جداسازی سلول های بنیادی چسبنده CD 133 مثبت، از سلول های سوماتیک خون بند ناف (USSC) و معرفی آن بعنوان یک جمعیت سلولی نادر و ارزشمند در مهندسی بافت

سعید حیدری کشل[1،3]، مصطفی رضایی طاویرانی[2*]، مریم ابراهیمی[2]، رضا روز افزون[3]، فریده فرزان فر[4]،هدی جهانی[5]

1)کمیته پژوهشی دانشجویی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
2)مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
3)گروه مهندسی بافت و سلول درمانی، دانشکده فن آوریهای نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
4)مرکز تحقیقات سرطان، بیمارستان امام خمینی (ره) ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
5)گروه فیزیولوژی ،دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: **تاریخ پذیرش:**

چکیده

مقدمه: سلول های بنیادی، دارای توانایهای بسیار در ترمیم بافت های آسیب دیده می باشند. سلول های بنیادی مزانشیمی از بافتهایی نظیر مغز استخوان، خون محیطی و بافت های دیگر جداسازی شده اند. سلول های بنیادی CD133مثبت دارای ویژگیهای پلوریپوتنسی میباشند و کاندید قدرتمند در سلول درمانی نوین محسوب می شوند.

مواد و روش ها: از تعداد 30 نمونه خون بند ناف ، سلول های تک هسته ای مورد جداسازی و کشت قرار گرفتند. سلولهای جداسازی شده در پاساژ 3 را با استفاده از ستون MACS CD133 مورد جداسازی ثانویه قرار داده و سلول های بدست آمده را کشت و از نظر مورفولوژی و بیان مارکر های سطحی بنیادی نظیر CD105, CD90, CD34 مورد ارزیابی قرار گرفتند. انالیز کاریوتایپ نیز برای سلول های بنیادی CD133 انجام پذیرفت.

یافته های پژوهش: سلولهای بنیادی مزانشیمی از 5 نمونه مورد جداسازی موفقیت آمیز قرار گرفتند. در آنالیز فلوسیتومتری سلول های چسبنده، میزان بیان مثبت مارکر های بنیادی سطحی: CD105:78.35%,CD90:82.32%, CD34:8.56, CD 133: 25.33% را شامل میشدند و این در حالی بود که در سلول های CD133 مثبت، میزان بیان مارکرهای CD105;55.63%, CD90; 43.25%, CD34:18.2% میباشد. مورفولوژی سلول های CD133 شبیه سلولهای مزانشیمی و به حالت دوکی فرم بوده و دارای کاریوتایپ 46XX طبیعی بودند.

بحث و نتیجه گیری: سلولهای بنیادی جداسازی شده از خون بند ناف، دارای جمعیت ناهمگونی از سلول ها بوده و سلول های جداسازی شده بر اساس مارکر CD133 از نظر بیان دیگر مارکرها سلول های بنیادی همگن بوده ولی بیان 18.2% مارکر هماتوپویتیک CD34 در سلول های بنیادی CD133 مثبت میتواند بیانگر تمایل این سلول در فرایند های خونسازی باشد. درصد پایین این سلول ها در قیاس با دیگر سلولهای بنیادی خون بند ناف بیانگر ابتدای تر بودن انها نیز میتواند باشد.

