مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۹، شماره ۱، بهار ۸۸، صفحات ۴۱ تا ۴۸

**Original Article**

# مطالعه تأثیر فاکتورهای رشد عصاره شش موش بالغ بر تمایز سلول‌های بنیادی بند ناف جنین به سلول‌های خونی در شرایط in vitro

**نسیم حیاتی رودباری[۱]، کاظم پریور[۲]، هما محسنی کوچصفهانی[۳]، پریچهر یغمایی[۴]**

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی، زیست شناسی تکوینی جانوری، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران.
[۲] استاد، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران.
[۳] استادیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم، تهران.
[۴] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران.

## چکیده

**سابقه و هدف**: *سلول‌های بنیادی بند ناف به علت دارا بودن توان تمایز به سلول‌های مختلف، دسترسی آسان و عدم خطر برای فرد دهنده، کاربرد درمانی فراوانی دارند. در این مطالعه، از بند ناف به عنوان منبع اصلی تولید سلول‌های بنیادی استفاده شد و عصاره شش موش که حاوی فاکتورهای رشد محرک خونسازی تجویز شد تا تمایز به سلول‌های خونی تحریک شود.*

**روش بررسی**: *در این پژوهش بنیادی، کاربردی و عملی، ابتدا سلول‌های بنیادی از بندناف به وسیله روش هضم آنزیمی جدا شدند و در شرایط کشت مناسب رشد داده شدند. چهار گروه آزمایشی به شرح زیر مورد بررسی قرار گرفتند: گروه‌های تجربی ۱ و ۲ که به ترتیب در معرض غلظت‌های ۵۰ درصد و ۷۰ درصد عصاره شش موش به مدت ۷ روز قرار گرفتند، گروه شم که در معرض عصاره شش قرار نگرفتند و فقط به مدت ۷ روز کشت داده شدند و گروه شاهد که شامل سلولهای طبیعی خون موش بودند. همه گروههای کشت شده با استفاده از کیت آلکالین فسفاتاز مخصوص سلول‌های بنیادی بررسی شده و سپس شمارش افتراقی سلول‌های خونی و اندازه‌گیری فاکتورهای خونسازی انجام گرفت. از آنالیز واریانس تک عاملی برای بررسی داده‌ها استفاده شد.*

**یافته‌ها**: *تغییرات معنی‌داری در نمونه‌های تجربی ۷۰ درصد عصاره در مقایسه با نمونه‌های شاهد و شم مشاهده شد، به‌طوری که سلول‌های بنیادی مربوط به این گروه به دودمان‌های اریتروئیدی و میلوئیدی تمایز یافته بودند.*

**نتیجه‌گیری**: *فاکتورهای رشد موجود در عصاره شش می‌تواند اثر تحریکی بر تمایز سلول‌های بنیادی بند ناف به سلول‌های خونی داشته باشد.*

**واژگان کلیدی:** *بند ناف، سلول بنیادی، عصاره شش، تمایز اریتروئیدی، تمایز میلوئیدی.*

## مقدمه

سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند یعنی ساختار ویژه بافت را ندارند ولی در نهایت می‌توانند به صورت سلولهای همه‌توان (totipotent)، سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های مختلف بدن را تولید نمایند (۱). این سلول‌ها می‌توانند به طور مستمر رشد کرده و مشابه خود را بسازند، یعنی خاصیت خودبازسازی (self renewal) دارند و علاوه بر این در صورت وجود شرایط برای تمایز یافتن می‌توانند به انواع سلول‌های بدن تبدیل شوند (۲). سلول‌های بنیادی از نظر منشأ به سه نوع اصلی تقسیم می‌شوند (۳): ۱) سلولهای بنیادی جنینی

**آدرس نویسنده مسئول**: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، نسیم حیاتی رودباری (**email**: nasimhayati@yahoo.com)

