در شرایط *in vitro* و *in vivo* داشته باشند(۱۰،۱۱). MSCs انسانی سطوح پایینی از آنتی-ژن‌های کمپلکس سازگاری بافتی (MHC) کلاس I را بیان می‌کنند و MHC کلاس II و مولکول‌های هم تحریکی نظیر CD40, CD80 و CD86 را بیان نمی‌کنند. این ویژگی‌ها MSCs را در برابر تجزیهٔ آلوواکنشی که به‌وسیلهٔ سلول‌های کشنده طبیعی (NK) میانجیگری می‌شود، حفاظت می‌کند. MSCs می‌توانند در شرایط *in vitro* و *in vivo* مهار تکثیر سلولهای T و مهار تمایز سلول‌های دندریتیک را القا کنند، همچنین تکثیر، مهاجرت و تولید ایمنوگلوبولین سلول‌های B را تعدیل نمایند. این سلول‌ها می‌توانند عملکردهای سلول NK بر علیه HLA کلاس I را مهار کنند و به این ترتیب باعث کاهش حساسیت نسبت به سلول‌های NK شوند(۱۲،۱۳). بنابراین با توجه به قابلیت این سلول‌ها در تعدیل سیستم ایمنی و امکان کاهش رد پیوند چشم‌انداز روشنی در استفاده‌های کلینیکی در درمان بسیاری از بیماری‌ها وجود دارد (۱۴).

مطالعات آزمایشگاهی متعددی در جهت بررسی پتانسیل تمایزی و درمانی این سلول‌ها در بیماری‌های متعدد از جمله بیماری‌های نورولوژیکی، کبدی، قلبی عروقی، پارکینسون، ضایعات طناب عصبی، دیابت و غیره صورت گرفته است(۹، ۱۴و ۱۵). با توجه به روش‌های نوین درمان و تمایل برای توسعهٔ پزشکی ترمیمی جداسازی، شناسایی ویژگی‌های اختصاصی و دست‌یابی به روش‌های مناسب جهت تکثیر این سلول‌ها در مقیاس بالا از اهمیت بسیاری

برخوردار است. روش‌های آنزیمی متعدد بر پایهٔ استفاده از کلاژناز برای جداسازی این سلول‌ها استفاده شده است. همچنین استفاده از تریپسین و آنزیم‌های دیگر نظیر هیالورونیداز اغلب به همراه کلاژناز در مطالعات مختلف صورت گرفته است که در آن‌ها زمان انکوبه کردن سلول‌ها با آنزیم و میزان استفاده از آنزیم متفاوت است (۱۶،۴ و ۱۷). محققان متعددی استفاده از روش‌های غیر آنزیمی را جهت جداسازی این سلول‌ها به کار برده و توصیه می‌کنند (۱۸، ۱۹).

هدف ما در این تحقیق ارایهٔ روشی آسان، کاربردی و مطمئن جهت تولید سلول‌های مزانشیمی ژل وارتون بند ناف انسانی است.

روش بررسی

جداسازی ژل وارتون از بند ناف

نمونه‌های بند ناف بلافاصله پس از زایمان نوزادان Full term بیمارستان امام خمینی (ره) شهر اهواز و پس از کسب رضایت مادر جمع‌آوری شد. به منظور جلوگیری از خطر آلودگی‌های میکروبی زایمان‌های سزارین توصیه می‌شود. تمامی مراحل کار در شرایط استریل انجام شد. حدود ۱۵ سانتی‌متر از هر بند ناف در ناحیهٔ نزدیک به جفت جدا شده و پس از تخلیهٔ خون موجود در رگ‌ها و شست‌و-شو توسط نرمال‌سالین در محلول نگه‌دارنده که نرمال سالین حاوی ۲۰۰U/ml پنی‌سیلین و ۲۰۰ µg/ml استرپتومایسین بوده، در شرایط دمایی ۴°C به آزمایشگاه منتقل شدند. تمامی مراحل کار در آزمایشگاه در زیر هود لامینار کلاس ۲ صورت گرفت. ابتدا بند ناف توسط PBS، دوبار شست-وشو داده شده و به کمک اسکالپل به قطعات ۳ تا ۵ سانتی-متری تبدیل گردید. با ایجاد یک برش طولی در هر قطعه می‌توان پردهٔ آمنیوتیک را به آرامی جدا کرد. تشخیص رگهای خونی از ژل وارتون به دلیل بافت متفاوت آنها به راحتی امکان‌پذیر است. به کمک پنس و اسکالپل و ایجاد برش‌های طولی در اطراف رگ‌ها می‌توان آنها را از بافت اطراف بیرون کشید. به این ترتیب بافت موکوسی باقیمانده، ژل وارتون خواهد بود.

