زیست‌شناسی جانوری، سال سیزدهم، شماره سوم، بهار ۱۴۰۰، صفحات ۱۰۲-۹۵

مقاله پژوهشی

ارزیابی سطح بیان MiR-191 در سلول‌های خون محیطی زنان مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با زنان سالم

آرزو شاهی[۱]، نغمه بهرامی[۲،۳]، رباب رفیعی طباطبایی[۱]، عبدالرضا محمدنیا[۴*]

۱- گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی،دانشکده فن آوریهای نوین پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات جراحی های فک و صورت،بیمارستان شریعتی،دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: mohamadnia.ar@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۴

چکیده

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است. میکروRNAها به عنوان نشانگر زیستی برای تشخیص و درمان سرطان پستان ظاهر شده‌اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی miR- ۱۹۱ در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان بود. تعداد ۸۰ نمونه خون محیطی (۴۰ نمونه خون بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۴۰ نمونه خون سالم) جمع‌آوری شد. بلافاصله استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Realtime RT-PCR) انجام شد. طراحی پرایمر اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار AlleleID6 پرایمرهای اختصاصی طراحی و جهت ساخت به شرکت سازنده سفارش داده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون تی- تست زوجی تجزیه و تحلیل شدند. داده‌های به‌دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که میزان miR-۱۹۱ در خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم به صورت معناداری بالاتر بود. بررسی سطح بیان نسبی ژن miR-۱۹۱ در سلول‌های خون محیطی افراد می‌تواند به عنوان یک بیومارکر جهت شناسایی سرطان پستان در زنان مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، نشانگر زیستی،miR-۱۹۱.

مقدمه

در پژوهش‌های غربالگری اخیر شمار شگفت‌آوری از ژن‌های RNA غیرکدشونده شناسایی شده‌اند که در تنظیم بیان ژنی نقش برجسته‌ای ایفا می‌نمایند (۵، ۱۰، ۱۱). این ژن‌ها براساس عملکرد و تعداد نوکلئوتید از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۲۰). میکروRNAها می‌توانند در بین ژن‌های کدکننده پروتئین‌ها و یا در درون ژنهای کدکننده پروتئین‌ها قرار گیرند. حدود ۴۰ ٪ از میکرو RNAها در درون ژن‌ها قرار دارند (۲۷). این ساختارهای نوکلئوتیدی کوچک در بسیاری از فرآیند های زیستی مانند تکوین و تکامل مهره‌داران و گیاهان، تکثیر و تمایز سلولی، متابولیسم و نیز تکوین سرطان‌ها به ویژه سرطان پستان نقش دارند (۱).

میکرو RNAها می‌توانند به عنوان یک بیومارکر مهم برای شناسایی بسیاری از سرطانها مورد نظر قرار گیرند. (۱، ۲۳) . یکی از اولین گزارش‌ها در مورد وجود الگوی بیان میکروRNAها در سرطان پستان انسانی در سال ۲۰۰۵ منتشر شد. در این پژوهش آنالیز کل میکروRNAهای موجود در سلول‌های بافت بدخیم پستان نشان داد که الگوی بیان ۲۹ میکروRNA در سلول‌های سرطانی پستان به نحو کاملاً برجسته‌ای متفاوت از بافت طبیعی می‌باشد (۲۵).

در تحقیق دیگری الگوی بیان میکروRNAها در تومور بافت‌های جامد از جمله بافت توموری جامد پستان بررسی گردید و طی این تحقیق مجموعه‌ای از میکروRNAها از جمله miR-۱۹۱ و۲۱- miRشناسایی شدند که به نظر می‌آید می‌توانند از مارکرهای شناسایی بدخیمی‌های پستان باشند (۱۸). گرچه و در مقابل، در بعضی مطالعات الگوی متفاوت بیان میکروRNAها بین بافت سرطانی و سالم مشاهده نشد (۲۶،۱۶).