واژه های کلیدی: سلول بنیادی، خون بند ناف، فایکول، مارکر سطحی، فلوسیتومتری

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

Email: rezaei.tavirani@ibb.ut.ac.ir

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

مقدمه

به طور کلی سلولهای بنیادی دارای دو منشاء جنینی (embryonic) و بزرگسالان (adult) هستند. سلولهای بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی (inner cell mass) جنین در مرحله بلاستوسیست به دست می آیند. دسته دیگر، سلولهای بنیادی بزرگسالان هستند که در بسیاری از بافتهای تخصص یافته بدن از جمله مغز، مغز استخوان، کبد، پوست، لوله گوارش قرنیه و شبکیه چشم و حتی پالپ عاج یافت می شوند (۱،۲،۴). در بزرگسالان در هنگام جراحت و حتی در غیاب آن، به طور مداوم این سلولها فعال هستند. قبلا دانشمندان فکر می کردند که سلولهای بنیادی بزرگسالان، تنها سلولهای همان بافت را ایجاد می کنند، اما امروزه اعتقاد بر این است که انعطافپذیری این سلولها بیش از آن میباشد و این سلولها می توانند انواع دیگری از سلولها را بسازند(3). برای مثال سلولهای بنیادی بزرگسالان مشتق از مغز استخوان، به غیر از آن که می توانند سلولهای خونی و سلولهای ایمنی را بسازند، قادرند به صورت یا تمایز مستقیم ، انواع دیگری از سلولها نظیر سلولهای ماهیچه اسکلتی، میکروگلیا و آستروگلیا در مغز و هپاتوسیتهای کبدی را بسازند (۵،۷). براساس این مشاهدات پیشنهاد شده است که ممکن است این سلولها در طب پیوند قابل کاربرد باشند . سلولهای بنیادی و بخصوص سلولهای بنیادی جنینی در مطالعات زیست شناسی تکوینی، طب پیوند، داروسازی و ناهنجاری شناسی و تولید موشهای ترانس ژن اهمیت دارند. سلولهای بنیادی دارای کاربردهای گوناگونی هستند که مشخص ترین آنها، توان بالقوه این سلولها در درمان بعضی بیماریهاست. مطالعه مدلهای حیوانی نشان داده است که پیوند سلولهای بنیادی جنینی و یا سلولهای بزرگسالان در درمان موفقیت آمیز بسیاری از بیماریهای مزمن نظیر پارکینسون، دیابت و آسیب نخاعی، دیستروفی ماهیچه ای دوشن، نقصان کبدی یا قلبی و استخوانی اهمیت دارد. اگرچه در سالهای اخیر پیشرفت قابل ملاحظه ای در طب مرتبط با پیوند انسان بوجود آمده است اما هنوز موانع زیادی در این مسیر وجود دارد (۶،۸). مانع اصلی در این زمینه بکارگیری داروهای سرکوب کننده ایمنی برای جلوگیری از دفع بافت پیوندی و کمی مردگان دهنده اندامها است. در این راه، سلولهای بنیادی جنین انسانی، منبع نامحدودی از سلولها را فراهم می کنند. نخستین نکته در توسعه موفق درمان بیماریهای انسانی با سلولهای بنیادی ایجاد شرایط مناسب برای تمایز سلولی به سلول دلخواه و خالص سازی آن از دودمان جمعیت سلولی است. متأسفانه، سلولهای بنیادی جنینی به صورت جمعیت ناهمگنی از سلولها در شرایط آزمایشگاهی تمایز می یابند و این موضوع استفاده از آنها را محدود کرده است. ندرتا بکارگیری فاکتورهای رشد و یا شرایط کشتی خاص، امکان تولید یک نوع سلول به خصوص را فراهم کرده است (۹،۱۰). در حقیقت علیرغم افزودن فاکتورهای رشد خاص، سلولهای بنیادی جنینی انسانی گستره وسیعی از تجلی ژن ها را دارند (12 و 11). علاوه بر این؛ تنوع قابل توجهی در تمایز سلولی در کشتهای با فاکتورهای رشد یکسان دیده می شود. با توجه به این موضوع، استخراج یک جمعیت نسبتاً همگون انتخاب شده در مخلوطی از سلولها حائز اهمیت است. فعال کردن ژن مرگ سلولی در سلولهای بنیادی جنینی در مرحله نهایی تمایز، به عنوان راه دیگر، سبب مرگ سلولهای بنیادی باقیمانده و جلوگیری از ایجاد تومور پس از پیوند سلولهای تمایز یافته مشتق از سلولهای بنیادی جنینی می شود. در حقیقت در مطالعات کوتاه مدت معدودی که انجام شده است، مشخص شده که دودمان تمایز یافته پیوندی مشتق از سلولهای بنیادی موش به جوندگان بالغ سبب تومور قابل ملاحظه ای نشده است (11،20). اگر ایجاد تومور به حضور جمعیت سلولهای بنیادی بستگی داشته باشد، یک راه برای حذف سلولهای بنیادی باقیمانده از سلولهای تمایز یافته، احتمالا براساس انتخاب منفی سلولهای بیان کننده Oct-4 است. بدین معنی که هر سلولی که 4-Oct را در این زمان بیان می کند، بمیرد. با استفاده از انتخاب مثبت بر سلولهای تمایز یافته، نیز سلولهای تمایز نیافته را از بین می برد. مثلا در جمعیت سلولهای مولد انسولین، بکارگیری یک ژن مقاوم به آنتی بیوتیک تحت کنترل پروموتر انسولین و در فاز نهایی افزودن آنتی بیوتیک، سلولهای دیگر به غیر از سلولهای مولد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

انسولین را از بین می برد. برای جلوگیری ازدفع پیوند سلولهای مشتق از سلولهای بنیادی روشهای متعددی پیشنهاد شده است. اما متأسفانه، استفاده از داروهای سرکوب کننده ایمنی عوارض جانبی فراوانی دارد. در عوض امکان دستکاری ژنتیگی سلولهای بنیادی انسانی برای کاهش یا حذف دفع به واسطه ایمنی وجود دارد. به طوریکه به استفاده از داروهای سرکوب کننده ایمنی برای کل عمر نیاز نمی باشد. در تحقیق حاظر سلول های بنیادی CD 133 با تکنیک انتخاب مثبت از جمعیت سلول های بنیادی جداسازی شده است. با اشنایی با خصوصیات سلول های بنیادی واجد مارکر 133 میتوان علاوه بر آگاهی از نقش فیزیولوژیک آن در ریز محیط طبیعی، از آن به عنوان یک کاندید مجزا نیز در سلول درمانی استفاده نمود.

