

بررسی پتانسیل تمایز استخوانی، غضروفی و چربی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان سگ

محمدرضا یاغیان اسلامی نژاد^۱، آق بی بی نیک محضر^۲، M.Sc، لیلا تقی یار^۳، M.Sc،
محمد مهدی دهقان^۴، DVM، حسین کاظمی^۵، DVM، علی فرخی^۶، M.Sc، پوپک افتخاری یزدی^۷، Ph.D

۱. پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

۲. دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی

۳. آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۶۲۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

پست الکترونیکی: [Email: bagesla@yahoo.com](mailto:bagesla@yahoo.com)

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۱۴/۱۴، پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۲

هدف: بررسی پتانسیل تمایز به رده‌های استخوانی، غضروفی و چربی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان سگ

مواد و روش‌ها: ۱۰ قلابه سگ با متوسط وزن ۲۵-۱۵ کیلوگرم بیهوش شدند و ۱۵ میلی‌لیتر مغز استخوان از استخوان لگن خاصره هر کدام آسپیره شد. سپس با استفاده از لیمفودکس و ایجاد گرادیان غلظت سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان جدا شد و با تراکم 5×10^4 سلول بر سانتی‌متر مربع در محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاو کشت شد. با انجام چند پاساژ پی‌درپی، سلول‌های فیبروبلاستی تخلیص و تکثیر شد و سلول‌های پاساژ سوم، از لحاظ پتانسیل تمایز به استخوان، چربی و غضروف مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که به مدت ۳ هفته در معرض محیط تمایز به استخوان، چربی و غضروف قرار گرفتند و در پایان وقوع تمایز با روش‌های هیستوشیمی و RT-PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: به دنبال رنگ‌آمیزی آلبزارین رد، کشت استئوژنیک قرمز رنگ شد که حاکی از معدنی شدن ماتریکس بود. در این ماتریکس mRNA شاخص بافت استخوانی (کلژن تیپ ۱ و استروپونین) به مقدار زیادی تولید شده بود. همچنین در کشت آدیپوژنیک، قطرات چربی تولید شده به دنبال رنگ اختصاصی اوپل رد قرمز شدند. بررسی RT-PCR نشان داد که ژن‌های شاخص چربی (لیپو پروتئین لیپاز و PPAR γ) در این کشت بیان شده است. برش‌های تهیه شده از کشت کندروژنیک، به دنبال رنگ آمیزی با سافرانین O ارضوانی شد که حاکی از فراوانی گلیکوز آمینو گلیکان در این کشت بود. نتایج RT-PCR نشان داد که در کشت تمایز به غضروف mRNA برخی شاخص‌های غضروف نظیر کلژن II و دکورین تولید شده و برخی (ماکرومولکول آگریکان) تولید نشده است. **نتیجه‌گیری:** سلول‌های فیبروبلاستی جدا شده از مغز استخوان سگ به راحتی به استخوان و چربی تمایز می‌یابند ولی در تمایز به غضروف، علی‌رغم تولید ماتریکس غنی از گلیکوز آمینو گلیکان، کلژن II و Decorin، مولکول آگریکان ساخته نمی‌شود.

کلیدواژه‌ها: سلول مزانشیمی، مغز استخوان سگ، تمایز به استخوان، چربی و غضروف

فصلنامه پزشکی پاكته، سال نهم شماره ۸، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۳۸-۳۱

مقدمه

پانکراس، کاردیومیوسیت و هپاتوسیت نیز تمایز پیدا کنند (۱۲-۸). اگر چه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت‌هایی همچون خون بندناف، بافت چربی، استخوان، کپسول مفصلی و عضله نیز استخراج شده‌اند اما منبع اصلی این سلول‌ها مغز استخوان است (۱۴، ۱۳). حضور این سلول‌ها در مغز استخوان اولین بار توسط فریدنشتاین و همکارانش عنوان شد. آنها نشان دادند استرومای مغز استخوان حاوی جمعیتی از سلول‌های شبه فیبروبلاستی است که توانایی چسبیدن به کف پلاستیک ظرف کشت را دارد و در محیط کشت به راحتی به استخوان،

سلول‌های بنیادی بالئین (بزرگسالان) سلول‌هایی هستند که در نقاط مختلفی از قبیل مغز استخوان، خون بندناف و اکثر بافت‌های بدن یافت می‌شوند (۱، ۲). در میان این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به دلیل سهولت دسترسی و تکثیر، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و با توانایی تمایز به رده‌های استخوانی، غضروفی و چربی شناخته می‌شوند (۳-۶). تحقیقات اخیر نشان داده است که پتانسیل تمایزی این سلول‌ها وسیع است به طوری که قادرند علاوه بر رده‌های اسکلتی به اکثر سلول‌های مشتق از سه لایه جنینی از قبیل سلول عصبی (۷)، سلول بتای

