

## 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<sup>۱</sup>، کاظم پریور<sup>۲</sup>، هما محسنی کوچصفهانی<sup>۳</sup>، پریچهر یغمایی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری تخصصی، زیست‌شناسی تکوینی جانوری، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران.

<sup>۲</sup> استاد، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران.

<sup>۳</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم، تهران.

<sup>۴</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی، 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، به طوری که سلول‌های بنیادی مربوط به این گروه به دودمان‌های اریترئیدی 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 اریترئیدی، تمایز میلوئیدی.

### مقدمه

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

سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند یعنی ساختار ویژه بافت را ندارند ولی در نهایت می‌توانند به صورت

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

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 اسید آمینه‌ای است و دارای ۱۷ اسید آمینه سیگنال پپتید می‌باشد که در خلال ترشح این اسید آمینه‌ها از بین می‌روند. GM-CSF طبیعی بسیاری 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 ۱a 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

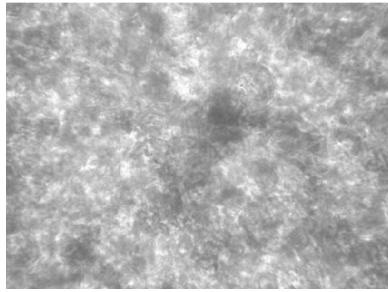
در این مطالعه بنیادی، از ۴۰ موش بالغ ماده و ۱۰ موش بالغ نر نژاد NMRI با دامنه وزنی ۳۰-۲۶ گرم استفاده شد. موش‌ها تحت شرایط مناسب (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و بعد از آنکه به مدت یک هفته با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند، مورد استفاده قرار گرفتند. برای بدست آوردن جنین‌های مورد نیاز، چهار موش ماده و یک موش نر در یک قفس قرار داده شدند. آمیزش معمولاً در نیمه شب انجام می‌شد و منجر به ایجاد درپوش مهلبلی می‌گردید و زمان مشاهده درپوش مهلبلی به عنوان زمان صفر حاملگی در نظر گرفته شد.

(embryonic stem cells): این سلول‌های بنیادی معمولاً از توده سلولی داخلی (inner cell mass) بلاستوسیست اخذ می‌شوند، خاصیت خودبازسازی طولانی‌مدت دارند (۴)، سلول‌های 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 (۵، ۶)؛ (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 سلول‌های 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 و پیروسی امروزه به عنوان یک منبع مهم برای به دست آوردن سلول‌های بنیادی مطرح هستند. هر یک از قسمت‌های بند ناف می‌توانند حاوی سلول‌های بنیادی باشند (۱۱).

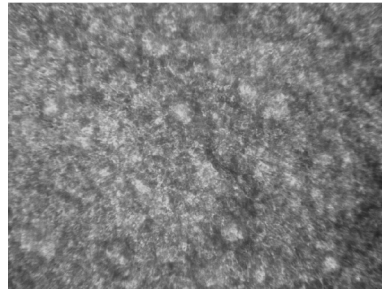
با توجه به افزایش بیماری‌های خونی امروزه نیاز به استفاده از سلول‌های بنیادی برای درمان آنها افزایش یافته است. در دهه‌های گذشته، مغز استخوان به عنوان منبع اصلی سلول‌های بنیادی خون‌ساز برای درمان سلولی در نظر گرفته می‌شود. اما جداسازی این سلول‌ها از مغز استخوان فرآیند دشواری است و توان درمانی آن با افزایش 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 تراکولار، 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 و پیروسی کم است و بدون درد و با هزینه کم به دست می‌آیند (۱۶).