در مجموع شواهد به دست آمده نقش میکروRNAها را در زیست‌شناسی سرطان پستان مورد تائید قرار می‌دهند (۱۷). با توجه شیوع گسترده بدخیمی‌های پستان در میان زنان (۸) که روز به روز در حال افزایش می‌باشد (٤) و همچنین عوارض بالینی، فردی و اجتماعی حاصل از ابتلا به بدخیمی‌های پستان که می‌تواند تحمیل هزینه‌های مادی و روانی قابل توجهی را در پی داشته باشد (٦) و از سویی نظر به کاربردهای بالقوه میکروRNAها در حیطه‌های تحقیقاتی و بالینی در حوزه غربالگری، شناسایی و پیش‌آگهی بدخیمی‌ها و از سوی دیگر با توجه محدودیت مطالعات قبلی در خصوص شناسایی میکروRNAهای دخیل در سرطان پستان در بیماران به ویژه در جامعه ایران، پژوهش حاضر به ارزیابی سطح بیان در سلول‌های خون محیطی زنان مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با زنان سالم می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش مجوز کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی با شناسه IR.SBMU.NRITLD. REC.1398.047 دریافت شد. بر اساس مطالعات پیشین (۱۹، ۳)، ٤۰ بیمار که براساس معاینات فیزیکی و تشخیص پزشک متخصص، مشکوک به سرطان سینه بودند، قبل از هرگونه درمانی انتخاب شدند. همچنین ٤۰ نفر نیز از افراد سالم به عنوان گروه شاهد انتخاب گردیدند. افراد دو گروه از نظر فاکتور سن در گروه‌های یکسانی با حداقل سن ۲۲ سال و حداکثر ۷۰ سال در نظر گرفته شدند. همچنین افراد بیمار و سالم تحت مطالعه تا قبل از خون‌گیری، تحت هیچگونه رژیم درمانی ویژه‌ای قرار نگرفته بودند. از کلیه افراد مشارکت کننده در تحقیق ۳ میلی‌لیتر خون محیطی گرفته شد. پس از تهیه نمونه سرم، بلافاصله نمونه سرم وارد مرحله استخراج RNA گردید. استخراج RNA از نمونه خون محیطی بر اساس مطالعات پیشین (۹ ۲۸) و با استفاده از کیت اختصاصی RNeasy Midi (qiagen Cat no.75144) Kit صورت گرفت. جهت ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده، از دستگاه نانودراپ استفاده شد. در مرحله بعد برای ساخت cDNA از کیت ZIST ROYESH استفاده شد. این کیت همچنین حاوی مواد لازم جهت انجام Real-time PCR شامل پرایمرهای Forward و Reverse و SYBR Master Mix Green می‌باشد. از U6 به عنوان (house keeping) استفاده شده است. لازم به ذکر است این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شود. این کیت جهت سنتز اولین رشته‌ی cDNA و RT-PCR به‌روش دو

مرحله‌ای مناسب است. آنزیم رونویسی معکوس به‌کار رفته در این کیت دارای پایداری دمایی بهبود یافته تا ٦٥ درجه سانتی‌گراد و نیز دارای پیوستگی عمل است. این کیت دارای حساسیت و ویژگی بالایی جهت تکثیر هر نوع DNA از RNA الگو است. سنتز cDNA در مرحله‌ی اول واکنش با استفاده از RNA تام یا RNA-Poly (A) با استفاده از پرایمرهای Oligo dt یا Random hexamer یا پرایمرهای اختصاصی ژن مورد نظر انجام می‌شود.

طراحی پرایمر اختصاصی: با استفاده از نرم‌افزار AlleleID6 پرایمرهای اختصاصی طراحی و جهت ساخت به شرکت سازنده سفارش داده شد. در نهایت شرکت سازنده پرایمر را به‌صورت پودر لیوفیلیزه ارائه نمود. پس از دریافت پرایمرهای ساخته شده از شرکت سازنده (شرکت ژن فن‌آوران) که به‌صورت پودر لیوفیلیزه ارائه می‌شود، محلول پرایمر با غلظت ۱۰۰ پیکومول در میکرولیتر با افزودن آب مقطر اتوکلاوشده به پودر تهیه شد و این محلول تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه نگه‌داری شد. برای استفاده نهائی از پرایمر این محلول رقیق‌سازی گردید و با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر وارد واکنش نهائی شد.کیت ZIST ROYESH حاوی مواد لازم جهت انجام Real-time PCR شامل پرایمرهای Forward و Reverse و SYBR Master Mix Green می‌باشد. جهت نرمالایز کردن بیان miRNA مورد نظر برای هر نمونه، نیاز به کالیبراتور (house keeping) می‌باشد که مواد لازم جهت cDNA سازی و Real-time PCR آن نیز مهیا شده است که در اینجا از U6 استفاده شده است. cDNAهای سنتز شده به میزان ۱/۲ با آب مقطر Nuclease free رقیق شده و با استفاده از ترکیبات و طبق برنامه جدول ۱، تحت واکنش Real-time PCR قرار می‌گیرد. کلیه مراحل آماده سازی مستر میکس تا قرار دادن در دستگاه تا حد امکان دور از تابش مستقیم نور انجام می‌شود. دماها و زمان‌های واکنش مطابق دستور العمل کیت تنظیم گردید. پس از پایان هر واکنش تفسیر نتایج بر اساس منحنی‌های Amplification و Melting peak صورت گرفت.

