Archive of SID

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۱، شماره ۱، بهار ۱۳۸۵
صفحات: ۲۹-۳۹

جداسازی و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش NMRI

محمدرضا باغبان اسلامی نژاد*.Ph.D ، آق بی بی نیک محضر*.M.Sc ،
صمد ندری**.B.Sc ، لیلا تقی یار ***.B.Sc

چکیـده

هدف: جداسازی و تکثیر سلولهای مزانشیمی از مغز استخوان موش NMRI و مطالعه عوامل‌مؤثر بر تکثیر آن در محیط کشت.

روش بررسی: موشهای NMRI با سن تقریبی ۶-۴ هفته کشته شدند و مغز استخوان از فموروتیبیا خارج گردید. سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان بوسیله سانتریفوژ گرادیان جدا شده و در فلاسک‌های ۲۵ سانتیمتری کشت گردید. یک هفته پس از آغاز کشت اولین پاساژ انجام گرفت و سلول‌ها با تراکم بسیار پایین در ظروف شش خانه‌ای کشت گردید و این کشت تا زمان ظهور سلول‌های فیبروبلاستی نگهداری شد و پس از آن پاساژهای متوالی انجام گرفت و سلول‌های پاساژ چهارم منجمد شد و برای مطا لعات بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. برای اثبات مزانشیمی بودن سلولهای جدا شده، از تست تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. برای تعیین بهترین درصد سرم از لحاظ تأثیر بر تکثیر سلولی، درصدهای مختلف آن بررسی شد و نیز برای تعیین بهترین تراکم سلولی در آغاز کشت که بتواند بیشترین تکثیر سلول را ایجاد کند، تراکم‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان کلونوژنیک بودن سلولها با روش سنجش واحد تشکیل کلونی (Colony Forming Unit- Fibroblast: CFU-F) تست‌شد.

یافته‌ها: از لحاظ مورفولوژی سلولی، کشت اولیه سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان موش هتروژن بوده و از سلولهای دوکی، پهن و ستاره‌ای تشکیل یافته بود. دو هفته پس از آغاز پاساژ اول، جمعیتی از سلول‌های فیبروبلاستی (تقریباً دوکی شکل) با قدرت تکثیر بالا ظاهر شد. با انجام پاساژهای متوالی تعداد سلول‌های فیبروبلاستی افزایش یافت. این سلولها ۳ هفته پس از قرار گرفتن در محیط استئوژنیک و آدیپوژنیک، به سلولهای استخوانی و چربی تمایز یافتند. بیشترین تکثیر سلولی در شرایط کشت با تراکم ۱۰۰ سلول در سانتیمتر مربع و در محیط حاوی ۱۵٪ سرم گاوی اتفاق افتاد. بر اساس نتایج سنجش واحد تشکیل کلونی، به ازای هر ۱۰۰ سلول بطور متوسط ۷۰ کلون رشد کرد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان موش با تراکم پایین، روشی مناسب برای جداسازی سلول‌های مزانشیمی باشد. سلول‌های جدا شده با این روش به راحتی به استخوان و چربی تمایز می‌یابند و زمانی که با غلظت ۱۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع در محیط حاوی ۱۵٪ سرم کشت می‌یابند، بیشترین تکثیر را دارند.

واژه‌های کلیدی: موش NMRI ،سلول مزانشیمی، تمایز به استخوان و چربی ، تکثیر سلول

دریافت مقاله: ۸۴/۷/۲۶ پذیرش مقاله: ۸۴/۱۲/۱۶

* نویسنده مسئول: گروه سلولهای بنیادی: پژوهشکده رویان، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۱۴۶۴۴، تهران ـایران ،* گروه سلولهای بنیادی: پژوهشکده رویان، ** دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور ، واحد تهران *** دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه خرم آباد
آدرس پست الکترونیکی: bagesla@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سلول مزانشیمی نوعی سلول بنیادی بالغ بوده و برای نخستین‌بار توسط Friedenstein و همکاران (۱۹۷۴)، از مغز استخوان جدا گردید. این محققین با توجه به شکل فیبروبلاستی و خاصیت تشکیل‌کلون، نام واحد تشکیل دهنده کلونی- فیبروبلاست (Colony Forming Unit-Fibroblast; CFU-F) را بر آن نهادند. (۱،۲) سالها بعد، محققین پرتوان بودن آنها را در تمایز به استخوان، غضروف، چربی و سلول عضلانی به اثبات رساندند. (۳-۶). سلولهای فیبروبلاستی مغز استخوان در طی سالها به تدریج با اسامی دیگری از قبیل سلولهای داربستی مغز استخوان (Marrow Stromal Cell; MSC)، سلولهای پروژنیتور مغز استخوان (Marrow progenitor cell; MPC)، سلولهای فیبروبلاستی مغز استخوان (Marrow Stromal Fibroblast ;MSF) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem cell; MSC) نیز خوانده شده‌اند. (۷،۵-۹)