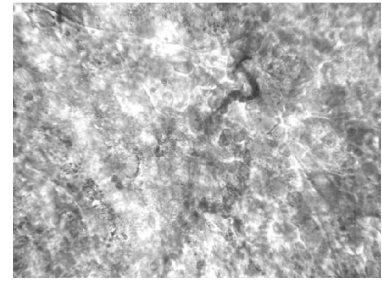
یکی از فاکتورهای محیطی که می‌تواند تمایز را به سمت سلول‌های خون‌ساز تحریک کند (CSF colony stimulating factor) می‌باشد که این ماده به فراوانی در شش موش وجود دارد و بیشتر به صورت GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) می‌باشد که اثرات



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 آلكالین فسفاتاز (بخشهای تیره حضور سلولهای بنیادی را مشخص می سازند).

گروه های تجربی ۱ و ۲ که به ترتیب در حضور غلظت های 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 گروه های کشت شده در روز اول پس از کشت با استفاده از کیت آلكالین فسفاتاز مخصوص سلولهای بنیادی (Alkaline Phosphatase Detection Kit) (CHEMICON, International Inc. USA) از نظر وجود سلول های بنیادی مورد بررسی قرار گرفتند و سپس در روز هفتم به دو روش دستی و اتوماتیک (امپدانس الکتریکی دستگاه sysmex) شمارش افتراقی سلول های خونی انجام گرفت. میزان هموگلوبین گلبول های قرمز نیز با استفاده از کیت هموگلوبین اندازه گیری شد و سپس مقدار متوسط هموگلوبین (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین (MCHC) و حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) مشخص گردید.

تحلیل آماری و مقایسه میانگین ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آنالیز واریانس یک عاملی با تکرار در  $P < 0.001$ ،  $p < 0.01$  و  $p < 0.05$  و با در نظر گرفتن خطای معیار (SEM) انجام گردید.

### یافته ها

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

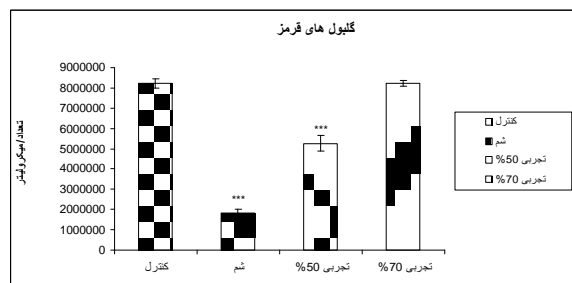
محیط کشت مصرفی، محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle)، حاوی سدیم بی کربنات به میزان  $2200 \text{ mg/l}$  و L-glutamine به میزان  $584 \text{ mg/l}$  بود که به آن به میزان  $100 \text{ mg/l}$  پنی سیلین و  $100 \text{ mg/l}$  استرپتومایسین و ۲۰ درصد FCS (Fetal Calf Serum) اضافه گردید و توسط فیلتر سرنگی استریل شد. pH محیط کشت نیز در حد  $7/4$  تنظیم شد. عصاره شش موش ها 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، موش های ماده توسط اتر بی هوش شدند. سپس لوله های 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، جنین ها 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.

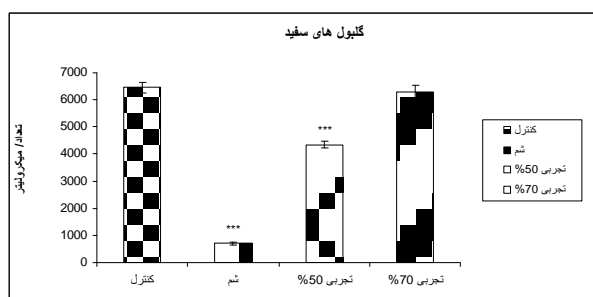
در روش کشت سلول، بند ناف ها بعد از جدا شدن، به قطعات  $1-2 \text{ mm}^3$  تقسیم شده و با استفاده از روش آنزیمی کلاژناز سلول های آن جدا شده (۲۶)، در ظرف کشت ذکر شده قرار داده شده و در داخل انکوباتور  $\text{CO}_2$  که دارای ۵ درصد  $\text{CO}_2$  و ۹۵ درصد هوا و ۹۵ درصد رطوبت بود و دمای آن  $37 \pm 0.1$  درجه سانتی گراد تنظیم شده بود، به مدت ۷ روز انکوبه شدند.