(Fetal Bovine Serum, Cat. No:10270, Gibco, UK: FBS) و ۱۰ واحد بین‌المللی پستی‌سیرین/استریتوماسین (15070-063, Gibco, UK) در داخل فلاسک‌های ۱۵۰ سانتی‌متر مربع کشت داده شدند. ۷ الی ۱۰ روز پس از آغاز کشت، محیط رویی سلول‌ها دور ریخته شد و پس از یک‌بار شستشو با محلول PBS با محیط تازه جایگزین شد. با این عمل سلول‌های خونی و غیرچسبده از محیط کشت حذف شدند. تعویض محیط هر دو روز یک‌بار انجام گرفت تا زمانی که سلول‌ها ۷۰ الی ۸۰ درصد ظرف کشت را پر کردند. در این زمان (هفته سوم) سلول‌ها تریپسین (Trypsin/EDTA, 25300-054, Gibco, UK) شد و پسین دو فلاسک ۱۵۰ تقسیم شدند. سلول‌های پاساژ اول، پس از ۵ روز ظرف کشت را پر کردند و در ادامه پاساژ دوم انجام گرفت و با انجام پاساژ سوم، سلول به اندازه کافی برای اجرای مراحل بعدی تحقیق فراهم شد. در مطالعه حاضر از سلول‌های پاساژ سوم، به منظور بررسی پتانسیل تمایز استفاده شده است.

تمایز به استخوان و رنگ‌آمیزی آلینزاین ره

برای تمایز استئوژنیک، سلول‌ها با تراکم 5×10^4 سلول بر سانتی‌متر مربع در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند. با پر شدن محیط کشت، محیط القاکننده تمایز استخوان که حاوی $0.1 \mu\text{M}$ dexamethasone (D1753; Sigma, USA), 10mM β -glycerophosphate (G9891, Sigma, USA), 0.05mM ascorbate (A8960, Sigma, USA) بود، به محیط سلول‌ها اضافه شد. محیط کشت سلول‌ها ۳ بار در هفته تعویض شد و سلول‌ها به مدت ۳ هفته در معرض این محیط قرار گرفتند و در پایان وقوع تمایز با روش RT-PCR و رنگ آمیزی Alizarin red (A5533; Sigma, USA) بررسی شد.

به منظور رنگ‌آمیزی آلینزاین ره، پس از تخلیه محیط رویی، سلول‌ها با PBS بدون کلسیم و منیزیم به مدت ۱۰ دقیقه شسته و در متانول ۱۰۰ درصد فیکس شدند. سپس نسیم میلی‌لیتر Alizarin Red (۰/۲۵ درصد در آب مقطر) به آنها اضافه شد (۲ دقیقه). در پایان، سلول‌ها چندین بار با آب مقطر شسته و با میکروسکوپ مشاهده شدند.

تمایز به چربی و رنگ‌آمیزی اوایل ره

برای تمایز به چربی نیز همانند تمایز به استخوان سلول‌ها در پلیت‌های ۶ خانه و در معرض محیط القاکننده چربی حاوی 100nM indomethacine (I-8280, Sigma, USA) و $50 \mu\text{M}$ dexamethasone کشت داده شدند. محیط کشت سلول‌ها ۳ بار در هفته تعویض شد و در پایان روز ۲۱، وقوع تمایز با رنگ‌آمیزی Oil red O (O-0625, Sigma, USA) و روش RT-PCR ارزیابی شد.

به منظور رنگ‌آمیزی با روش اوایل ره، سلول‌ها به مدت ۶۰ دقیقه با

چربی و غضروف تمایز می‌یابد (۱۸-۱۵). آنها نام واحد تشکیل دهنده کلونی فیبروبلاستی را برای این سلول‌ها برگزیدند (۱۹). پس از آن اوون و همکاران با پیوند سلول بنیادی مزانشیمی به خرگوش نشان دادند که این سلول‌ها در محیط *in vivo* نیز توانایی تبدیل به استخوان، چربی و غضروف را دارا هستند (۱۸).

با وجودی که جمعیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مغز استخوان بسیار اندک است و کمتر از ۰/۱ درصد سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان را تشکیل می‌دهد اما به دلیل خاصیت خود تجدیدی، به راحتی در محیط کشت قابل تکثیر هستند. این ویژگی و همچنین توانایی آنها در تمایز به چندین رده سلولی و نیز دسترسی آسان به آنها باعث شده تا محققان این سلول‌ها را به عنوان منبع مناسبی برای مقاصد ژن و سلول درمانی در نظر بگیرند (۲۱-۲۰).