آنالیز آماری: جهت بررسی آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 ابتدا داده‌ها از طریق آزمون کولموگروف-اسمیروف تجزیه و تحلیل شده و توزیع طبیعی داده‌ها بررسی شد. پس از اطمینان از توزیع داده‌ها، آزمون تی-تست زوجی مورد استفاده قرار گرفت. اختلاف بین گروه‌ها در سطح $p < ۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شده است.

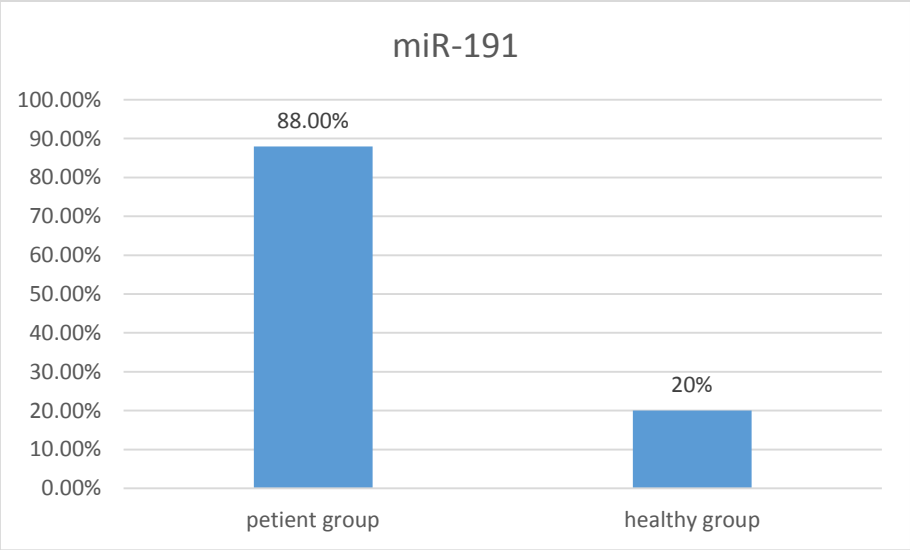
جدول ۱- شرایط دمایی و زمانی واکنش Real-time -PCR

دما	مدت زمان سیکل‌ها	سیکل‌ها
۹۵ درجه سانتی‌گراد	۱۵ دقیقه	۱
۹۵ درجه سانتی‌گراد	۱۵ تا ۳۰ ثانیه	۴۰-۳۵
۵۵ تا ٦٠ درجه سانتی‌گراد	٦٠ ثانیه	
۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد	آنالیز ذوب	۱

نتایج

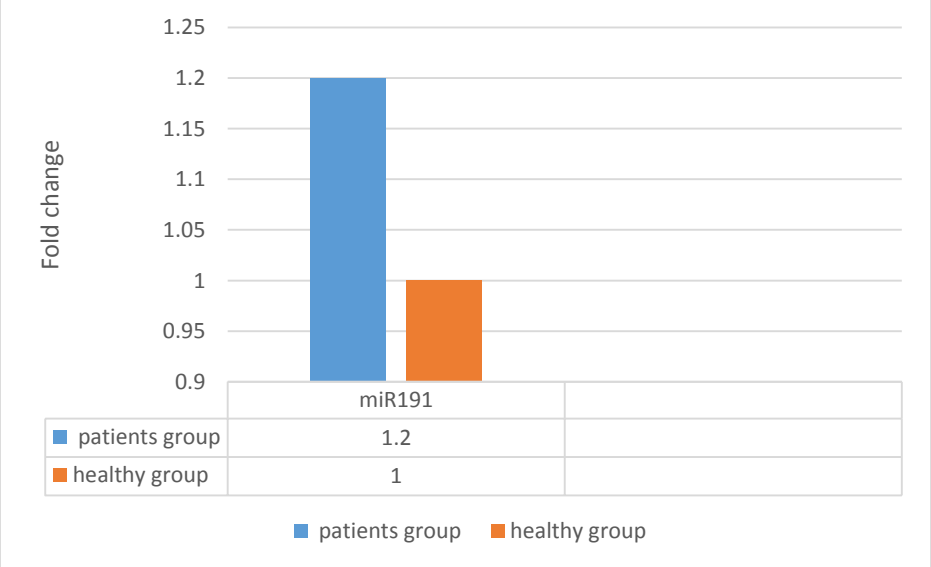
جمعیت مورد مطالعه شامل ٤٠ فرد سالم و ٤٠ فرد مبتلا به سرطان سینه بود. دو گروه از نظر میانگین سنی دارای تفاوت معناداری نبودند بنابراین فاکتورسن دردو گروه اشکالی ایجاد نمی‌کند (p=۰/۳۸۲). ۱۹۱-miRدر ۳۵ نفر از ٤٠ بیمار مثبت بود. در بین افراد سالم ۸ نفر از این میکروRNA در گروه افراد بیمار و