جداسازی سلول‌ها با روش Explant

در این روش بایستی بافت ژل وارتون را به قطعات گرد و کوچک با اندازهٔ ۵-۳ میلی‌متر و وزن ۲۰-۱۰ میلی‌گرم تبدیل کرد. سپس لبه‌های ریش ریش هر قطعه را بایستی به کمک اسکالپل برید، به‌طوری‌که قطعاتی گرد با لبه‌های صاف به‌دست آید. پس از شست‌وشو در PBS تعداد ۵-۷ قطعهٔ کوچک بافتی را درون هر فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی قرار داده و به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شود. به این ترتیب بیشترین میزان چسبندگی بین قطعات بافتی و کف فلاسک فراهم می‌شود. بعد از انکوباسیون، به هر فلاسک ۳ml محیط کشت DMEM-HG حاوی FBS ۱۵٪ و ۲mM L-Glutamine اضافه شود.برای جلوگیری از شناور شدن قطعات بایستی بخش بالایی هر قطعه خارج از محیط کشت قرار گیرد. فلاسک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C و ۵٪CO_2 انکوبه شده و سپس محیط کشت آن‌ها با دقت و به آرامی تعویض شود. ۷-۵ روز بعد سلول‌های کوچک در اطراف قطعات قابل رؤیت است. به مدت ۷ روز دیگر بایستی تکه‌های بافتی در فلاسک‌ها نگه داشته شوند و محیط کشت آنها یک روز در میان تعویض گردد. بعد از برداشتن قطعات بافتی به سلول‌های آزاد شده اجازه رشد داده تا به تراکم مناسب برسند. سلول‌هایی را که به تراکم مناسب رسیده‌اند را شست‌وشو داده و با اضافه کردن ۱ml تریپسین به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شوند. با اضافه کردن ۶ml محیط کشت (DMEM/HG به همراه ۱۵٪FBS) به هر فلاسک

تریپسین خنثی شده و تراکم سلولی یکنواخت خواهد شد (پاساژ در جا، P_0) و فلاسک‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شوند. روز بعد محیط کشت تازه به سلول‌ها اضافه شود و بعد از رسیدن به تراکم ۹۰٪-۸۰٪ سلول‌ها پاساژ داده شوند.

تمایز WJ-MSCs به سلول‌های چربی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون با تراکم ۳۰۰۰ سلول در هر سانتی‌متر مربع در صفحه‌های ۶ خانه کشت داده شدند. وقتی تراکم سلول‌ها به ۹۰٪ رسید، به مدت ۲۱ روز محیط کشت تمایزی به سلول‌ها اضافه شد. محیط کشت القاءکنندهٔ آدیپوژنیک شامل DMEM-LG حاوی ۱۰٪FBS، ۱۰۰ nM Dexamethazone، ۰/۰۵ nM L-Ascorbic acid 2-phosphate و ۵۰µg/ml Indomethacine می‌باشد. محیط کشت القاءکننده آدیپوژنیک هر ۳ روز یک‌بار تعویض شد. بعد از ۲۱ روز تشکیل واکوئل‌های چربی با استفاده از رنگ‌آمیزی Oil Red O بررسی گردید. بعد از تخلیهٔ محیط کشت، سلول‌ها دوبار با PBS شست‌وشو داده شدند و سپس باformalin ۱۰٪ به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. پس از برداشت فرمالین ۲ml رنگ Oil Red O به مدت ۵ دقیقه سلول‌ها اضافه شد. سپس سلول‌ها را شست‌وشو داده و با استفاده از میکروسکوپ اینورت فاز کنتراست مشاهده شدند. همچنین یک صفحهٔ کشت حاوی سلول به مدت ۲۱ روز با محیط کشت پایه (DMEM-LG به همراه FBS ۱۵٪) به عنوان گروه کنترل تیمار و سپس رنگ‌آمیزی گردید.