مواد و روش ها

نمونه خون بندناف:

نمونه خون بندناف در شرایط کاملاً استریل توسط کارشناس مامایی از خانم هایی که از زایمان کاملاً طبیعی دارند گرفته میشود و در لوله های فالکون 50 میلی لیتر که حاوی ضد انعقاد هپارین (500 IU) میباشند، جمع آوری , حجم نمونه خون بند ناف که بین 40 تا 50 میلی لیتر میباشد استفاده شد و از نمونه های کمتر از 40 میلی لیترباشد استفاده نشد. نمونه خون بندناف در دمای کمتر از $10^{\circ}C$ به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل شد.

جداسازی سلولهای تک هسته ای از نمونه خون بندناف:

برای جداسازی سلولهای تک هسته ای نمونه خون بندناف که حجمی حدود چهل تا پنجاه میلی لیتراست با نسبت یک به یک با بافر هنکس رقیق و با نسبتی حدود یک به دو تا یک به سه (فایکول: خون بندناف) روی فایکول برده شد. برای این کار از محلول فایکول با دانسیته 1/077 استفاده شد . بدین ترتیب که از محلول فایکول مقدار 3 تا 4 میلی لیتر در یک لوله فالکون 15 میلی لیتری ریخته، سپس سوسپانسیون سلولی را آرام به آن اضافه نموده و به مدت 40 دقیقه با دور 400G سانتریفوژ می شود بعد از اینکه زمان سانتریفوژ پایان یافت محتویات لوله فالکون به 4 قسمت مجزا از هم تقسیم می شود که از پایین به بالا عبارتند از:1-گلبولهای قرمز2- فایکول3- لایه سلولهای تک هسته ای4- پلاسما با برداشت لایه سلولهای تک هسته ای ، سلولها به حالت سوپانسیون در آورده شده و از نمونه خون بندناف جدا شدند.

جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمی و کشت آنها:

سلولهای تک هسته ای جدا شده از نمونه خون بندناف به صورت سوسپانسیون به یک فلاسک cm^2 25 که با فیبرونکتین پوشیده شده است و حاوی محیط DMEM و 20 درصد سرم جنین گاوی (FBS) 10M دکزامتازون و1000u/ml پنی سیلین و 0,1 mg استرپتومیسین و2 mM می باشد منتقل و در انکوباتور CO_2 5 درصد و دمای $37^{\circ}C$ و رطوبت 98 درصد قرار داده میشود. بعد از گذشت 3 روز محیط رویی را دور ریخته و محیط تازه اضافه می شود سلولهای بنیادی مزانشیمی به کف فلاسک چسبیده و تکثیر می شوند خالص و جداسازی می شوند.

برداشت سلولهای بنیادی مزانشیمی از فلاسک:

از آنجایی که سلولهای بنیادی مزانشیمی چسبیده هستند و به کف فلاسک می چسبند برای جداسازی آنها از کف فلاسک، ابتدا بایستی محیط کشت را به طور کامل برداشته و با استفاده از محلول PBS حاوی EDTA آن را شستشو داده، سپس آنزیم تریپیسین حاوی EDTA به فلاسک اضافه نموده و به مدت 5 دقیقه در انکوباتور قرار داده شود بعد از آن محیط کشت DMEM حاوی FBS به آن افزوده و بعد از پی پتاژ نمودن، سوسپانسیون سلولی به یک لوله فالکون 15 میلی لیتری انتقال داده شد. سوسپانسیون سلولی به مدت 10 دقیقه در دور 400G سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته و رسوب حاصل برای کشت مجدد به یک فلاسک $75cm^2$ منتقل میگرددد. بمنظور جداسازی سلول های CD 133 مثبت از ستون شرکت MACS (Militnery bio tech) استفاده شد. برای این منظور حدود 100 میکرولیتر آنتی بادی ضد CD133 نشاندار شده با ذرات آهن به سلول‌های تک هسته‌ای افزوده، سپس حدود 1 ساعت انکوباسیون در دمای اتاق انجام می‌شود. بعد از آن سانتریفیوژ به مدت 7دقیقه و در دور 400 G انجام می‌شود. پس از خارج کردن مایع رویی،

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

حدود 500 میکرولیتر PBS حاوی EDTA به رسوب سلولی اضافه شده و پیپتاژ تا حد یکنواخت شدن سوسپانسیون سلولی انجام می‌گیرد. حال سوسپانسیون سلولی از ستون (Magnetic MACS Miltenyi) (Activated Cell Sorting Biotech, Germany) و بر اساس دستورالعمل کیت عبور داده CD133از سایر سلول‌های تک هسته می‌شود و در محیط اختصاصی StemSpan رشد یافتند.