گروه افراد سالم با استفاده از آزمون T-Test صورت گرفت و تفاوت آماری معنی‌داری بین این دو گروه دیده شد (p < ۰/۰۰۱). برای محاسبه تفاوت میزان بیان miR–۱۹۱ در بیماران و افراد سالم از روش Ct ΔΔ استفاده شد. پس از انجام محاسبات، میزان نسبی بیان این بیومارکر در افراد بیمار ۱/۲ برابر افراد سالم به دست آمد.



شکل ۱ – میزان مثبت بودن miR–۱۹۱ در خون محیطی بیماران و افراد سالم.

تفاوت آماری معنی‌داری بین این دو گروه بود (P-value <۰/۰۰۱)



شکل ۲ – تفاوت نسبی بیان miR–۱۹۱ در خون محیطی افراد مبتلا به سرطان سینه و افراد سالم

بحث

سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان تشخیص داده شده و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان است. این بدخیمی ۳۳ درصد از سرطان‌های زنان و ۱۹درصد ازمرگ‌های وابسته به سرطان را تشکیل می‌دهد (۲٤). جهت تشخیص آزمایشگاهی سرطان پستان از تومور مارکرهای متعددی استفاده می‌شود (۲۲، ۲۱). اما اخیرا نظرات محققین به بررسی میکرو RNAها در سرطانها معطوف شده است و جالب توجه است که برخی از میکروRNAها به شکل خارق العاده‌ای به عنوان یک شناساگر در غربالگری و پیش آگهی سرطانها نقش برجسته‌ای ایفا کرده‌اند (۱٤). در این میان ،miR–۱۹۱ از جمله شگفت‌کننده‌ترین میکرو RNA است که مورد توجه محققین قرار گرفته است (٦). مطالعات متعدد نشان دادند که miR–۱۹۱یک نشانگر زیستی مناسب برای تشخیص و پیش‌بینی سرطان است (۱۲). بر این اساس در پژوهش حاضر پتانسیل miR– ۱۹۱ به عنوان یک نشانگر زیستی امید وارکننده در غربالگری و پیش آگهی سرطان پستان مورد توجه بوده است.

گرچه بسیاری از مطالعات بیانگر امکان استفاده از miR–۱۹۱ به عنوان یک بیومارکر مهم در شناسایی سرطانها به ویژه سرطان سینه می‌باشد اما در عین حال نباید فراموش کرد که نتایج برخی تحقیقات موافق چنین امکانی نیستند (۱۵، ۱۱). این حال ،از آنجایی که عوامل سرطان‌زا میزان بیان ژن miR– ۱۹۱ را تنظیم می‌کنند و با در نظر گرفتن ارتباط گسترده miR– ۱۹۱با چندین سرطان می‌توان این بیومارکر را به عنوان یک عامل مهم آنکوژنی در نظر گرفت گرچه اثبات این مفهوم نیازمند آزمایشات دقیق و گسترده با استفاده از مدل‌های مهندسی شده ژنتیکی قدرتمندی است (۲).

یافته‌های ضد و نقیض در مورد miR–۱۹۱ می‌تواند مربوط به این واقعیت باشد که این میکروRNA تنظیم کننده گیرنده استروژنی است که به عنوان یک واسطه مهم استروژنی در تکثیر سلولی عمل می‌کند . گرچه miR–۱۹۱سبب پیشرفت چرخه سلولی در سرطان سینه بوسیله تحریک سلولی جهت گذر از مرحله G1/S به G2/M می شود، در مقابل در سرطان تیروئید miR–۱۹۱ به عنوان یک میکروRNAی سرکوبگر تومور منجر به کاهش رشد و مهاجرت سلول‌های توموری می گردد (۲). در مجموع اثرات ضد و نقیض miR–۱۹۱ در حال حاضر در موارد قابل توجهی در هاله‌ای از ابهام قرار دارد و مطالعات آتی می‌توانند اطلاعات مهم و مفیدی جهت درک مکانیسم ارتباط سرطانهای مختلف به ویژه سرطان سینه با miR– ۱۹۱ ارایه دهند.