**تاریخ دریافت مقاله**: ۱۳۸۷/۶/۱۸
**تاریخ پذیرش مقاله**: ۱۳۸۷/۱۱/۳۰

(embryonic stem cells): این سلولهای بنیادی معمولاً از توده سلولی داخلی (inner cell mass) بلاستوسیست اخذ می‌شوند، خاصیت خودبازسازی طولانی‌مدت دارند (۴)، سلول-های دیپلوئید و چندتوان هستند و قادر به تمایز به همه انواع سلول‌های حاصله از سه لایه جنینی می‌باشند و نیز قادر به تولید کلنی سلولی مشابه خود هستند (۶،۵)؛ ۲) سلول‌های بنیادی بالغ: این سلولها در انواع گوناگونی از بافت‌ها وجود دارد ولی تعداد آنها فوق العاده محدود است. این سلول‌ها معمولاً غیرفعال بوده و تقسیم نمی‌شوند، مگر اینکه به وسیله عواملی مانند بیماری و جراحی بافت فعال شوند (۱۰-۷)؛ ۳) سلول-های بنیادی بند ناف: این سلول‌ها از بند ناف جنین به دست می‌آیند و به علت دسترسی آسان، به دست آوردن بدون مشکل و خطر کم آلودگی ویروسی امروزه به عنوان یک منبع مهم برای به دست آوردن سلولهای بنیادی مطرح هستند. هر یک از قسمت های بند ناف می‌توانند حاوی سلول‌های بنیادی باشند (۱۱).

با توجه به افزایش بیماری‌های خونی امروزه نیاز به استفاده از سلول‌های بنیادی برای درمان آنها افزایش یافته است. در دهه‌های گذشته، مغز استخوان به عنوان منبع اصلی سلول‌های بنیادی خون‌ساز برای درمان سلولی در نظر گرفته می شد. اما جداسازی این سلول‌ها از مغز استخوان فرآیند دشواری است و توان درمانی آن با افزایش سن کاهش می‌یابد (۱۲).

دست‌یابی به سلول‌های بنیادی جنینی نیز برای درمان این بیماری‌ها پرهزینه و دشوار بوده و با مشکلات اخلاقی فراوانی همراه است. بنابراین تحقیق برای منبع جایگزین این سلول‌های بنیادی ارزش زیادی دارد. گزارش شده است که سلول‌های بنیادی خونساز را می‌توان از بافت‌های مختلفی نظیر پری‌استئوم، استخوان ترابکولار، بافت چربی، مایع مفصلی، ماهیچه اسکلتی، پانکراس فیتوس، کبد، مایع آمنیوتیک، خون و بافت بند ناف جدا کرد (۱۱، ۱۶-۱۳). در میان آنها خون و بافت بند ناف به نظر می‌رسد که منبع ایده‌آلی باشد، چون به راحتی در دسترس هستند، احتمال تحریک سیستم ایمنی توسط آنها پایین است، سلول‌های آن انعطاف‌پذیری بالایی دارند، امکان آلودگی ویروسی کم است و بدون درد و با هزینه کم به دست می‌آیند (۱۶).

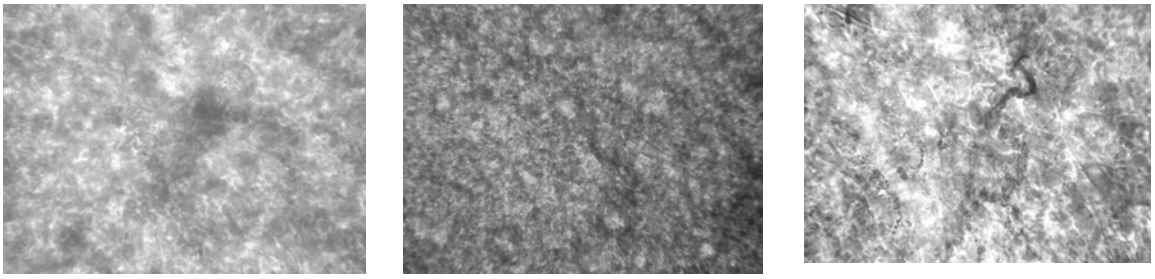
یکی از فاکتورهای محیطی که می‌تواند تمایز را به سمت سلول‌های خون‌ساز تحریک کند CSF ( colony stimulating factor) می‌باشد که این ماده به فراوانی در شش موش وجود دارد و بیشتر به صورت GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) می‌باشد که اثرات مختلفی را در سلول‌های تمایز نیافته دارد و می‌تواند باعث تبدیل آنها به سلول‌های خونی شود (۱۷).

ژن GM-CSF بر روی کروموزوم شماره ۵ در منطقه‌ای مشابه با اینتر لوکین ۳، ۴ و ۵ قرار دارد. پروتئین آن شامل ۱۴۴ باقی‌مانده اسیدآمینه‌ای است و دارای ۱۷ اسید آمینه سیگنال پپتید می‌باشد که در خلال ترشح این اسیدآمینه‌ها از بین می‌روند. GM-CSF طبیعی بسیار گلیکوزیله است و وزن ملکولی حدود ۱۴/۵ تا ۳۴ کیلو دالتون دارد (۱۸). رسپتور GM-CSF عضو خانواده رسپتورهای هماتوپوئیتین است و از یک زنجیره آلفای ویژه برای GM-CSF تشکیل شده است و یک زنجیره بتا نیز دارد که بین این رسپتورها و اینتر لوکین ۳ و ۵ مشترک است (۲۰،۱۹).