تمایز WJ-MSCs به سلول‌های استخوان

همانند روش تمایز به چربی، در این روش نیز سلول-های پاساژ ۳ در صفحه‌های کشت ۶ خانه در تراکم ۳۰۰۰ سلول در هر سانتی‌متر مکعب کشت داده شدند. پس از رسیدن به تراکم ۹۰٪ سلول‌ها با محیط القاءکننده استئوژنیک که شامل DMEM-HG به‌همراه ۱۰٪FBS، ۱۰ nM Dexamethazone، ۱۰ nMβ-glycerophosphate و ۰/۰۵ nM L-ascorbic acid-2-phosphates بود، به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. همچنین گروه کنترل با محیط کشت پایه هم در نظر گرفته شد. بعد از ۲۱ روز سلول‌ها توسط Alizarin Red S به منظور ارزیابی تشکیل رسوب کلسیم رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ اینورت فاز کنتراست مشاهده شدند. در گروه کنترل سلول‌ها به مدت ۲۱ روز فقط محیط پایه شامل DMEM-HG به همراه ۱۰٪FBS دریافت کردند.

فلوسایتومتری

از یک مارکر سطحی خاص سلول‌های مزانشیمی (CD73) و یک مارکر خاص سلول‌های اندوتلیال (CD31) استفاده شد. برای این منظور حدود یک میلیون سلول برای شناسایی هر مارکر استفاده شد. سلول‌های جدا شده از کف فلاسک را که به‌وسیلهٔ سانتریفوژ رسوب داده شده بود، با ۲ml PBS حاوی ۵٪ FBS دوباره معلق کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C با ۵ µl آنتی‌بادی انسانی علیه هر مارکر در تاریکی انکوبه شد. سپس سلول‌ها را سانتریفوژ کرده و رسوب سلولی را با ۱ml PBS دوباره معلق کرده و به‌وسیلهٔ دستگاه فلوسایتومتری Dako Galexy ارزیابی شدند. نتایج به‌دست آمده توسط نرم‌افزار FlowJo نسخهٔ ۸٫۸٫۷ آنالیز شدند.

استخراج RNA ، رونویسی معکوس

با استفاده از کیت Rneasy Mini kit (Qiagen) تمامی RNA سلول‌های مزانشیمی ژل وارتون استخراج شد. غلظت RNA استخراج شده توسط دستگاه NanoDrop (Thermo Scientefic, Nanodrop 2000c) اندازه‌گیری شد. برای تولید cDNA، از کیت

ساخت cDNA محصول شرکت Fermentas استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ng RNA، 0.5 µl oligo (dT) primer (1µg/µl) و آب فاقد نوکلئاز تا حجم نهایی ۱۲µl را ترکیب کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C انکوبه می‌کنیم. در ادامه ۴ µl 5x Reaction Buffer ، ۱ µl Ribolock RNase Inhibitor (20 U/µl) و ۲10 mM dNTP µl را ترکیب کرده و ۱ µl Reverse Transcriptase (200 U/µl) را به آن اضافه کرده تا حجم نهایی به ۲۰ µl برسد. نمونه‌های تهیه شده را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲°C انکوبه کرده و در نهایت واکنش با انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۷۰° C به مدت ۵ دقیقه پایان می‌یابد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Real-Time PCR)