تعیین درصد زنده بودن سلولها (Viability test):

50 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با 50 میکرولیتر رنگ تریپان بلو (0/4 درصد) مخلوط کرده پس از 5 دقیقه، مقدار 20 میکرولیتر از این مخلوط را برداشته و با استفاده از لام نئوبار در خانه های مربوط به شمارش گلبول سفید، شمارش می شود. رنگ تریبان بلو در سلولهای مرده نفوذ کرده و آنها را آبی رنگ می کند اما سلولهای زنده رنگ نمی گیرند و بی رنگ می باشند درصد زنده بودن سلولها با استفاده از فرمول زیر بدست می آید.

$$\text{درصد زنده بودن سلولها} = \frac{\text{تعداد سلولهای زنده}}{\text{تعداد کل سلولهای زنده و مرده}} \times ۱۰۰$$

آنالیز فلوسایتومتری برای سلولهای بنیادی:

ابتدا سلولهای سلول های بنیادی مزانشیمی چسبنده خون بند ناف را تریپسینه کرده و مورد شمارش قرار داده در هر لوله تعداد 106 تا 105 سلول قرار داده و به مدت 1 ساعت درون آنکوباتور و روی rocker rotator قرار داده و سپس سلولها در دور 1000rpm به مدت 6 دقیقه سانتریفیوژ کرده و به رسوب سلولی حاصله ، سرم انسانی 3% اضافه نموده و مخلوط حاصل را 30 دقیقه در دمای اتاق قرارداده شد. سپس در دور 1000rpm و به مدت 6 دقیقه دوباره سلولها را سانتریفیوژ نموده و به رسوب سلولی حاصل PBS اضافه گردید ، مخلوط سلولی را از فیلتر (Nylon mesh) عبور داده، به هر لوله مقدار 100 میکرولیتر از آن اضافه شود. تعداد 106 - 105سلول را در $100\,\mu L$ از PBS به همراه آنتی بادی های-Anti CD105,Anti-CD90,Anti-CD34,Anti-CD34, و CD133و به مدت 45 دقیقه در $4^{\circ}C$ به دور ازنور نگهداری کرده، پس از شستشو، سلولها را در $100\,\mu L$محلول 1% پارافرم آلدیئد قرار داده سپس آنالیز فلوسایتومتری، روی آن انجام گردید.

آنالیز کاریوتایپ برای سلولهای سلول های بنیادی مزانشیمی چسبنده خون بند ناف :

ابتدا سلولها را برای مدت 4-3 ساعت با $0/1\ \mu g/ml$ کولسمید درون آنکوباتور قرار داده سپس سلولهای را تریپسینه کرده و 0/075M محلول KCl را به سلولها اضافه نموده و به مدت 20 دقیقه در دمای $37^{\circ}C$ و 5% Co2 درون آنکوباتور قرار داده شد. در مرحله بعد، متانول و اسید استیک را به نسبت 3 به 1 جهت فیکس کردن نمونه ها اضافه شده سپس سلولها را از ارتفاعی بر سطح لام گسترانیده و کروموزومها مورد آنالیز کاریوتیپ قرار گرفتند.

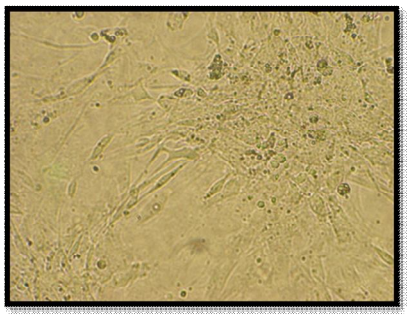
یافته های پژوهش

جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی چسبنده خون بند ناف انسانی از خون بند ناف انجام شد. این سلولها تا 50 پاساژ به طور پیوسته کشت داده شدند. سلول های بنیادی مزانشیمی چسبنده خون بند ناف از سرعت تکثیر بسیار بالایی برخوردار بوده بطوری که مرتبا نیاز به پاساژ دارند. میزان تکثیر و مورفولوژی این سلولها قبل از فریز کردن و بعد از خارج نمودن از فریز کاملاً یکسان و مشابه می باشند. در طی مراحل مختلف کار با سلول های بنیادی مزانشیمی چسبنده خون بند ناف(USSC) هیچ گونه علامتی مبنی بر آلودگی این سلولها با ویروسها یا مایکوپلاسماها مشاهده نگردید. تصویر شماره 1 شمایل