نشان داده شده است که فیبروبلاست‌های شش کشت شده به طور پایداری GM-CSF آزاد می‌کنند که این سایتوکین اثر کموتاکتیک در رشد مونوسیت‌ها دارد (۲۱). به علاوه شواهدی از تجربیات in vitro وجود دارد که بر هم کنش مستقیم آندوتلیال و مونوسیت ایجاد GM-CSF را در سلول‌ها می‌کند (۲۲). هم‌چنین GM-CSF باعث بقا بیشتر ائوزینوفیل‌ها در محیط کشت می‌شود (۲۳). علاوه بر این شش موش حاوی انواعی از اینترلوکین‌ها از جمله اینترلوکین 1a و اینترلوکین ۸ و monocyte chemoattractant protein-1 نیز می‌باشد که نقش مهمی در تمایز سلول‌های بنیادی خون ساز دارا می‌باشند (۲۴). به این ترتیب ما بر آن شدیم که با استفاده از عصاره شش موش در شرایط کشت سلول‌های بند ناف اثر فاکتورهای رشد موجود در شش را بر تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های خون ساز مطالعه نماییم.

## مواد و روشها

در این مطالعه بنیادی، از ۴۰ موش بالغ ماده و ۱۰ موش بالغ نر نژاد NMRI با دامنه وزنی ۳۰ــ۲۶ گرم استفاده شد. موش‌ها تحت شرایط مناسب (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و بعد از آنکه به مدت یک هفته با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند، مورد استفاده قرار گرفتند. برای بدست آوردن جنین‌های مورد نیاز، چهار موش ماده و یک موش نر در یک قفس قرار داده شدند. آمیزش معمولا در نیمه شب انجام می‌شد و منجر به ایجاد درپوش مهبلی می‌گردید و زمان مشاهده درپوش مهبلی به عنوان زمان صفر حاملگی در نظر گرفته شد.



الف ب ج

**شکل ۱**- فتومیکروگراف نمونه های سلولهای بندناف کشت داده شده شم (الف)، تجربی ۵۰ درصد (ب) و تجربی ۷۰ درصد (ج) بعد از رنگ آمیزی با کیت آلکالین فسفاتاز (بخشهای تیره حضور سلولهای بنیادی را مشخص می سازند).

محیط کشت مصرفی، محیط کشت DMEM ( Dulbecco's Modified Eagle)، حاوی سدیم بی کربنات به میزان ۲۲۰۰mg/l و L-glutamine به میزان ۵۸۴ mg/l بود که به آن به میزان ۱۰۰ mg/l پنی سیلین و ۱۰۰ mg/l استرپتومایسین و ۲۰ درصد FCS (Fetal Calf Serum) اضافه گردید و توسط فیلتر سرنگی استریل شد. pH محیط کشت نیز در حد ۷/۴ تنظیم شد . عصاره شش موش‌ها با استفاده از روشی که توسط Tetsuro و همکارانش در سال ۱۹۸۲ به ثبت رسیده است (۲۵) تهیه گردید و به مقادیر لازم به محیط کشت اضافه شد.

در روز ۱۵ حاملگی، موش‌های ماده توسط اتر بی‌هوش شدند. سپس لوله‌های رحمی با دقت از بدن مادر جدا گردیدند و در داخل یک ظرف پتری حاوی محلول نمکی بالانس شده هنکس (Hanks Balanced Salt Solution=HBSS) قرار گرفتند. در مرحله بعد، جنین‌ها در زیر میکروسکوپ استریو از بافت رحمی و سپس حفره آمنیونی خارج شدند. بند ناف هریک از آنها جدا گردید و در داخل ظرف پتری دیگری که حاوی HBSS تازه بود قرار داده شد.

در روش کشت سلول، بند ناف‌ها بعد از جدا شدن، به قطعات $mm^3$ ۲-۱ تقسیم شده و با استفاده از روش آنزیمی کلاژناز سلول‌های آن جدا شده (۲۶)، در ظرف کشت ذکر شده قرار داده شده و در داخل انکوباتور $CO_2$ که دارای ۵ درصد $CO_2$ و ۹۵ درصد هوا و ۹۵ درصد رطوبت بود و دمای آن ۳۷±۰/۱ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود، به مدت ۷ روز انکوبه شدند.