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

در نمونه شم بالاتر از حد طبیعی ( $p < 0.05$ ) و در نمونه تجربی ۵۰ درصد پایین‌تر از حد طبیعی ( $p < 0.001$ ) بود (نمودار ۵).

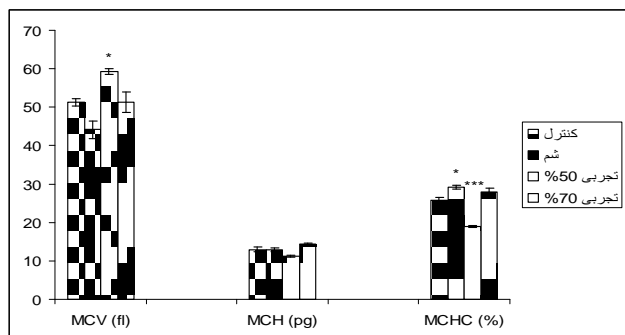


نمودار ۳- مقایسه مقدار گلبولهای قرمز (RBC) در نمونه های شاهد، شم و تجربی ۵۰ درصد و تجربی ۷۰ درصد.  
 $p < 0.001$  \*\*\* ,  $p < 0.01$  \*\* ,  $p < 0.05$  \*



نمودار ۴- مقایسه مقدار گلبولهای سفید (WBC) در نمونه های شاهد، شم و تجربی ۵۰ درصد و تجربی ۷۰ درصد.  
 $p < 0.001$  \*\*\* ,  $p < 0.01$  \*\* ,  $p < 0.05$  \*

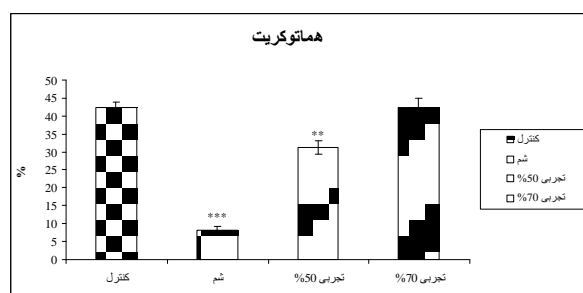
میزان نوتروفیل در نمونه‌های شم ( $P < 0.01$ ) و تجربی ۵۰ درصد ( $p < 0.001$ ) کاهش معنی‌داری داشت، ولی در نمونه‌های تجربی ۷۰ درصد مشابه نمونه شاهد بود. میزان Band cells که نوتروفیل‌های در حال تمایز هستند در نمونه‌های تجربی ۵۰ درصد و ۷۰ درصد افزایش معنی‌داری را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد ( $p < 0.01$ ) (نمودار ۶).



نمودار ۵- مقایسه مقدار MCH، MCHC، و MCV در نمونه های کنترل، شم، تجربی ۵۰٪ و تجربی ۷۰٪.  
 $p < 0.001$  \*\*\* ,  $p < 0.01$  \*\* ,  $p < 0.05$  \*

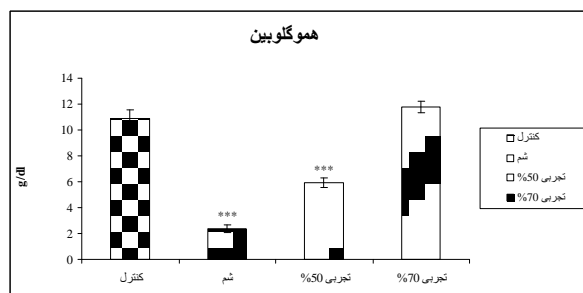
مقادیر هماتوکریت، هموگلوبین، MCV، MCH، MCHC، گلبول قرمز (RBC)، گلبول سفید (WBC)، نوتروفیل‌ها، Band cells، ائوزینوفیل، بازوفیل، لنفوسیت و منوسیت در نمونه‌های شاهد، شم، تجربی ۵۰ درصد و تجربی ۷۰ درصد در شکل ۱ آمده است.