تاکنون سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان گونه‌های مختلف از قبیل انسان، موش، رت، اسب، خوک، گوسفند و بز با موفقیت جداسازی شده است (۲۹-۲۱)، اما در این بین جداسازی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان سنگ به ندرت مورد توجه قرار گرفته است. این در حالی است که سنگ شباهت‌های فیزیولوژیکی بسیاری با انسان دارد و مدل ارزشمندی برای آسیب‌های سیستم اسکلتی محسوب می‌شود (۳۰).

سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان سنگ برای اولین بار توسط کادیوالا و همکاران جداسازی و پتانسیل استئوژنیک آنها در حالت *in vivo* بررسی شد. بدین ترتیب که این محققان ابتدا سلول‌های جدا شده را داخل منافذ سرامیک متشکل از هیدروکسی آپاتیت و تری کلسیم فسفات بارگیری کردند؛ سپس آنها را در زیر پوست و داخل عضله سنگ پیوند زدند و استخوان‌سازی حاصل را مطالعه کردند (۳۰). پس از آن محققان دیگر در چندین مطالعه پتانسیل استئوژنیک این سلول‌ها را نشان داده‌اند (۳۱، ۳۲). ولی در ارتباط با پتانسیل آدیپوژنیک و کندروژنیک این سلول‌ها گزارشی وجود ندارد. این موضوع در مطالعه حاضر مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان سنگ در مطالعه حاضر تعداد ۱۰ قلابه سنگ با متوسط وزن ۲۵-۱۵ کیلوگرم مورد استفاده قرار گرفت. عمل آسپیراسیون مغز استخوان (به طور متوسط ۱۵ میلی‌لیتر) در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و تحت بهوشی عمومی از استخوان ایلیم انجام گرفت. نمونه‌های مغز استخوان به پژوهشکده رویان انتقال یافتند و در آزمایشگاه کشت سلول، به منظور استخراج سلول مزانشیمی، به میزان ۳ برابر حجم نمونه محیط، Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 12800-116; Gibco, UK) به آن اضافه شد. سپس با استفاده از لیمفودکس و ایجاد گرادیان غلظت و دور سانتیفریژ ۱۲ دور سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان جدا شدند و با تراکم 5×10^4 سلول بر سانتی‌متر مربع در محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاو

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سگ

سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته به استخوان، چربی و غضروف استخراج شد. نمونه‌های RNA استخراج شده با (104132, Roch)Dnase I تحت تیمار قرار گرفتند تا آلودگی‌های احتمالی مربوط به DNA ژنومیک از نمونه‌های RNA حذف شود. سپس خلوص و غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری تعیین شود. یک میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت (K 1622 Fermentas) Revert AldTMH Minus First Strand cDNA Synthesis نسخه‌برداری معکوس شد. سپس از cDNA تولید شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد. به این منظور مواد زیر در یک لوله PCR با یکدیگر مخلوط شدند: cDNA (100ng/ml) 2µl (10x) 2/5 µl PCR Buffer (AMS), 0/75 µl MgCl₂ (50mM), 0/5dNTPmix µl (10mM) از هر پرایمر (5 µM) 1 µl (1 µl/5unit) 0/5Smar Taq µl (سیناژن، TAB110C) و در نهایت با استفاده از آب دو بار تقطیر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برای پی بردن به بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد. شرایط PCR به صورت: (۱) واسرشتگی اولیه: ۵ دقیقه (۹۳ درجه سانتی گراد)، (۲) واسرشتگی هر سیکل: ۴۵ ثانیه، ۹۳ درجه سانتی گراد (۳) Annealing با توجه به Tm پرایمرهای هر ژن که در جدول ذکر شده است. (۴) Extension هر سیکل: ۴۵ ثانیه Extension، (۵) زمانی: ۱۰ دقیقه (۷۲ درجه سانتی گراد) انجام شد. محصولات PCR روی آگارز ۱/۷ درصد جدا و با اتیدیوم بروماید قابل رویت شدند.

یافته‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان سگ در کشت اولیه، کلون‌های کوچکی با مورفولوژی شبه فیبروبلاستی (دوکی) و تعدادی سلول با مورفولوژی گرد ظاهر شد (شکل ۱A).