Real-time PCR با استفاده از دستگاه Applied Biosystems Step One Plus™ Real-Time PCR Systems انجام شد. پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) و Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) برای انجام واکنش‌های real-time PCR استفاده شد. هر واکنش PCR شامل ۷/۵ µl از SYBR Green PCR master mix، ۰/۴µl از پرایمرهای پیشرو و پیرو (با غلظت ۱۰ mM)، ۳/۷µl آب فاقد نوکلئاز و ۳ µl از cDNA الگو (در مجموع ۱۵ µl) بود. فعالیت اولیهٔ آنزیم در ۹۵°C به مدت ۱۵ دقیقه آغاز شد و با ۵۰ سیکل، هر کدام شامل مراحل Denaturation در دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، Annealing در دمای ۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه و Extension در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه ادامه یافت. آنالیز Melting Curve به صورت ۹۵°C (۱ دقیقه)، ۶۰°C (۳۰ ثانیه) و ۹۵°C (۳۰ ثانیه) انجام شد. بیان نسبی ژن‌ها به‌وسیلهٔ روش CT مقایسه‌ای آنالیز شدند. سطوح بیان ژن‌ها با ژن House-Keeping (GAPDH) نرمالیزه شدند. آنالیز واریانس (ANOVA) برای بررسی اختلاف معنادار بین نمونه‌ها و گروه کنترل استفاده شد. آنالیز آماری به‌وسیلهٔ نسخهٔ ۱۴ SPSS انجام شد.

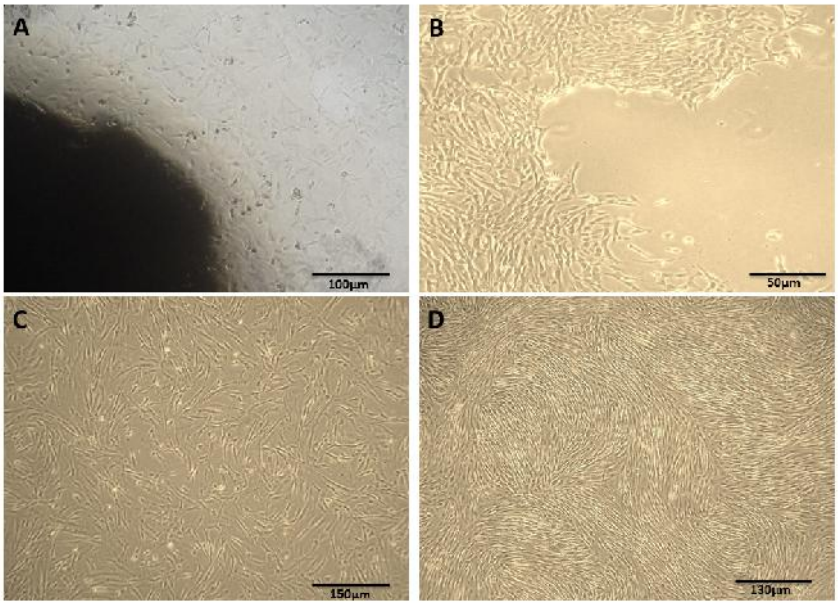
یافته ها

بعد از قرار دادن قطعات بافتی در فلاسک‌های کشت، اولین جوانه‌های سلولی ۵ الی ۷ روز بعد در اطراف بافت قابل مشاهده بود. سلول‌ها ابتدا گرد و سپس تغییر شکل داده و تبدیل به سلول‌های دوکی با آرایش گردابی می‌شوند. در روز ۱۴ که تکه‌های Explant از فلاسک‌ها خارج شد، در اطراف هر تکه تعداد بسیاری سلول با تراکم بالا مشاهده شد (شکل ۱).