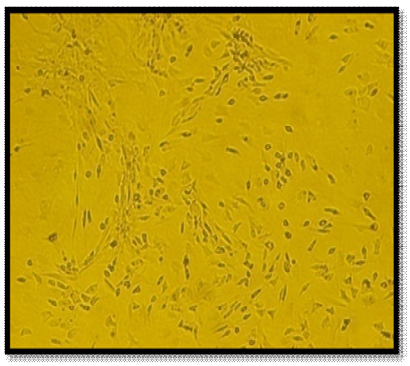
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

سلول های بنیادی USSC را نشان میدهد. از نظر مورفولوژی ، سلولهای چسبنده و دوکی شکل هستند که دارای اندازه هایی معادل 20-25µm می باشد. . سلولهای جداسازی شده در پاساژ 3 را با استفاده از ستون MACS CD133 مورد جداسازی ثانویه قرار داده (تصویر شماره 2) و سلول های بدست آمده را کشت و از نظر مورفولوژی و بیان مارکر های سطحی بنیادی نظیر CD105, CD90, CD34 مورد ارزیابی قرار گرفتند. سلولهای بنیادی جداسازی شده از خون بند ناف، دارای جمعیت ناهمگونی از سلول ها بوده و سلول های جداسازی شده بر اساس مارکر CD133 از نظر بیان مارکر CD133 (تصویر شماره 3) و دیگر مارکرها سلول های بنیادی همگن بوده ولی بیان 18.2% مارکر هماتوپویتیک CD34 در سلول های بنیادی CD133 مثبت میتواند بیانگر تمایل این سلول در فرایند های خونسازی باشد. درصد پایین این سلول ها در قیاس با دیگر سلولهای بنیادی خون بند ناف بیانگر ابتدای تر بودن انها نیز میتواند باشد.

سلولهای بنیادی مزانشیمی(USSC) از 5 نمونه مورد جداسازی موفقیت آمیز قرار گرفتند(20). در آنالیز فلوسیتومتری سلول های تام چسبنده، میزان بیان مثبت مارکر های بنیادی سطحی: CD105:78.35%,CD90:82.32%, CD34:8.56%, CD 133: 25.33% را شامل میشدند و این در حالی بود که در سلول های CD133 مثبت، میزان بیان مارکرهای CD105;55.63%, CD90; 43.25%, CD34:18.2% میباشد(تصویر شماره 4). مورفولوژی سلول های CD133 شبیه سلولهای مزانشیمی و به حالت دوکی فرم بوده و دارای کاریوتایپ XX44 طبیعی بودند(تصویر شماره 5).

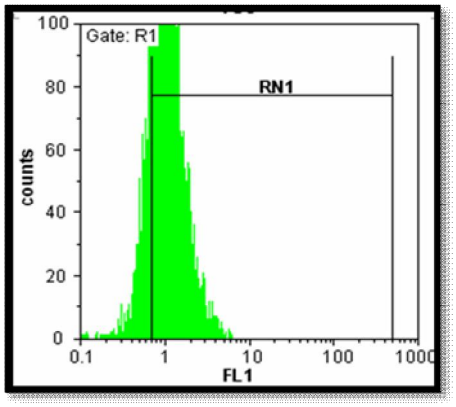


تصویر شماره 1: سلولهای بنیادی مزانشیمی خون بند ناف (USSC) در پاساژ 3 را نشان میدهد (بزرگنمایی 20).

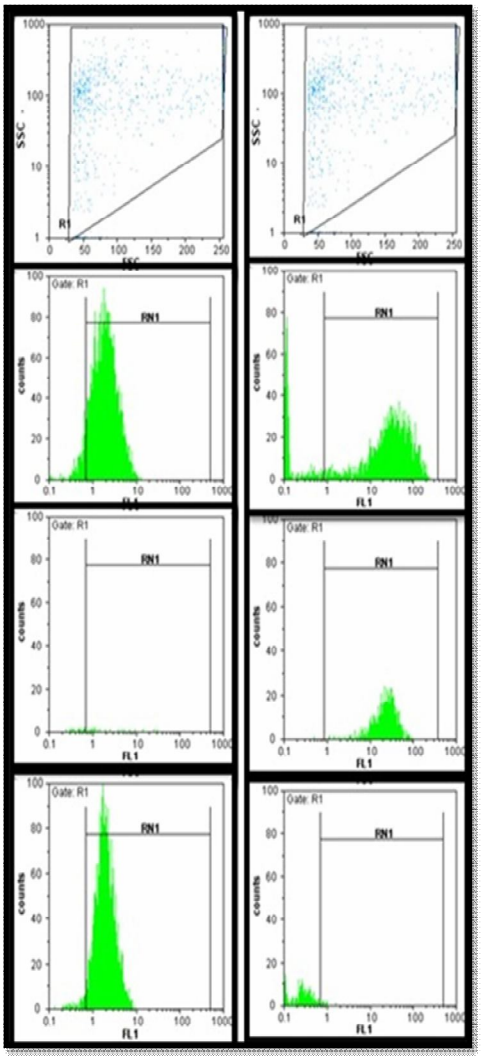


تصویر شماره 2: سلول های بنیادی CD133 مثب را در پاساژ 3 نشان میدهد(بزرگنمایی 10).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