همان‌گونه که هیستوگرام‌ها نشان می‌دهند، میزان هماتوکریت در نمونه‌های شم ( $p < 0.001$ ) و تجربی ۵۰ درصد ( $p < 0.01$ ) 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).



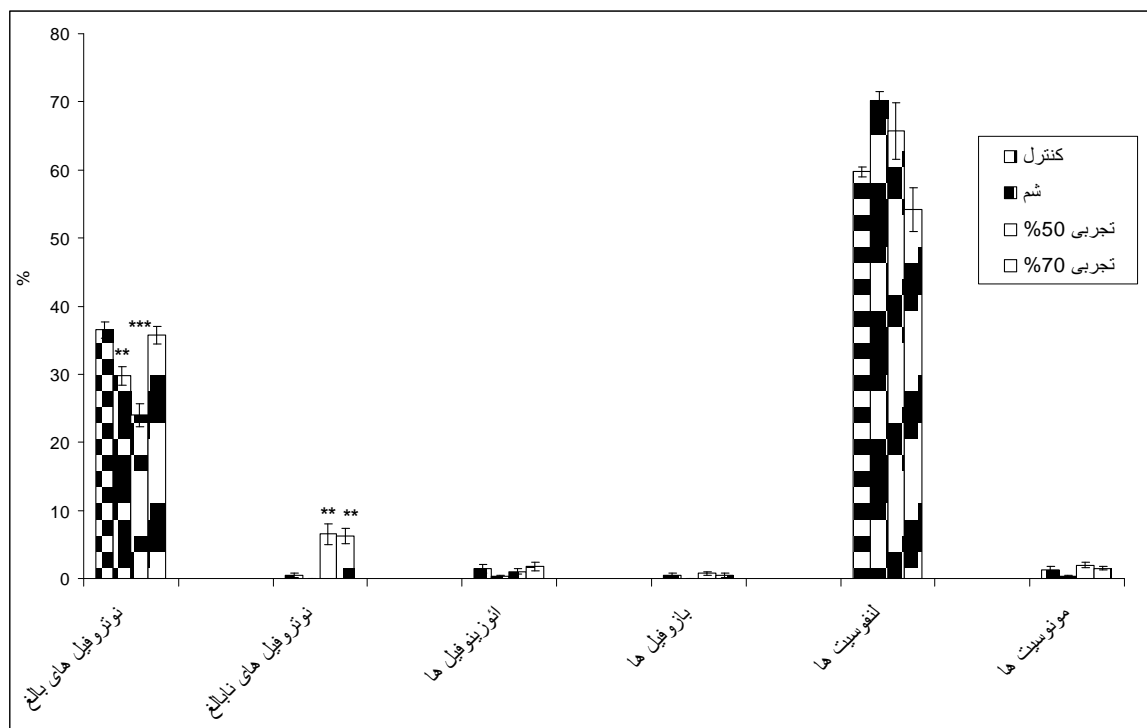
نمودار ۱- مقایسه مقدار هماتوکریت در نمونه های شاهد، شم و تجربی ۵۰ درصد و تجربی ۷۰ درصد.  
 $p < 0.001$  \*\*\* ,  $p < 0.01$  \*\* ,  $p < 0.05$  \*

هموگلوبین، RBC و WBC نیز در نمونه‌های شم و تجربی ۵۰ درصد در مقایسه با نمونه شاهد کاهش معنی‌داری ( $p < 0.001$ ) داشت، در صورتی که در نمونه‌های تجربی ۷۰ درصد مقدار آن طبیعی بود (نمودارهای ۲، ۳ و ۴).