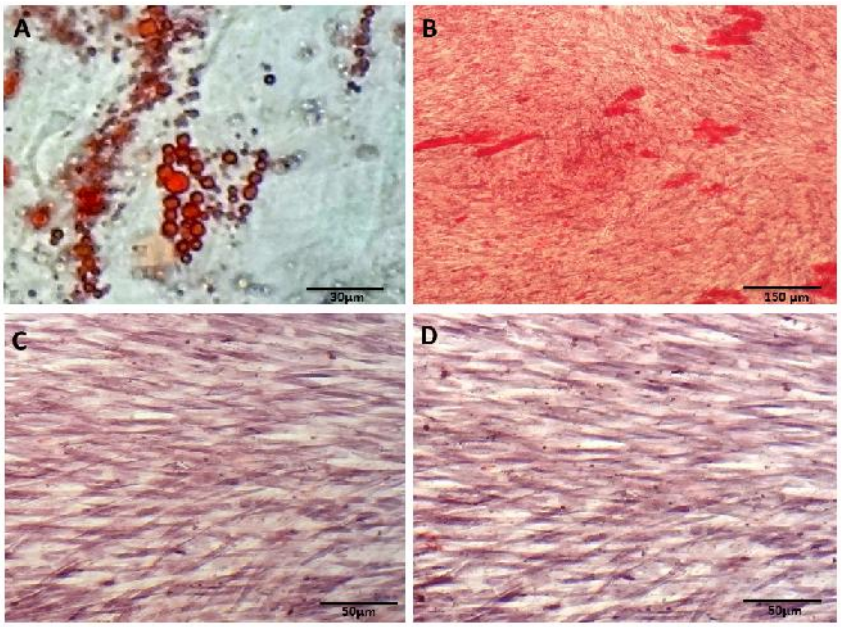
رنگ‌آمیزی Alizarin Red S رسوب کلسیم در سلول‌های تیمار شده با مواد القاءکننده، استئوژنیک را نشان داد. همچنین رنگ‌آمیزی سلول‌ها با Oil Red O وجود واکوئل‌های چربی را در سلول‌های تمایز یافته به بافت چربی را اثبات کرد. در گروه‌های کنترل (تیمار نشده) رسوب کلسیم و واکوئل‌های چربی مشاهده نشد (شکل ۲).

نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌ها، مارکر خاص سلول‌های مزانشیمی(CD73) را به خوبی بیان کرده اما مارکرهای خاص سلول‌های اندوتلیال (CD31) را بیان نکرده‌اند (شکل ۳).

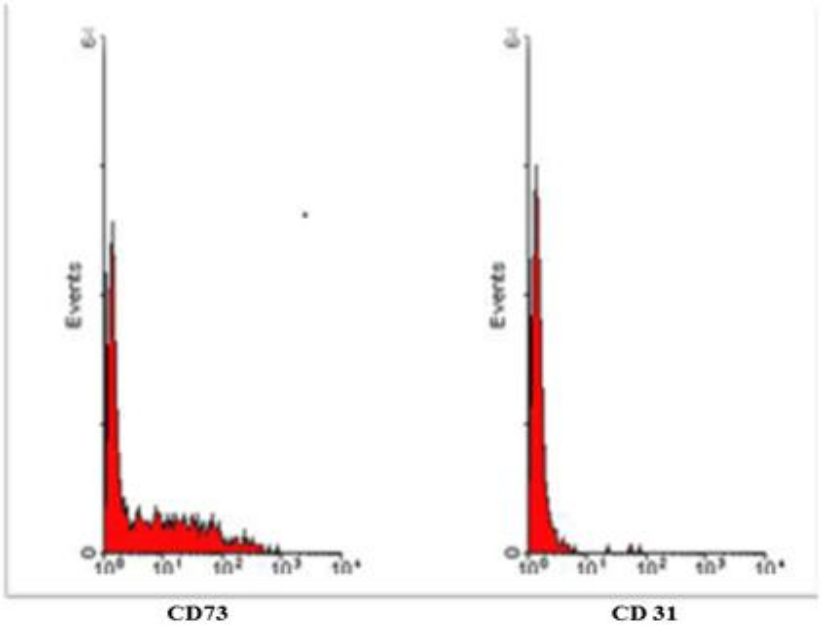
با توجه به شکل ۴، بیان ژن *Nanog* در WJ -MSCs نسبت به گروه کنترل (بافت تمایز یافته) ۳ برابر افزایش داشته است و این افزایش از لحاظ آماری دارای اختلاف معنادار می‌باشد. همچنین ژن *Oct4* نیز نسبت به گروه کنترل ۳/۶ برابر افزایش داشته که این افزایش از لحاظ آماری معنادار است.