در این کار تحقیقاتی، چهار گروه آزمایشی به شرح زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

گروه‌های تجربی ۱ و ۲ که به ترتیب در حضور غلظت‌های ۵۰ درصد و ۷۰ درصد عصاره شش به مدت ۷ روز انکوبه شدند، گروه شم که در معرض عصاره شش قرار نگرفتند و فقط به مدت ۷ روز کشت داده شدند و گروه شاهد که شامل سلولهای طبیعی خون موش بودند.

ابتدا گروه‌های کشت شده در روز اول پس از کشت با استفاده از کیت آلکالین فسفاتاز مخصوص سلولهای بنیادی ( Alkaline Phosphatase Detection Kit) (CHEMICON, International Inc. USA) از نظر وجود سلول‌های بنیادی مورد بررسی قرار گرفتند و سپس در روز هفتم به دو روش دستی و اتوماتیک (امپدانس الکتریکی دستگاه sysmex) شمارش افتراقی سلول‌های خونی انجام گرفت. میزان هموگلوبین گلبول‌های قرمز نیز با استفاده از کیت هموگلوبین اندازه‌گیری شد و سپس مقدار متوسط هموگلوبین (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین (MCHC) و حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) مشخص گردید.

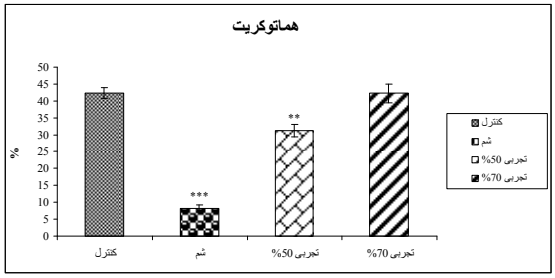
تحلیل آماری و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آنالیز واریانس یک عاملی با تکرار در P<۰/۰۰۱، p<۰/۰۱ و p<۰/۰۵ و با در نظر گرفتن خطای معیار (SEM) انجام گردید.

## یافته‌ها

نتایج حاصل از رنگ آمیزی سلول‌های کشت شده با استفاده از کیت تشخیصی آلکالین فسفاتاز مخصوص سلولهای بنیادی نشان دهنده حضور این سلول‌ها (نقاط تیره در شکل ۱) در هر سه نمونه کشت شده شم، تجربی ۵۰ درصد و تجربی ۷۰ درصد بود.

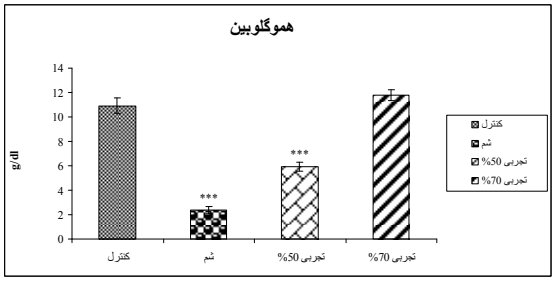
مقادیر هماتوکریت، هموگلوبین، MCV، MCH، MCHC، گلبول قرمز (RBC)، گلبول سفید (WBC)، نوتروفیل‌ها، Band cells، ائوزینوفیل، بازوفیل، لنفوسیت و منوسیت در نمونه‌های شاهد، شم، تجربی ۵۰ درصد و تجربی ۷۰ درصد در شکل ۱ آمده است.

همان‌گونه که هیستوگرام‌ها نشان می‌دهند، میزان هماتوکریت در نمونه‌های شم (p<۰/۰۰۱) و تجربی ۵۰ درصد (p<۰/۰۱) کاهش معنی‌داری را در مقایسه با نمونه شاهد نشان می‌دهد. در صورتی که در نمونه تجربی ۷۰ درصد میزان آن اختلاف معنی‌داری را با نمونه خون طبیعی (شاهد) نشان نمی‌دهد (نمودار ۱).



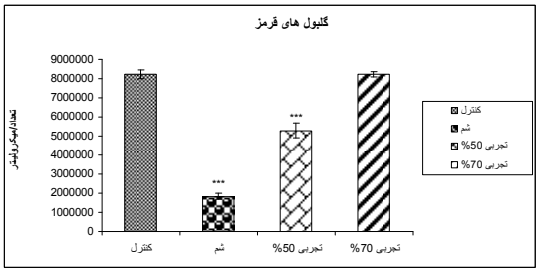

نمودار **۱-** مقایسه مقدار هماتوکریت در نمونه های شاهد، شم و تجربی ۵۰ درصد و تجربی ۷۰ درصد.
* p<۰/۰۵، ** p<۰/۰۱، *** p<۰/۰۰۱

هموگلوبین، RBC و WBC نیز در نمونه‌های شم و تجربی ۵۰ درصد در مقایسه با نمونه شاهد کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) داشت، در صورتی که در نمونه‌های تجربی ۷۰ درصد مقدار آن طبیعی بود (نمودارهای۲، ۳ و ۴).