نمودار ۲- مقایسه مقدار هموگلوبین در نمونه های شاهد، شم و تجربی ۵۰ درصد و تجربی ۷۰ درصد.  
 $p < 0.001$  \*\*\* ,  $p < 0.01$  \*\* ,  $p < 0.05$  \*

MCV فقط در نمونه تجربی ۵۰ درصد بالاتر از حد طبیعی ( $P < 0.05$ ) بود، ولی MCH تغییر معنی‌داری را در هیچ کدام از نمونه‌ها نسبت به نمونه شاهد نشان نداد. میزان MCHC نیز



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.  $p < 0.001$  \*\*\*،  $p < 0.01$  \*\*،  $p < 0.05$  \*

Manz و همکارانش در سال ۲۰۰۴ اشاره کرد (۳۲،۳۱). ولی خون جفت و بند ناف نیز به عنوان یک منبع غنی از سلول های بنیادی خون ساز می باشند. Barker و همکارانش در سال ۲۰۰۳ و Koh و همکارانش در سال ۲۰۰۴ سلول های بنیادی موش را از بندناف جداسازی کردند و آنها را در آزمایشگاه کشت دادند (۳۴،۳۳). Romanov و همکارانش در سال ۲۰۰۳ این سلول های بنیادی را از لایه های 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 سلول ها در این لایه های 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 سلول های بنیادی بیشتری هستند. این مطالعات نشان می دهد که مقدار زیادی از سلول بنیادی می توانند از کل بند ناف بدون بخش بخش کردن آن بدست آید. به همین علت ما در این تحقیق از کل بافت بند ناف برای به دست آوردن سلول های بنیادی خون ساز استفاده کردیم. در این تحقیق ما از عصاره شش موش که حاوی فاکتورهای محرک خونسازی می باشد، استفاده کردیم. از جمله این فاکتورهای رشد که Robert و همکارانش در سال ۲۰۰۱ وجود

میزان ائوزینوفیل ها، بازوفیل ها، لنفوسیت ها و مونوسیت ها نیز با وجود تغییر مقدار آن در نمونه های تجربی ۷۰ درصد و ۵۰ درصد این تغییر در مقایسه با نمونه شاهد معنی دار نبود (نمودار ۶).

مورفولوژی سلول های خونی تمایز یافته نیز طبیعی بود. به این ترتیب تأثیر مثبت عصاره شش بر تمایز سلول های بنیادی خون ساز به سمت افزایش تعداد گلبول های قرمز، افزایش تولید هموگلوبین و افزایش تعداد گلبول های سفید و به طور کلی اثر مفید آن بر خون سازی مشخص گردید.

## بحث

سلول های بنیادی امروزه برای درمان و یا کاهش عوارض بسیاری از بیماری ها از جمله بیماری های قلبی-عروقی، گوارشی، کبد، سیستم ایمنی و به خصوص بیماری های مربوط به سیستم خون سازی به کار می روند (۲۷-۲۹). مغز استخوان و بندناف هر دو واجد سلول های بنیادی خون ساز هستند (۳۰)، ولی تا امروز بیشترین درمان شناخته شده برای ناهنجاری های خون سازی، پیوند مغز استخوان می باشد که از آن جمله می توان به کارهای Weissman در سال ۲۰۰۰ و

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 شش) 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. به طوری 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 می‌نماییم.

آنها را در شش اثبات کردند، فاکتورهای رشد کلنی که مهم‌ترین آنها GM-CSF است و اینترلوکین‌ها از جمله اینترلوکین ۱a و ۸ و ۱-monocyte chemoattractant protein 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 بیان‌کننده 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 (Fms-like tyrosine kinase 3)، 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

### REFERENCES

- 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.
- Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;95:9-20.
- 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.
- 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>
- Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 2002;292:154-56.
- 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.