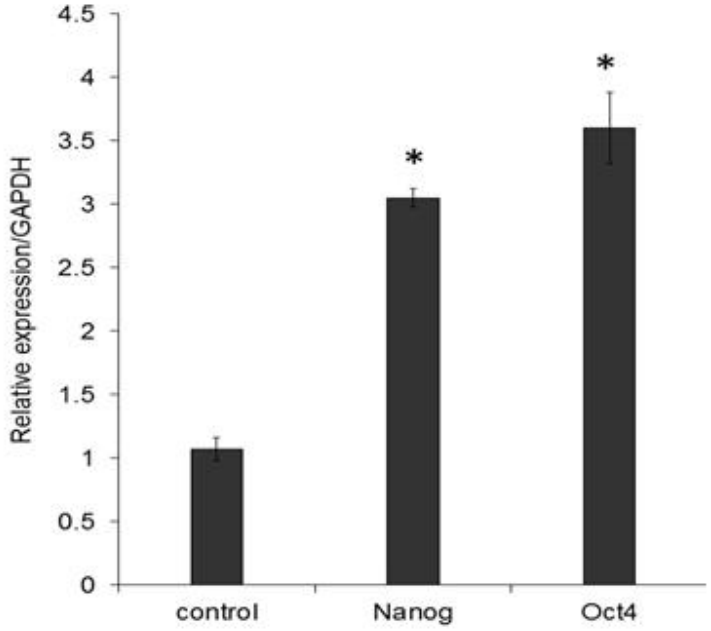
شکل۱: سلول‌های مزانشیمی مشتق از ژل وارتون، A- قطعهٔ بافتی و سلول‌های خارج شده از بافت، B-سلول‌ها پس از برداشت قطعهٔ بافت، C-سلول‌ها پس از پاساژ درجا، D- تراکم سلولی و آرایش گردابی سلول‌ها



شکل ۲: تمایز WJ-MSCs به استخوان و چربی، A-واکوئل‌های چربی در محیط آدیپوژنیک که با رنگ‌آمیزی Oil Red O قابل مشاهده بودند. B-رسوب کلسیم در محیط استئوژنیک که با رنگ‌آمیزی Alizarin Red S قابل مشاهده بودند. C و D- گروه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده) رنگ‌آمیزی شده که فاقد واکوئل‌های چربی و رسوب کلسیم هستند.



شکل۳: آنالیز فلوسایتومتری آنتی‌ژن‌های سطحی WJ-MSC، سلول‌ها مارکر CD73 را بیان کرده اما مارکر CD31 را بیان نکردند.



شکل ۴: آنالیز Real time PCR ، بیان نسبی فاکتورهای نسخه‌برداری جنینی اولیه (Nanog وOct4)، بیان نسبی هر دو ژن Nanog و Oct4 نسبت به گروه کنترل (بافت تمایز یافته) به طور معناداری افزایش یافته است.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Real time PCR

Gene	Strand	Sequence(5'-3')
GAPDH	F	TGGTATCGTGGAAGGACTCA
	R	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
Nanog	F	CCTTGGCTGCCGTCTCTGGCT
	R	AGCAAAGCCTCCCAATCCCAA
Oct4	F	CGACCATCTGCCGCTTTGAG
	R	CCCCCTGTCCCCCATTCCTA

بحث

با توجه به اهمیت سلول‌های بنیادی در روش‌های نوین پزشکی و سلول درمانی، تولید این سلول‌ها در مقیاس بالا و ضرورت وجود یک منبع سلولی مناسب مورد توجه محققان و دانشمندان است(۲۰). از آنجا که بند ناف یک منبع سلولی مناسب، در دسترس و فاقد مشکلات اخلاقی و محدودیت تهیه است، یافتن یک روش آسان و مناسب جهت جداسازی سلول‌های آن از اهمیت بسیاری برخوردار است. مطالعات مختلف روش‌های متفاوتی از جمله روش آنزیمی (۱۶، ۱۷)، روش آنزیمی مکانیکی (۲۱) و روش xplant (۱۸، ۱۹) را معرفی کرده‌اند. ما در این تحقیق سعی بر این داشتیم تا با انجام روش Explant و ارایهٔ تمامی نکات و جزئیات مربوط به انجام آن، این روش را به عنوان یک روش آسان، مقرون به‌صرفه و کاربردی معرفی کنیم.