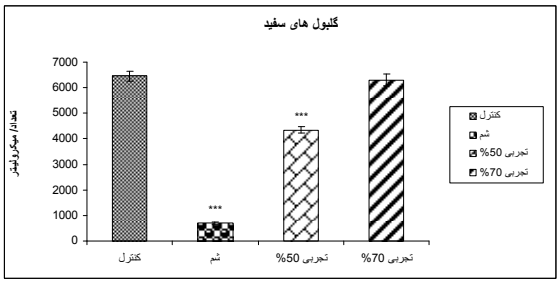



نمودار **۲-** مقایسه مقدار هموگلوبین در نمونه های شاهد، شم و تجربی ۵۰ درصد و تجربی ۷۰ درصد.
* p<۰/۰۵، ** p<۰/۰۱، *** p<۰/۰۰۱

MCV فقط در نمونه تجربی ۵۰ درصد بالاتر از حد طبیعی (P< ۰/۰۵) بود، ولی MCH تغییر معنی‌داری را در هیچ کدام از نمونه‌ها نسبت به نمونه شاهد نشان نداد. میزان MCHC نیز در نمونه شم بالاتر از حد طبیعی (p<۰/۰۵) و در نمونه تجربی ۵۰ درصد پایین‌تر از حد طبیعی (p<۰/۰۰۱) بود (نمودار ۵).

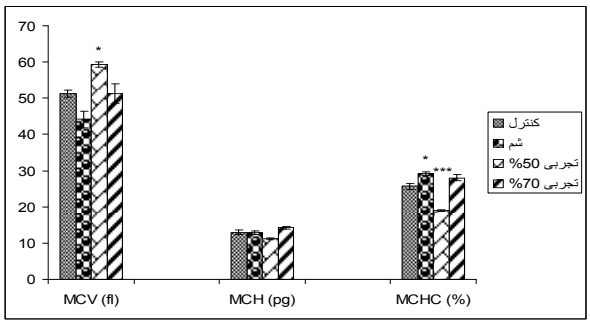



نمودار **۳-** مقایسه مقدار گلبولهای قرمز (RBC) در نمونه های شاهد، شم و تجربی ۵۰ درصد و تجربی ۷۰ درصد.
* p<۰/۰۵، ** p<۰/۰۱، *** p<۰/۰۰۱