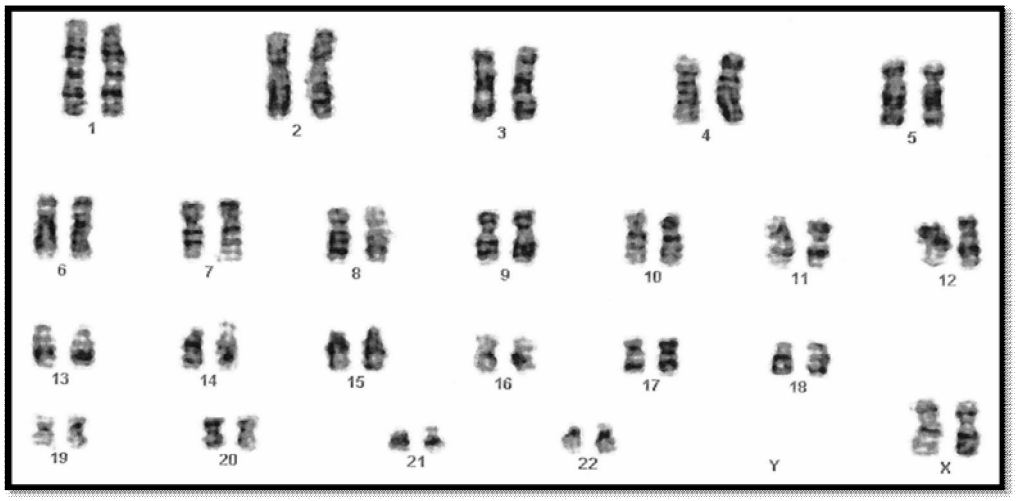


تصویر شماره 3: میزان بیان مارکر سطحی CD133 را در سلول های بنیادی CD133 مثبت را پس از جداسازی از جمعیت سلولهای بنیادی مزانشیمی (USSC) نشان میدهد که بیش از 90% دارای این مارکر میباشند.



تصویر شماره 4: گرافهای فلوسیتومتری مربوط به مارکرهای سطحی CD90,CD34, CD105 (بترتیب از بالا به پایین) را در سلول های بنیادی مزانشیمی USSC نشان میدهد (ستون سمت چپ). در ستون سمت راست، گرافهای فلوسیتومتری را برای سلول های بنیادی CD133 مثبت ، نشان می دهد. به ترتیب از بالا به پایین، CD105, CD90, CD34 می باشند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]



تصویر شماره 5: کاریوتایپ 44 XX را در سلول های بنیادی CD133 مثبت نشان میدهد که در شرایط نورمال می باشند.