قابل ذکر است که با توجه به محدودیت پشتیبانی مالی و تسهیلات در دسترس محققین این پژوهش، امکان بررسی موضوع در سطح ریزتر سلولی و مولکولی به ویژه بررسی بیومارکرهای بیشتر و بیان ژن‌های تخصصی فراهم نگردید، امید است در آینده امکان بررسی این موضوع در سطوح ریزتر سلولی و مولکولی به ویژه از نظر بررسی بیان ژن miR–۱۹۱ در سطح بافتی فراهم آید.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان دادند که بررسی سطح بیان نسبی ژن miR– ۱۹۱ در سلول‌های خون محیطی افراد مبتلا به سرطان سینه دارای پتانسیل جهت استفاده به عنوان یک بیومارکر شناسایی غیرتهاجمی سرطان پستان در زنان می‌باشد. مطالعات آتی با استفاده جمیت آماری بیشتر می تواند در اثبات استفاده از این بیومارکر در شناسایی سرطان سینه در زنان نقش برجسته‌ای ایفا نماید.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان نامه دکترا میباشد که با همکاری دانشگاه آزاد اسلامی و دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفته است.

منابع

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

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

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

4- Choudhery M.S., Khan M., Mahmood R., Mehmood A., Khan S.N., Riazuddin S. 2012. Bone marrow derived mesenchymal stem cells from aged mice have reduced wound healing, angiogenesis, proliferation and anti- apoptosis capabilities. *Cell Biology International*, 36(8): 747-753.

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

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

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

8- Fulle S., Centurione L., Mancinelli R., Sancilio S., Manzoli A.F., Di Pietro R. 2012. Stem cell ageing and apoptosis. *Current Pharmaceutical Design*, 18(13): 1694-1717.

9- Gao F., Chiu S.M., Motan D.A.L., Zhang Z., Chen L., Ji H.L., Tse H.F., Fu Q.L., Lian Q. 2016. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death and Disease*, 7(1): e2062-e2062.

10- Haybar H., Maleki Behzad M., Shahrabi S., Ansari N., Saki N. 2020. Expression of Blood Cells Associated CD Markers and Cardiovascular Diseases: *Clinical Applications in Prognosis. Laboratory Medicine*, 51(2): 122-142.

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

12-Haybar H., Maleki Behzad M., Shahrabi S., Ansari N., Saki N. 2020. Expression of Blood Cells Associated CD Markers and Cardiovascular Diseases: Clinical Applications in Prognosis. *Laboratory Medicine*, 51(2): 122-142.

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

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

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

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

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

18- Li F., Cao J., Zhao Z., Li C., Qi F., Liu T. 2017. Mesenchymal Stem Cells Suppress Chronic Rejection in Heterotopic Small Intestine Transplant Rat Models Via Inhibition of CD68, Transforming Growth Factor-β1, and Platelet-Derived Growth Factor Expression. *Experimental and Clinical Transplantation: Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, 15(2): 213-221.

19- Liu H., Li R., Liu T., Yang L., Yin G., Xie Q. 2020. Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells and Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Immunology*, 11:1912.

20- Li T., Xia M., Gao Y., Chen Y., Xu Y. 2015. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15(9): 1293-1306.

21- Nadig R.R. 2009. Stem cell therapy–Hype or hope? A review. *Journal of Conservative Dentistry*, 12(4): 131-138.

22- Nagamura-Inoue T., He H. 2014. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: their advantages and potential clinical utility. *World Journal of Stem Cells*, 6(2): 195-202.

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

24- Rohban R., Pieber T.R., 2017. Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: tissue specificity and regenerative potential. *Stem Cells International*, ID 5173732.

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

26- Stoltz J.F., de Isla N., Li Y.P., Bensoussan D., Zhang L., Huselstein C., Chen Y., Decot V., Magdalou J., Li N., Reppel L. 2015. Stem cells and regenerative medicine: myth or reality of the 21th century. *Stem Cells International*, ID: 734731.

27- Vladimirovna I.L., Sosunova E., Nikolaev A., Nenasheva T. 2016. Mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells: common traits in immune regulation. *Journal of Immunology Research*, ID: 7121580.

28- Yousefi A.M., James P.F., Akbarzadeh R., Subramanian A., Flavin C., Oudadesse H. 2016. Prospect of stem cells in bone tissue engineering: a review. *Stem Cells International*, ID: 6180487.

29- Zajdel A., Kałucka M., Kokoszka-Mikołaj E., Wilczok A. 2017. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and Wharton's jelly of the umbilical cord. *Acta Biochimica Polonica*, 64(2): 365-369.