فرمالدئید ۴ درصد فیکس و با الکل ۷۰ درصد شسته شدند. پس از آن، از رنگ اوایل رد که از ۳ قسمت محلول استوک رنگ (۵/۰ درصد اوایل رد در ایزوپروپیل الکل ۹۹ درصد) و ۲ قسمت آب مقطر تشکیل یافته بود استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه در محلول اوایل رد قرار گرفتند و بعد از این مدت با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شدند.

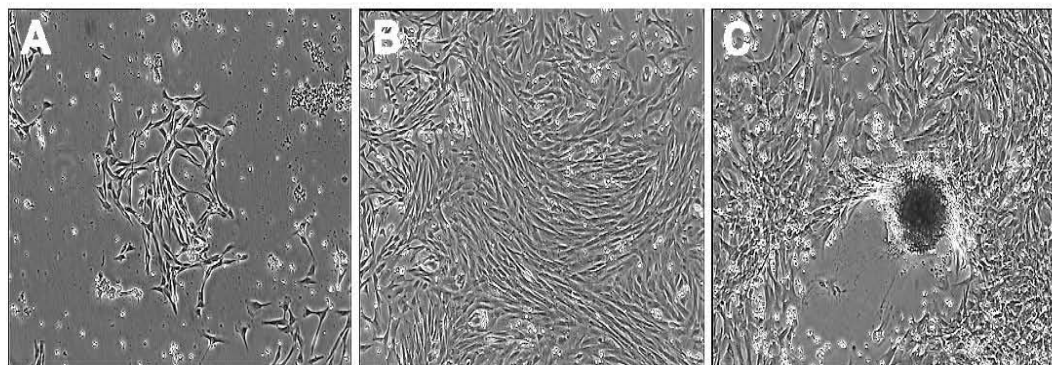
تمایز به غضروف و روش رنگ‌آمیزی با Safranin O

جهت تمایز به غضروف از روش micro mass culture استفاده شد. به این نحو که ابتدا تعداد ۲۰۰ هزار سلول شمارش و در داخل لوله ۱۵ میلی‌لیتر سانتی‌فوز شدند. سپس محیط کندر و ژنیک حاوی 500 ng/ml (B2805, Sigma, USA) (A 8960, Sigma, 0/1µM dexamethasone, 10ng/ml TGF-B3 (TT5425, Sigma, USA), BMP-6 50mg/ml (Sigma, USA), 40µg/ml praline (.P5607, Sigma, USA), 0.05mM ascorbate USA) (L5900, Sigma, USA), 1.24mg/ml BSA (A9418, Sigma, USA), ITS (I3146; Sigma, USA), 5.35mg/ml linoleic acid

به لوله اضافه شد. محیط کشت سلول‌ها یک روز در میان تعویض شد و در پایان روز ۲۱، برخی از پلت‌ها برای آنالیز RT-PCR استفاده شدند و از برخی دیگر به منظور رنگ‌آمیزی Safranin O (S2255, Sigma, USA) برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شد. این برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با Safranin O رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری معمولی مشاهده شدند.

آنالیز RT-PCR

در ابتدا با استفاده از Nucleospln RNA II kit (740955; Macherey-Nagel, Germany) کل موجودی RNA سلولی از

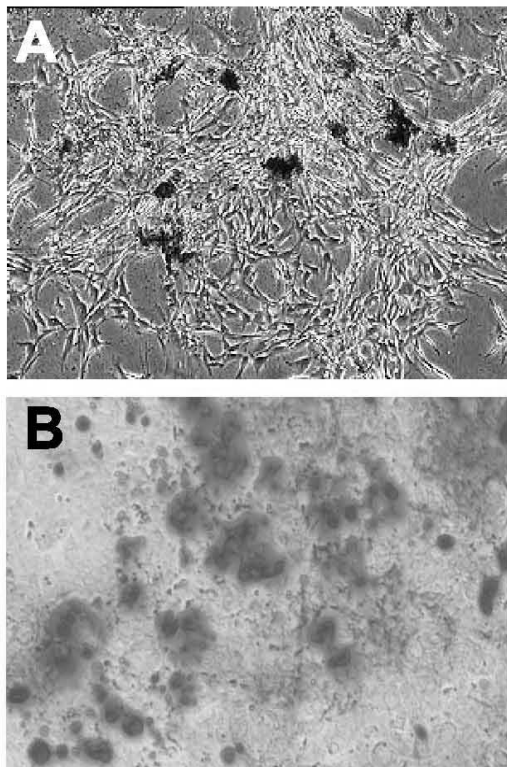


شکل ۱: سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان سگ. (A) ۵ روز پس از آغاز کشت اولیه: کلون سلول فیبروبلاستی در مرکز و سلول‌های ریز کروی در اطراف قابل مشاهده است. (B) هفته سوم کشت اولیه: سلول‌ها تمام سطوح ظرف کشت را پر کرده‌اند. (C) هفته دوم کشت اولیه یک جدول سلولی، تقریباً در مرکز تصویر دیده می‌شود (بزرگ‌نمایی ۱۰۰×، میکروسکوپ معکوس).