بحث و نتیجه گیری

تا به امروز گزارشات متعددی مبنی بر بیان CD133 در سلول های مختلف شده است که میتوان به سلولهای بنیادی هماتوپوئیتیک، سلول های پیش ساز اندوتلیال، گلیوبلاستوما، سلول های بنیادی عصبی و گلیال، سلول های تومورهای مغز و کلیه و همچنین چندین گزارش که بیان CD133 را در سلول های بنیادی سرطانی نشان می داد(۲۱،۲۲،۲۳،۲۴). حضور این مارکر میتواند بیانگر ابتدای تر بودن در قیاس با دیگر پیش ساز های هماتوپوئیتیک باشد (۲۵،۲۶،۲۷،۲۸). قرار گرفتن این مارکر سطحی در کنار دیگر مارکر های شاخص سلول بنیادی نظیر ,CD90 CD105 و مارکر هماتوپویتیک CD34 میتواند معانی متفاوتی را داشته باشد. تاکنون گزارشی در ارتباط با جداسازی سلول های CD133 از جمعیت سلول های بنیادی سوماتیک نامحدود خون بند ناف نشده است و اکثر گزارشات جداسازی را از خون بند ناف عنوان نموده اند. در مطالعه حاظر مشخص شد که سلول های USSC خود دارای جمعیتی ناهمگون بوده و با بررسی و جداسازی سلول های بنیادی CD133 مثبت الگویی از میزان بیان دیگر مارکر ها بیان شد. این بدان معنی است که جداسازی تک مارکری شاید نتواند در تخلیص سلولی نقش مهمی ایفا نماید و ای در حالی است که یک سلول CD133 مثبت میتواند الگو های متفاوتی در بیان CD90,CD105,CD34 داشته باشد. در پژوهش حاظر مشخص شد که سلول های CD133 مثبت دارای بیان بسیار اندک CD34 بوده که میتواند بهدین معنی باشد، سلول های تخلیص شده در مقایسه با سلولهای CD133 مثبت جداسازی شده از خون بند ناف در مراحل پایین تری از نظر تمایزی قرار گرفته و بنیادی تر است، به بیان دیگر، پلوریپوتینت تر می باشد. سلولهای مزانشیمی خون بند ناف، سلولها ی بنیادی چسبنده(USSC) ،سلولهایی CD45منفی هستند که از خون بند ناف (CB) جداسازی شده اند. این سلولها دارای تکثیر نامحدود بوده و جزءسلولهای بنیادی pluripotent تقسیم بندی می شوند (6). برخلاف دیگر انواع سلولهای مزانشیمال موجود در خون بند ناف که تنها به استئوبلاست ، کندریوسیت و چربی (8 و 7) و یا به سلولهای عصبی (۱۰،۱۱) متمایز می گردند، سلولهای مزانشیمی خون بند ناف قادر هستنددر شرایط ex-vivo به استخوان ، غضروف ، سلولهای خونی ، عصب ، کبد ، بافت قلبی متمایز گردند. (6) این سلول فاکتورها ی متعددی را بیان می کندکه شامل مولکولهای چسبنده ، فاکتورهای رشد و سایتوکاین های متعدد می باشد(20). (SCF VEGFو GM-CSF و M-CSF و TGF-1β و 1L-6 و G-CSF و LIF (Flt3 ligand و TPO و HGFو SDF-1α و 1L-5 و 1L-12 و 1L-8 و1L-1β(20و7). در این مطالعه مشخص گردید که برایند ترشحات سایتوکاینی سلول USSC درقالب یک لایه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

پشتیبان (feeder layer) منجر به حفظ سلولهای mESCدر حالت عدم تمایزی می گردد. این سلول فراوانی اندکی در CB دارد ولی قدرت تکثیر بسیار بالایی در in vitro دارد که همچنان در پاساژهای بالا هم دارای کاریوتایپ طبیعی می باشند. سلول های بنیادی چسبنده CD133 مثبت از نظر بیان مارکرهای مولکولی و مورفولوژی سلولی بسیار شبیه سلولهای مزانشیمی میباشند ازجمله مزایای استفاده از سلولهای USSC در گسترش سلولهای mES و یا حتی hESCآن است که سلولهای مزانشیمی خون بند ناف در محیط کشت و یا حتی حیوانات بزرگ هیچگونه واکنش ایمنی مبنی بر برانگیختن سلولهای لموفوسیت Tنخواهد داشت(20). تازه ترین اطلاعات ، آشکار ساخت که سلولهای hUSSC دارای توانمندی قابل ملاحظه ای در ایجاد پس نورد تنظیمی پاسخ ایمنی میزبان می باشند که در طی 3 پیوند مشخص گردید(6). hUSSC قادر است در in vitro پاساژها ی متعددی را برای مدت زمان طولانی پشت سر گذاشته و خللی در قدرت تکثیرش بوجود نیاید. USSCمی تواند بیش از 50 پاساژ را پشت سر گذارد بدون آنکه تمایز خود به خودی و ناخواسته ای پیداکنند.

سپاسگزاری

بدین وسیله تشکر و قدر دانی خود را از جناب آقای دکتر نائب علی احمدی ، سرکار خانم موسوی بموجب حمایتهای بیدریغشان اعلام مینمایم. مقاله حاظر بخشی از پایانامه دکتری سعید حیدری کشل می باشد.

References

1-Williams RL, Hilton DJ, Pease S, willson TA. Myeloid leukemia inhibitory factor maintans the development potential of embryonic stem cells. Neture 1988; 336:684-7.

2-Bonyo A, Fonyc Y, Nys C, Ratnam S. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. Human Reprod 1994; 9: 2110-17.

3-Cole RJ, Edwards RC, Poul j. Cytodifferentiation in cell colonies and cell strains derived from cleaving ova and blastocysts of the rabbit. J Exp Cell Res 1964 ;1: 501-4.

4-Smith AG. Mouse embryo stem cells: their identification. Prepar Manipul Semin Cell Biol 1992; 3:385-99.

5-Jager M, Sager M, Knipper A, Degistrci O, Fischer j, Kogler G, et al. In-vitro-und in-vivo-Knochenregenerierung durch mesenchymale sstammzellen aus dem nabelschnurblut. Orthoped 2004,33:1361-72.