در این تحقیق به موازات روش Explant از روش آنزیمی هم استفاده شد، اما نتایج نشان داد که سلول‌های استخراج شده با روش Explant به دلیل عدم استفاده از آنزیم دچار آسیب‌دیدگی نشده و رشد مناسب‌تری دارند. به این ترتیب روش Explant را به عنوان یک روش مطمئن، آسان و با عوارض کمتر نسبت به روش آنزیمی ارائه می‌دهیم. اساس روش Explant بر مهاجرت سلول‌ها از بافت به محیط اطراف است، به این ترتیب که قطعات کوچک بافتی را در محیط کشت قرار داده و به سلول‌ها اجازه می‌دهیم که از بافت خارج شوند. مهم‌ترین عامل در خروج سلول‌ها از قطعات بافتی عدم جابه‌جایی تکه‌های بافتی در ظرف کشت است. چسبیدن بافت به کف ظرف کشت برای شروع مهاجرت ضروری به نظر می‌رسد. نتایج نشان داد، میزان خروج و رشد سلول‌ها در بند ناف‌های مختلف متفاوت است. خروج سلول از بند ناف‌های نوزادان Full-term با سرعت بیشتری انجام می‌شود. اولین پاساژ (درجا) نقش مؤثری در یکنواخت کردن پراکنش سلول‌ها و تحریک تقسیم سلولی آن‌ها دارد. همچنین اندازهٔ قطعات و عدم وجود لبه‌های ریش ریش نقش بسیار مؤثری در خروج سلول‌ها خواهد داشت. وجود لبه‌های ریش ریش به دلیل حرکت و ایجاد جریان در اطراف قطعهٔ بافتی مانع خروج سلول‌ها خواهد شد.

در سال ۲۰۰۶ کمیتهٔ بافت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی ISCT، سه معیار برای تعریف سلول‌های بنیادی مزانشیمی تعیین کرد که شامل: چسبندگی به ظروف پلاستیکی کشت، بیان آنتی‌ژن‌های سطحی مخصوص و پتانسیل چند توانی می‌باشد (۲۲). بر این اساس سلول‌های جداسازی شده از ژل وارتون با سه معیار تعریف شده مطابقت داده شدند. در ابتدا با کشت این سلول‌ها در ظروف

کشت پلاستیکی و توانایی چسبندگی آن‌ها به سطح اولین ویژگی تأیید شد. از طرف دیگر با توجه به وجود واکوئل-های چربی و رسوب کلسیم در سلول‌های ژل وارتون به سلول‌های تمایز یافته به بافت چربی و استخوان، توان تمایز به دودمان‌های مختلف سلولی و قابلیت چندتوانی این سلول‌ها به اثبات رسید. بررسی مارکرهای مخصوص نشان داد، CD73 که مخصوص سلول‌های مزانشیمی است در این سلول‌ها بیان می‌شود، در صورتی که CD31 که در سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود در این سلول‌ها دیده نشد.

همچنین بررسی بیان فاکتورهای نسخه‌برداری جنینی اولیه *Nanog* و *Oct4* افزایش معنادار بیان این ژن‌ها را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارتون اثبات کرد که نشان-دهندهٔ چندتوانی و ظرفیت خودنوزایی بالا در این سلول-هاست.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق تلاش ما بر جداسازی سلول‌های مزانشیمی با یک روش کارآمد و آسان با کم‌ترین آسیب برای سلول‌ها و تشریح مفصل مراحل کار بود. همچنین اثبات توان تمایزی و خود نوزایی سلول‌ها به عنوان ویژگی-های کلیدی جهت استفاده این سلول‌ها در کاربردهای درمانی است. در مجموع سلول‌های مزانشیمی ژل وارتون را به دلیل دارا بودن ویژگی‌های منحصر به فرد نظیر عدم وجود مشکلات اخلاقی در روش تهیه و بی‌خطر بودن روش‌های برداشت برای اهداکننده، می‌توان یک منبع قابل اطمینان سلول‌های بنیادی جهت کاربردهای کلینیکی و تحقیقاتی در نظر گرفت.

منابع

1-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.

2-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.

3-Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. Int J Mol Med 2006;18(6):1089-96.

4-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.