افتاد (شکل ۳C). قطرات چربی داخل سلول ها به دنبال رنگ آمیزی با Oil red O قرمز رنگ شد (شکل C و D) و آنالیز RT-PCR نشان داد که mRNA لیپوپروتئین لیپاز (LPL) و PPARG2 تولید شده است (شکل ۳E). شدت رنگ پذیری در رنگ آمیزی Oil Red O و همچنین، باند تشکیل شده در بررسی RT-PCR در ده سگ مورد مطالعه تفاوت چندانی نداشت.

تمایز کندروژنیک و ارزیابی آن

برش های ۵ میکرومتری تهیه شده از پلت تمایز به غضروف، با رنگ آمیزی Safranin O مورد ارزیابی قرار گرفتند که حاصل آن ارغوانی شدن جایگاه های غنی از گلیکوز آمینو گلیکان بود (شکل ۴A و ۴B). بررسی بیشتر با روش RT-PCR نشان داد که در توده سلولی تمایز یافته، از مارکرهاي اختصاصی غضروف، کلاژن II و Decorin بیان شده ولی مولکول Agreacan تولید نشده است (شکل ۴). شدت رنگ پذیری در رنگ آمیزی Safranin O و همچنین، باند تشکیل شده در بررسی RT-PCR در ده سگ مورد مطالعه تفاوت چندانی نداشت.



شکل ۲: تمایز به استخوان سلول مزانشیمی سگ. کشت سلول در پایان دوره تمایز (A) بدون رنگ آمیزی (B) با رنگ آمیزی آلیزارین رد که رنگ قرمز نشانگر مناطق معدنی شده است (بزرگنمایی $\times 100$ ، میکروسکوپ معکوس). (C) آنالیز RT-PCR نشانگر بیان ژن های شاخص استخوانی است. (مشاهده نمونه رنگی تصاویر در انتهای مقالات)

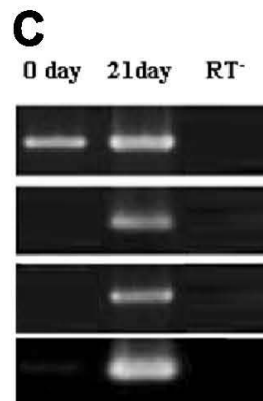
با انجام پاساژ سلولی، جمعیت سلول های دوکی افزایش و سلول های گرد کاهش یافت (شکل ۱B). در کشت اولیه و پاساژهای سلولی، در مناطقی ندول هایی مشاهده شد (شکل ۱C).

تمایز استئوژنیک و ارزیابی آن

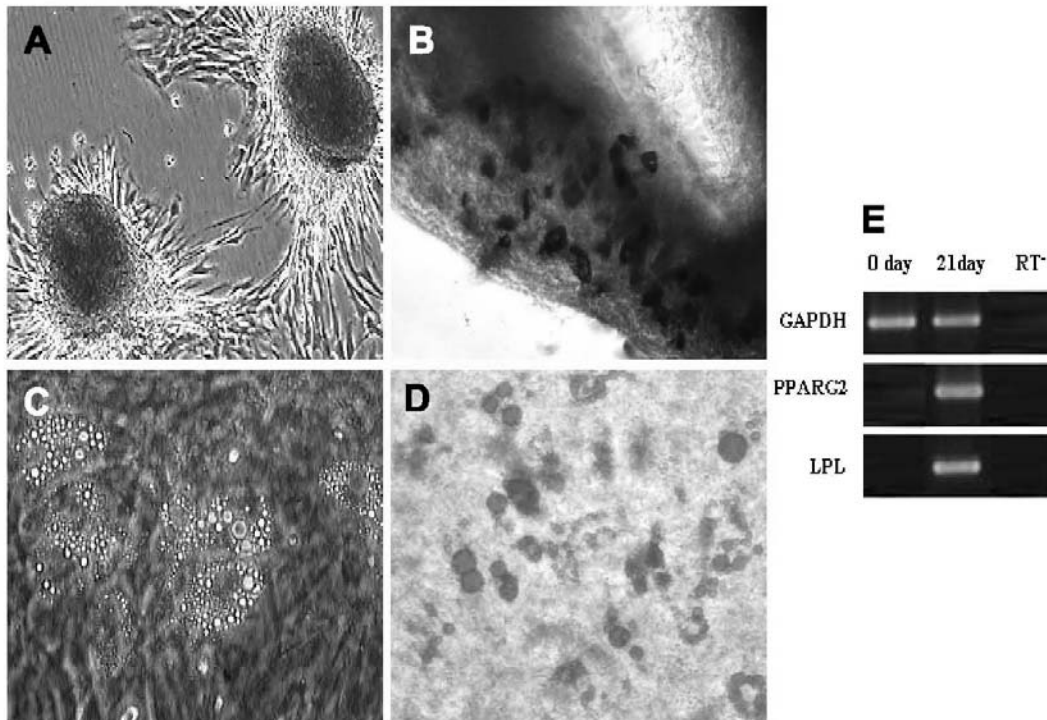
طی دوره تمایز استئوژنیک، در برخی مناطق کشت، توده های سلولی تشکیل شد (شکل ۲A). این توده ها به دنبال رنگ آمیزی آلیزارین رد، قرمز رنگ شد که حاکی از معدنی شدن ماتریکس بود (شکل ۲B). به علاوه نتایج RT-PCR حاکی از تولید ژن های ویژه بافت استخوانی شامل کلاژن تیپ IA1، IA2 و استئوپونتن بود (شکل ۲C). شدت رنگ پذیری در رنگ آمیزی آلیزارین رد و همچنین، باند تشکیل شده در بررسی RT-PCR در ده سگ مورد مطالعه تفاوت چندانی نداشت. مناطقی ندول هایی مشاهده شد (شکل ۱C).