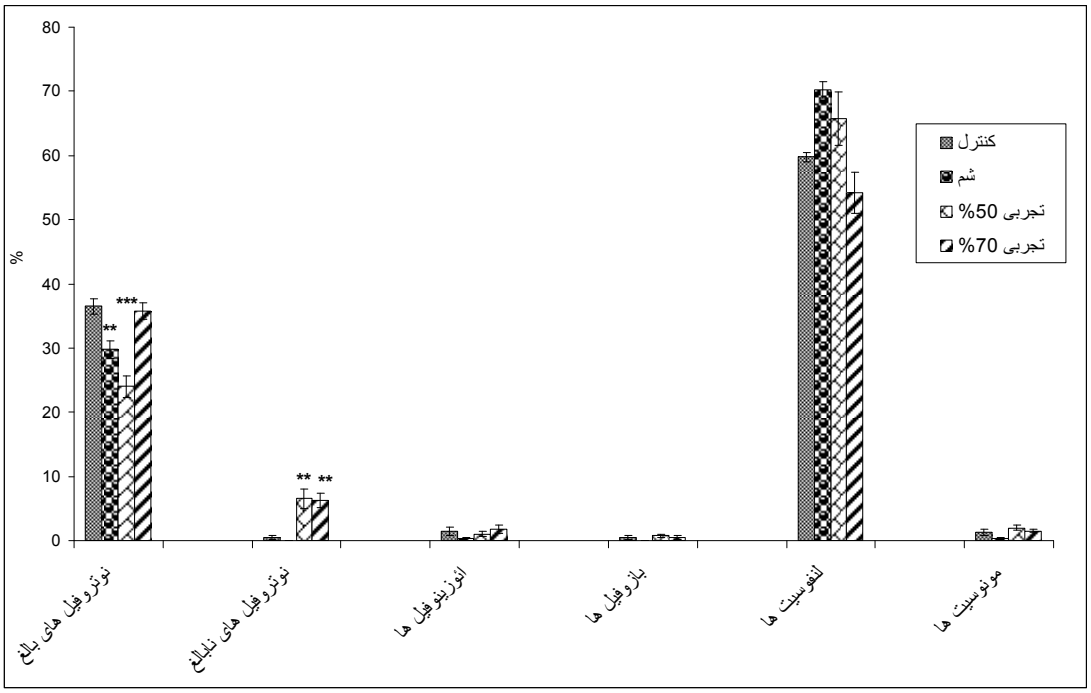



نمودار **۴-** مقایسه مقدار گلبولهای سفید (WBC) در نمونه های شاهد، شم و تجربی ۵۰ درصد و تجربی ۷۰ درصد.
* p<۰/۰۵، ** p<۰/۰۱، *** p<۰/۰۰۱

میزان نوتروفیل در نمونه‌های شم (P<۰/۰۱) و تجربی ۵۰ درصد (p<۰/۰۰۱) کاهش معنی‌داری داشت، ولی در نمونه-های تجربی ۷۰ درصد مشابه نمونه شاهد بود. میزان Band cells که نوتروفیل‌های در حال تمایز هستند در نمونه‌های تجربی ۵۰ درصد و ۷۰ درصد افزایش معنی‌داری را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد (p<۰/۰۱) (نمودار ۶).




نمودار **۵**- مقایسه مقدارMCH، MCHC و MCV در نمونه های کنترل، شم، تجربی ۵۰٪ و تجربی ۷۰٪.
* p<۰/۰۵، ** p<۰/۰۱، *** p<۰/۰۰۱




نمودار ۶- مقایسه نوتروفیل های بالغ (Seg. Neutrophils)، نوتروفیل های نابالغ (Band. Neutrophils)، ائوزینوفیل ها، بازوفیل ها، لنفوسیت ها و مونوسیت ها در نمونه های کنترل، شم، تجربی ۵۰ درصد و تجربی ۷۰ درصد.
* $p<۰/۰۵$، ** $p<۰/۰۱$، *** $p<۰/۰۰۱$

میزان ائوزینوفیل‌ها، بازوفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها نیز با وجود تغییر مقدار آن در نمونه‌های تجربی ۷۰ درصد و ۵۰ درصد این تغییر در مقایسه با نمونه شاهد معنی‌دار نبود (نمودار ۶).

مورفولوژی سلول‌های خونی تمایز یافته نیز طبیعی بود. به این ترتیب تأثیر مثبت عصاره شش بر تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز به سمت افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، افزایش تولید هموگلوبین و افزایش تعداد گلبول‌های سفید و به طور کلی اثر مفید آن بر خون‌سازی مشخص گردید.

## بحث

سلول‌های بنیادی امروزه برای درمان و یا کاهش عوارض بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی-عروقی، گوارشی، کبد، سیستم ایمنی و به خصوص بیماری‌های مربوط به سیستم خون‌سازی به کار می‌روند (۲۹-۲۷). مغز استخوان و بندناف هر دو واجد سلول‌های بنیادی خون‌ساز هستند (۳۰)، ولی تا امروز بیشترین درمان شناخته شده برای ناهنجاری‌های خون‌سازی، پیوند مغز استخوان می‌باشد که از آن جمله می‌توان به کارهای Weissman در سال ۲۰۰۰ و Manz و همکارانش در سال ۲۰۰۴ اشاره کرد (۳۲،۳۱). ولی خون جفت و بند ناف نیز به عنوان یک منبع غنی از سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌باشند. Barker و همکارانش در سال ۲۰۰۳ و Koh و همکارانش در سال ۲۰۰۴ سلول‌های بنیادی موش را از بندناف جداسازی کردند و آنها را در آزمایشگاه کشت دادند (۳۴،۳۳). Romanov و همکارانش در سال ۲۰۰۳ این سلول‌های بنیادی را از لایه‌های آندوتلیالی و زیر آندوتلیالی سیاهرگ بند ناف جدا کردند (۱۱)، اما درصد موفقیت آنها پایین (۳۰ درصد) بود. این ممکن است ناشی از مقدار کم این سلول‌ها در این لایه‌های سیاهرگی باشد.