5-Anzalone R, Lo Iacono M, Loria T, Di Stefano A, Giannuzzi P, Farina F, et al. Wharton's Jelly mesenchymal stem cells as candidates for beta cells regeneration: extending the differentiative and immunomodulatory benefits of adult mesenchymal stem cells for the treatment of type 1 diabetes. Stem Cell Rev 2011;7(2):342-63.

6-Ma L, Feng XY, Cui BI, Law F, Jiang XW, Yang LY, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. Chin Med J)Engl) 2005;118(23):1987-93.

7-Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells 2007;25(2):319-31.

8-Fan CG, Zhang QJ, Zhou JR. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. Stem Cell Rev 2011;7(1):195-207.

9-Fong CY, Chak LL, Biswas A, Tan A, Gauthaman J, Chan K, et al. Human Wharton's Jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. Stem Cell Rev 2011;7(1):1-16.

10-Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? Trends Immunol 2007;28(5):219-26.

11-Herrero C, Pérez-Simón JA. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. Braz J Med Biol Res 2010;43(5):425-30.
12-Sensebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application. Vox Sang 2010;98(2):93-107.
13-Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. Eur J Immunol 2006;36(10):2566-73.
14-Yang S, Huang S, Feng C, Fu X. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: strategies, challenges, and potential for cutaneous regeneration. Front Med 2012;6(1):41–7.
15-Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. Cell Prolif 2011;44 Suppl 1:60–9.
16-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.
17-Can A, Balci D. Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. Methods Mol Biol 2011;698:51-62.
18-Koliakos I, Tsagias N, Karagiannis V. Mesenchymal cells isolation from Wharton's jelly, in perspective to clinical applications. J Biol Res 2011;16:194-201.
19-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.
20-Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. Placenta 2011;32 Suppl 4:311-5.
21-Tong CK, Vellasamy S, Tan BC, Abdullah M, Vidyadaran S, Seow HF, et al. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination of enzymatic and mechanical disassociation method. Cell Biol Int 2011;35(3):221-6.
22-Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular therapy position statement. Cytotherapy 2006;8(4):315-7.

Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly

Mahmoud Hashemitabar[1], Elham Allahbakhshi[2*], Darioush Bijan Nezhad[3], Fereshteh Nezhad Dehbashi[4], Saeed Azandeh[3]

1-Associate Professor of Anatomy.
2-PhD in Biology.
3-Assistant Professor of Anatomy.
4-Ph.D. student of Tissue Engineering.

1,3,4-Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
2-Department of Biology, College of Science, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Fars, Iran.

**Corresponding author:*
Elham Allahbakhshi; Department of Biology, College of Science, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Fars,Iran.
Tel:+989161137679
Email: eallahbakhshi@yahoo.com

Abstract

Background and Objectives: Mesenchymal stem cells (MSCs).derived from Wharton's Jelly umbilical cord like other MSCs sources are ideal and promising sources of MSCs for regenerative medicine due to a unique set of properties such as the capacity for self-renewal, high plasticity and multi lineage differentiation, immunomodulatory function and flexibility of genetic modification.

Subjects and Methods: MSCs were isolated from Wharton's Jelly umbilical cord via cell migration of tissue piece (explant) method and differentiated into different lineages. Flow cytometric analysis and real time PCR technique were used for identification and determination of their multi-potential capacity, specific markers and self-renewal ability.

Results: MSCs were successfully isolated from umbilical cord. The results showed, these cells differentiated into adipocyte and osteoblast in appropriate inductions. Flow cytometry analysis showed the expression of CD73 but not that of CD31. Also real time PCR analysis showed significant expression of Nanog and Oct4 genes in these cells than in differentiated tissues.

Conclusion: Regarding to new methods of treatment, isolation, characterization and generation of MSCs in large scale are of great importance. Wharton's Jelly MSCs could be a potential promising source for cell therapy and also research studies.

Keywords: Wharton's Jelly, Mesenchymal stem cells, Umbilical cord.

►*Please cite this paper as:*
Hashemitabar M, Allahbakhshi E, Bijan-Nejad D, Nezhad Dehbashi F, Azandeh S. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly. Jundishapur Sci Med J 2014;13(2):135-145

Received: Feb 17, 2013 **Revised: Sep 29, 2013** **Accepted: Jan 15, 2014**