تمایز آدیپوژنیک و ارزیابی آن

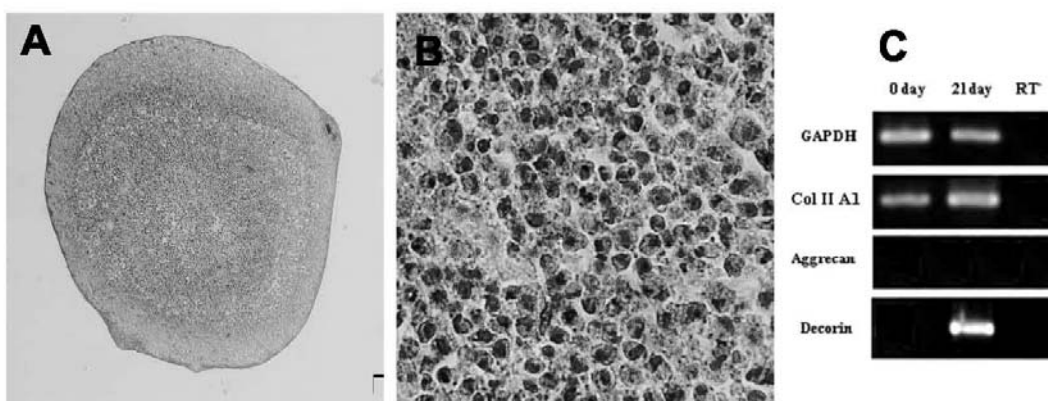
در برخی مناطق کشت، توده های سلولی تشکیل شد (شکل ۳A) و تمایز آدیپوژنیک در داخل آن (شکل ۳B) و تک لایه سلولی اتفاق



تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سگ



شکل ۳: تمایز به چربی سلول بنیادی مزانشیمی سگ. (A) در طی دوره تمایز در برخی مناطق ندول‌های سلولی تشکیل شد. (B) در اثر رنگ آمیزی با اوایل رد قطرات چربی در مناطق ندول مانند قرمز رنگ شد. (C) قطرات چربی در داخل سلول‌ها در مناطق تک لایه حتی بدون رنگ آمیزی نیز قابل مشاهده است. (D) این قطرات با رنگ آمیزی اوایل رد قرمز رنگ شد (بزرگنمایی $\times 100$ ، میکروسکوپ نوری معکوس). (E) نتایج RT-PCR حاکی از بیان ژن‌های شاخص چربی بود (بزرگنمایی $\times 100$ ، میکروسکوپ معکوس) (مشاهده نمونه رنگی تصاویر در انتهای مقالات).



شکل ۴: تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی غضروف. (A) برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شده از پلت سلولی در اثر رنگ آمیزی با سافرانین O ارفوانی شده است که نشانگر گلیکوز آمینو گلیکان فراوان در کشت سلولی است (بزرگنمایی $\times 30$ ، میکروسکوپ نوری). (B) سلول‌های غضروفی و ماتریکس آنها (بزرگنمایی $\times 400$ ، میکروسکوپ نوری). (C) آنالیز RT-PCR نشان داد که کلاژن تیپ II و ماکرومولکول Decorin به عنوان شاخص غضروف به فراوانی در کشت تولید شده است ولی ژن Aggrecan بیان نشده بود (مشاهده نمونه رنگی تصاویر در انتهای مقالات).