Wang در سال ۲۰۰۴ (۳۵) و Sarugaser و همکارانش در سال ۲۰۰۵ (۳۶) نشان دادند که ژله وارتون و بافت دور عروقی بند ناف شامل سلول‌های بنیادی بیشتری هستند. این مطالعات نشان می‌دهد که مقدار زیادی از سلول بنیادی می‌توانند از کل بند ناف بدون بخش کردن آن بدست آید. به همین علت ما در این تحقیق از کل بافت بند ناف برای به دست آوردن سلول‌های بنیادی خون‌ساز استفاده کردیم.

در این تحقیق ما از عصاره شش موش که حاوی فاکتورهای محرک خونسازی می‌باشد، استفاده کردیم. از جمله این فاکتورهای رشد که Robert و همکارانش در سال ۲۰۰۱ وجود

آنها را در شش اثبات کردند، فاکتورهای رشد کلنی که مهم‌ترین آنها GM-CSF است و اینترلوکین ها از جمله اینترلوکین۱a و ۸ و monocyte chemoattractant protein-1 می‌باشد (۲۴).

همان‌گونه که تحقیقات ما نشان می‌دهد، با به کار بردن ۷۰ درصد عصاره شش ایجاد سلول‌های دودمان اریتروئیدی، هماتوکریت و تولید هموگلوبین آنها افزایش چشمگیری را تا حد خون طبیعی نشان دادند. این یافته‌ها با کارهای Kaufman و همکارانش (۳۷) مطابقت دارد که در سال ۲۰۰۱ توانستند سلول‌های بنیادی جنینی خون‌ساز را به وسیله هم‌کشتی آنها با سلول‌های مغز استخوان که بیان کننده فاکتورهای خون‌سازی هستند، به سمت تمایز به اریتروسیت‌ها و تولید هموگلوبین هدایت کنند.

Chadwick و همکارانش در سال ۲۰۰۳ (۳۸) برای القاء تشکیل اجداد خون‌ساز، از کشت سلول‌های بنیادی خون‌ساز جنینی همراه با BMP4 و سیتوکین‌های SCF ( stem cell factor)، لیگاند FLT3 (Fims-like tyrosine kinase3)، IL3 (interleukin-3)، IL6 (interleukin-6) و فاکتور محرک کلنی گرانولوسیت استفاده کردند که این عمل تولید سلول‌های دودمان اریتروئیدی و میلوئیدی را حدود ۶ برابر افزایش داد. در مطالعه ما نیز همانند آنها، عصاره شش نیز به خصوص در غلظت ۷۰ درصد توانست تمایز به سمت دودمان‌های اریتروئیدی و میلوئیدی (به خصوص گرانولوسیت‌ها) را تا حد طبیعی آنها در خون طبیعی (نمونه شاهد) افزایش دهد.

بر طبق یافته‌های این تحقیق، میزان گلبول‌های سفید در نمونه‌های تجربی ۷۰ درصد در حد خون طبیعی است، ولی گرایش به سمت تولید گرانولوسیت‌ها به خصوص نوتروفیل‌ها وجود دارد که این امر می‌تواند به علت فراوانی حضور GM-CSF در شش موش و نقش آن بر تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز باشد. تحقیقات سایر دانشمندان از جمله Takahashi و همکارانش در سال ۱۹۹۶ (۲۲) و Yamamoto و همکارانش در سال ۲۰۰۰ (۲۳) نیز نشان دهنده اثر GM-CSF بر تمایز به سمت گرانولوسیت‌ها بود. علاوه بر این وجود band cell های فراوان در حال تمایز در نمونه‌های تجربی ۵۰ درصد و ۷۰ درصد نیز تأییدی بر این امر می‌باشد.

همان‌طور که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، در صورت عدم افزودن عصاره شش (در نمونه‌های شم) یا به کارگیری غلظت کمتر عصاره شش (گروه تجربی ۵۰ درصد) اثرات تمایزی خون‌سازی به طور مشخص دیده نمی‌شود یا بسیار پایین است. در صورتی که میزان هموگلوبین، MCV، MCH و MCHC و سلول‌های خونی نیز در نمونه‌های تجربی ۷۰ درصد در حد خون طبیعی است و این امر نشان دهنده خون‌سازی طبیعی در شرایط in vitro با بکار بردن ۷۰ درصد عصاره شش در محیط کشت می‌باشد.