6-Kogler G, Sensken S, Airey JA. A new human somatic stem Cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. J Exp Med 2004; 200:123-135.

7-Ko¨gler G, Radke TF, Aure´lie L, Sensken S, Fischer Js, Ru¨diger V, et al. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood–derived unrestricted somatic stem cells. Exper Hematol 2005 ;33 :573-83.

8-Airey JA, Almeida-Porada G, Colletti EJ, Porada CD, Chamberlain J, Movsesian M, et al. Human mesenchymal stem cells from purkinje fibers in fetal shee2004 p heart. Circulation 2004;109:1401-7.

9-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;21:105-10.

10-Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. Bone Marrow Transpl 2001.

11-Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of Human inner cell masses and embryonic stem cell lines. Nature Biotechnol 2002;20: 933-6.

12-Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G. Human adult Marrow cells support prolonged expansion of human embryonic Stem cells in culture. Stem Cells 2003;21: 131-42.

13-Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, et al. Human

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

feeder layers for human embryonic Stem cells. Biol Reprod 2003;68 :2150-6.
14-Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, et al. A culture system using foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. Human Reprod 2003;18 :1404-9.
15-Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human Embryonic stem cells. Nature Biotechnol 2001;19: 971-4.
16-Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder Layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. Biol Reprod 2004;70 :837-45.
17-Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ, Brandenberger R, Ares X, Miura T, et al. Properties of four human embryonic Stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. Develop Dynam 2004;229: 243-58.
18-Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao MS, et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-Free conditions. Develop Dynam 2004;229: 259-74.
19-Oshima R. Stimulation of the colonal growth and differentiation of feeder layer dependent mouse embryonal carcinoma cell β-mercaptpethanol. Differentiation 1978;11:149-55.
20-Heidari-Keshel S, Roozafzoon R, Soleimani M. Evaluation of unrestricted somatic stem cells as a feeder layer to support undifferentiated embryonic stem cells. Mol Reprod Dev 2012;79:709-718.
21-Yin A. AC133 is a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood 1997 ;12: 5002-12.
22-Corbeil D, Fargeas C, Huttner W. Rat prominin, like its mouse and human orthologues, is a pentaspan membrane glycoprotein. Biochem Biophys Res Commun 2001 ;4: 939-44.
23- Horn PA, Tesch H, Staib P, Kube D, Diehl V, Voliotis D. Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. Blood 1999;93 : 1435–37.
24-Corbeil D, Röper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt S, et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. J Biol Chem 2000;275 : 5512-20.
25-Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. N Engl J Med 2005;353 : 811–822.
26-Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res 2003;63 : 5821–8.
27-Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: Molecule of the moment. J Pathol 2008;214 : 3–9.
28-Shmelkov S, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. Int J Biochem Cell Biol 2005;37: 715-9.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

Isolation of Adherent CD 133 Positive from Cord Blood Unrestricted somatic stem cell its rare population and Nominate as a Valuable Source to Tissue Engineering

heidari keshel S[1,2,3], Rezaei Tavirani M[2], Ebrahimi M[2], Roozafzoon R[3], Farzanfar F[4], Jahani H[5]

(Received: Accepted:)

Abstract

Introduction: Stem cells have a high ability to repair damaged tissues. Mesenchymal stem cells have been separated from bone marrow, peripheral blood and other tissues. CD133-positive stem cells have Pluripotency properties and are powerful candidates for application in cell therapy.

Materials & Methods: In this experimental study, for collectively 30 samples, CD133+ cells were isolated from umbilical cord blood and cultured in suitable media. CD133+ cells were evaluated by flowcytometry for surface stem cell markers such as CD 90, CD34, and CD105 and then karyotiping was performed.

Finding: Flowcytometry results showed that approximately 95% of purified cells were CD133+. The heterogeneous cell population was positive for the markers as follow: CD105: 78.35%, CD90: 82.32% and CD34: 8.56%. In CD133 positive fraction, expression of surface marker was: CD105: 55.63%, CD90:43.25% and CD34: 18.2%.This cells had a Normal karyotype and a Spindle-like shape.

Discussion & Conclusion: Results of the study showed that the mentioned CD133 positive cells could be used as a valuable source for tissue engineering.

Keywords: CD133+ cells, USSC, Flowcytomtry, Stem cell

1.Student Research committee, Proteomics Research Center, Faculty of paramedical sciences, Shahid Beheshti University of medical sciences, Tehran Iran
2. Proteomics Research Center, Faculty of paramedical sciences, Shahid Beheshti University of medical sciences, Tehran Iran
3.Department of Tissue Engineering, Faculty of Advanced Medical Technologies, Tehran University of Medical Sciences ,Tehran, Iran
4. Cancer Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Department of physiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
**(corresponding author)*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]