بحث

حدودی متفاوت است. به طوری که در کشت کندروژنیک سلول‌های مزانشیمی سگی، ماتریکس سرشار از گلیکوز آمینوگلیکان در لابه‌لای سلول‌ها تجمع یافته بود و mRNA کلاژن تیپ II و ماکرومولکول Decorin به میزان زیادی تولید شده بود ولی ژن آگریکان بیان نشده بود و این سلول‌ها از این نظر با سلول‌های انسانی و سایر رده‌ها که تولید آگریکان در تمایز کندروژنیک آنها گزارش شده است تفاوت داشتند.

با توجه به عدم تولید ماکرومولکول آگریکان در سلول‌های حاصل از تمایز کندروژنیک سگ و با در نظر گرفتن این نکته که این ماکرومولکول به عنوان ساختار اصلی ماتریکس غضروفی است می‌توان چنین استدلال کرد که غضروف حاصل از لحاظ ماتریکس ترشخی، بافتی نابالغ است و در نتیجه تمایز به غضروف سلول مزانشیمی سگ در سیستم *micro mass* به طور کامل انجام نمی‌گیرد. شاید این اساسی‌ترین تفاوت سلول مزانشیمی سگی با سایر رده‌ها باشد.

البته باید به این نکته توجه کرد که روش *Micro mass* تنها روش تمایز به غضروف نیست. برای تمایز کندروژنیک از روش کشت سلول بر روی داربست یا ماتریکس نیز استفاده شده است (۳۹-۴۶). شاید برای تمایز سلول‌های مزانشیمی سگی سیستم *mass Micro* مناسب نباشد و القای قوی‌تری نظیر استفاده از داربست و یا ماتریکس مناسب نیاز باشد. به هر حال این موضوع به مطالعه بیشتری نیاز دارد.

نتیجه‌گیری

روی هم رفته به نظر می‌رسد سلول مزانشیمی سگ همانند سلول مزانشیمی سایر رده‌ها نظیر انسان و موش پتانسیل تمایز به استخوان، چربی و غضروف را دارد ولی به نظر می‌رسد تمایز به غضروف این سلول‌ها در سیستم *micro mass* به طور کامل انجام نمی‌شود. به علاوه، در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی سگی بر خلاف سایر رده‌ها در زمان تکثیر و تمایز به چربی مناطق ندول مانند‌ی ظاهر می‌شود که علت این پدیده برای ما ناشناخته است و نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان سگ جداسازی و طی سه پاساژ متوالی تکثیر و تخلیص شد. این سلول‌ها، با فراهم شدن شرایط مناسب توانستند به رده سلول‌های استخوانی، چربی تمایز یابند. در شرایط کندروژنیک، mRNA کلاژن تیپ II و ماکرومولکول Decorin به میزان زیادی در سلول تولید شد ولی ژن آگریکان بیان نشد. در مطالعات پیشین، اغلب پتانسیل استروژنیک این سلول‌ها بررسی شده و پتانسیل تمایز به غضروف و چربی آنها به فراموشی سپرده شده است.

یکی از محدودیت‌های کار با سلول بنیادی مزانشیمی این است که برای این سلول‌ها مارکر ویژه‌ای شناسایی نشده است. اعتقاد بر این است که یکی از راه‌های حصول اطمینان از ماهیت بنیادی - مزانشیمی سلول، بررسی پتانسیل تمایز آن به دو یا چند رده سلولی است (۳۵-۳۳). این در حالی است که در مطالعات پیشین سلول‌های جدا شده از مغز استخوان سگ سلول مزانشیمی نامیده شده، بدون اینکه پتانسیل آنها در تمایز به سه رده استخوان و غضروف و چربی بررسی شود. مطالعه حاضر به پتانسیل‌های تمایزی سلول‌های فیروبلستی جدا شده از مغز استخوان سگ پرداخته است.

یکی از نتایج جالب تحقیق حاضر، رفتار سلول‌ها، در حین تکثیر بود. سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از مغز استخوان سگ، در کشت اولیه هنگام تکثیر، در مناطقی به شکل ندول‌های سلولی رشد کردند. البته این رفتار در پاساژهای سلولی نیز مشاهده شد. در کشت آدیپوژنیک نیز سلول‌های مزانشیمی در مناطقی به شکل ندول رشد کردند و در داخل این ندول‌ها سلول‌ها به آدیپوسیت تمایز شدند که این رفتار سلولی در گونه‌های دیگر گزارش نشده است. بر اساس مطالعات پیشین، سلول‌های مزانشیمی انسان و سایر رده‌ها، در کشت آدیپوژنیک در تمام مدت کشت به حالت تک لایه رشد می‌کنند (۲۵-۲۱).