همان‌طور که مشاهده شد، به طور کلی نتایج این تحقیق نشان دهنده تأثیر مثبت فاکتورهای رشد موجود در عصاره شش بر تمایز سلول‌های بنیادی بند ناف به سمت سلول‌های خونی می‌باشد. به‌طوری که سلول‌های خونی تولید شده در شرایط in vitro در نمونه‌های تجربی ۷۰ درصد در حد خون طبیعی بود و احتمالاً می‌تواند به عنوان منبع ارزان قیمت، با دسترسی آسان و به عنوان جایگزین خون در مراکز انتقال خون و بیمارستان‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه، ریاست دانشکده علوم پایه، مدیریت گروه زیست‌شناسی و مسئولین مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران که ما را در این پژوهش یاری نمودند، سپاسگزاری می نماییم.

## *REFERENCES*

1. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz- Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 2002;418:41-49.
2. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Circ Res 2004;95:9-20.
3. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. J Clin Invest 2002;109:1291-302.
4. Stem Cells: scientific progress and future research directions. Department of health and human services. June 2001. available from: http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm
5. Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 2002;292:154-56.
6. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2003;78:7634-38.

7. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 1999;96:25-34.

8. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. Cell 1999;96:737-49.

9. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell 1999;97:703-16.

10. Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Ashtiani S.K. The effect of extracellular matrix on embryonic stem cells derived cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 2005;38:495-503.

11. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC like cells from umbilical cord. Stem Cell 2003;21:105-10.

12. Rao MS, Matton MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. Mech Ageing Dev 2001;122:713-34.

13. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:568-84.

14. Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, et al. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. J Lab Clin Med 2003;141:342-49.

15. In't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, et al. Mesenchymal stem cells in human secondtrimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. Haematologica 2003;88:845-52.

16. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood 2004;103:1669-75.

17. Burg J, Krump-Konvalinkova V, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. GM-CSF expression by human lung microvascular endothelial cells: in vitro and in vivo findings. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002;283:L460-67.

18. Devereux S, Linch DC. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. In: Mire-Sluis A, Thorpe R, Eds. Cytokines. London: Academic Press; 2000.

19. Kwon EM, Sakamoto KM. The molecular mechanism of action of granulocytemacrophage colony-stimulating factor. J Investig Med 1996;44:442-46.

20. Miyajima A, Mui AL, Ogorochi T and Sakamaki K. Receptors for granulocytemacrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. Blood 1993;82:1960-74.

21. Koyama S, Sato E, Masubuchi T, Takamizawa A, Nomura H, Kubo K, et al. Human lung fibroblasts release chemokinetic activity for monocytes constitutively. Am J Physiol 1998;275:L223-L230.

22. Takahashi M, Kitagawa S, Masuyama JI, Ikeda U, Kasahara T, Takahashi YI, et al. Human monocyte-endothelial cell interaction induces synthesis of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Circulation 1996;93:1185-93.

23. Yamamoto H, Sedgwick JB, Vrtis RF, Busse WW. The effect of transendothelial migration on eosinophil function. Am J Respir Cell Mol Biol 2000;23:379-88.

24. Robert HC, Vladimir VK and Lorena L. Transcription factors in mouse lung development and function. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001;280:823-38.

25. Tetsuro F, Yuji T, Tsunetomo T. Lung tissue extract useful for treating hyaline-membrane disease and method for producing the extract. United States Patent 4338301, 1982. available from: http://www.freepatentsonline.com/4338301.html

26. Ian FR. Culture of animal cells: a manual of basic technique. Canada: John wiley & sons; 2005.

27. Shostak S. Defining stem cells. Bioessays 2006;28:301–308.

28. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review. Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair –current views. Stem Cells 2007;25:2896–902.

29. Bourin P, Gadelorge M, Peyrafitte J-A, Fleury-Cappellesso S, Gomez M, Rage C, et al. Mesenchymal progenitor cells: tissue origin, isolation and culture. Transfus Med Hemother 2008;35:160–67.

30. Kaushansky K. Mechanisms of disease. Lineage-specific hematopoietic growth factors. N Engl J Med 2006;354:2034-45.

31. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. Science 2000;287:1442-46.

32. Manz MG, Akashi K, Weissman IL. Biology of hematopoietic stem and progenitor cells. In: Appelbaum FR, ed. Thomas' hematopoietic cell transplantation. Malden, MA: Blackwell Publishing; 2004.

33. Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. Crit Rev Oncol Hematol 2003;48:35-43.

34. Koh LP, Chao NJ. Umbilical cord blood transplantation in adults using myeloablative and nonmyeloablative preparative regimens. Biol Blood Marrow Transplant 2004;10:1-22.

35. 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;22:1330-37.

36. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem Cells 2005;23:220-29.

37. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci 2001;98:10716-21.

38. Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A, et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. Blood 2003;102:906-15.