بر اساس نتایج این مطالعه، چنین به نظر می‌رسد که تمایز به غضروف سلول‌های مزانشیمی سگی در مقایسه با انسان و سایر رده‌ها تا

References

- Prosper F, Perez A, Merino J, Rabago G Chachques J.C, Hernandez M, Barba J, Alegria E, Gavira JJ, Panizo A and Herreros J. Adult stem cells for myocardial repair. *Basic Appl Myol* 2003; 13(1): 15-22
- Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2): 745-753
- Fischbach GD, Fischbach RL. Stem cells: science, policy and ethics. *The J Clin Invest* 2004; 114(10): 1364-1369
- Bieback K, Kem S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem cells* 2004; 22: 625-634
- Short B, Brouard N, Scott T, Ramakrishnan A, Simmons P.J. Mesenchymal stem cells. *Arch of Med Res* 2003; 34: 565-571
- Yoshikawa T, Noshi T, Mitsuno H, Hattoei K, Ichijima K, Takakura Y. Bone and soft tissue regeneration by bone marrow mesenchymal stem cells. *Mater Sci Engin* 2001; 19-26
- Woodbury D, Schwaz E, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J of Neuro Sci Res* 2000; 61: 364-370
- Chen L-B, Jiang Xb, Yang. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10(20): 3016-

3020

9. Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, Laplante JM, Hatch HM, Petersen BE. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest* 2004; 84: 607-617
10. Minguell J.J, Erices A and Congent P: Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001; 226(6): 507-520
11. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of Adult Stem Cells derived from Bone Marrow Stroma into Leydig or Adrenocortical Cells. *Endocrinology*. 2006; 25 (Epub ahead of print)
12. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med*; 229: 623-631
13. Wangner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner V, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansoerge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005; 33: 1416-1420
14. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Solimani M, Tachikhani M, Shokrgozar MA. Isolation, culture and characterization of post natal human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *DARU* 2005; 13(4): 170-176
15. Friedenstein, AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403
16. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; 17: 331-340
17. Friedenstein AJ, Deriglasora UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Rudakow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay methods. *Exp Hematol* 1974; 2: 83-92
18. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci* 1988; 3: 63-76
19. Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng*. 2004; 32: 160-165
20. Mohyeddin Bonab M, Ailmoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavanzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 2006; 7: 1-7
21. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 2002; 3: 879-886
22. Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ, Azizi SA. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2539-2549
23. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Sturgeon C, Hewett T, Chaung T, Stock W, Sher D, Weissman S, Ferrerick J, Mosca J, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001; 29: 244-255
24. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large full thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1994; 76: 579-592
25. Awad HA, Butler DL, Bolvine GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI. Autologous mesenchymal stem cells mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 1999; 5: 267-277
26. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Haupt T, Sittlinger M. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 321-327
27. Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, Davis-Sproul J, Chauang LC, Majumdar MK, Chopra R, Barry F, Murphy M, Thiede MA, Junker U, Rigg RJ, Forestell SP, Bohnlein E, Storb R, Sandmaier BM. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clin Orthop* 2000; 379: 71-90
28. Jessop HL, Noble BS, Cryer A. The differentiation of a potential mesenchymal stem cells population within ovine bone marrow. *Biochem. Soc Trans* 1994; 22: 248
29. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri, S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev. Growth. Differ*

2006; 48: 361-370

30. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*. 1997; 6(2): 125-134

31. Volk SW, Diefenderver DL, Christopher SA, Haskins ME, Leboy PS. Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1729-1737

32. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The Effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg* 1998; 80: 958-996

33. Seshi B, Kumar S, Sellers D. Human bone marrow stromal cells: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26: 234-246

34. Majumdar MK, Thiede MA, Hynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated

toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9: 841-848

35. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express gene encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanism. *Circ Res* 2004; 678-685

36. Johnstone B. Mesenchymal stem cells and chondrogenesis. *Europ Cell Mat* 2002; 27

37. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998; 4, 415-428

38. Cheung HS. In vitro cartilage formation on porous hydroxyl apatite ceramic granules. *In Vitro Cell Dev Biol* 1985; 21: 353-357

39. Van susante JL, Buma P, Van osch GJ, Versleyen D, Van Der Kraan PM, Van Der Berg WB, Homminga GN. Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand* 1995; 66: 549-556