سلولهای بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن خاصیت خود تجدیدی (Self Renewal) و توان تمایز به بافتهای اسکلتی منبع مناسب برای درمان تعدادی از بیماری‌ها تلقی می‌شود. (۱۰) کارآیی آنها در درمان بیماری ژنتیکی Osteogenesis Imperfecta ، بهبود خونسازی در بیماران سرطانی تحت درمان، بازسازی استخوان، ترمیم محل نکروز در بیماران انفارکتوس و درمان بیماریهای مفصلی به خوبی نشان داده شده است. (۱۰-۱۶) همچنین تحقیقات پیشین انعطاف و شکل‌پذیری (plasticity) سلولها را در تمایز به سلولهای عصبی، پوششی پوست، ریه، کبد، روده، کلیه و طحال به اثبات رسانده است. (۱۷،۱۸)

با وجود اهمیت سلولهای مزانشیمی در سلول درمانی هنوز برخی از جنبه‌های زیست‌شناختی سلول از قبیل ماهیت، منشاء تکوینی و عملکرد in vivo ناشناخته است. (۱۹) مهم‌تر اینکه میزان سلامت و کارآیی سلول‌های مزانشیمی در زمان پیوند بدرستی مشخص نشده است و این موضوع، مطالعات بیشتری می‌طلبد. انجام این قبیل تحقیقات به ویژه در مدلهای حیوانی اهمیت فراوانی دارد. برای مطالعه سلول مزانشیمی اولین قدم ، جداسازی و تکثیر آنها از نمونه‌های مغز استخوان است که این امر در تعدادی رده حیوانی با موفقیت انجام گرفته است. (۲۰-۲۸) در حالی که در مورد موش، به عنوان مدل ارزشمند فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک پستانداران، مطالعه سلول‌های مزانشیمی با مشکلاتی از قبیل آلودگی به سلولهای غیر مزانشیمی (خونساز، اندوتلیال و ماکروفاژ) و توقف تکثیر سلولی همراه است. (۲۹،۳۰) به همین دلیل، محققین همواره درصدد یافتن راهی مناسب برای جداسازی، تخلیص و تکثیر سلولهای مزانشیمی از مغز استخوان موش بوده‌اند و در این رابطه روشهای مختلفی از قبیل‌حذف سلولهای غیرمزانشیمی با روش تهی سازی ایمنی (Immunodepleting) و یا استفاده از مواد سایتو توکسیکی که تنها بر سلول‌های ماکروفاژ اثر نماید، پیشنهاد شده است. (۳۱،۳۲)

مطالعه حاضر به سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش NMRI می‌پردازد. در مرحله اول تحقیق، این سلول‌ها با روش نوین، جداسازی شدند و در پاساژ چهارم منجمد گردیدند. در مرحله بعد سلول‌ها ذوب شدند و پتانسیل آنها در تمایز به استخوان و چربی بررسی شد. علاوه بر آن در تحقیق حاضر نقش چندین عامل موثر بر تکثیر سلول‌های مزانشیمی مطالعه شده است.

روش بررسی

جداسازی، تکثیر و انجماد سلولهای مزانشیمی .

موشهای نژاد NMRI با سن تقریبی ۶-۴ هفته با روش در رفته کردن مهره‌های گردنی(cervical dislocation) کشته شدند. استخوانهای ران و درشت نی جداگردید و تاحد امکان عضلات و بافت نرم اطراف پاک شد و داخل محیط Dulbeco's Modified Eagles Medium Gibco;Germany) DMEM) محتوی ۱۵٪ FBS (Fetal Bovine Serum;Gibco;Germany) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین (Gibco, Germany) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین (Gibco, Germany) قرار داده شد. لوله محتوی استخوانهای ران و درشت نی بر روی یخ قرارداده شده و به زیر هود استریل منتقل گردید. دو انتهای استخوانها قطع گردیده و با استفاده از سرنگ و سرسوزن شماره۲۲

www.SID.ir

Archive of SID

مغز استخوان خارج گردید و در۲ میلی‌لیتر PBS (Dulbeco Phosphate Buffer Solution,Gibco, UK) حل گردید. محلول حاصل بر روی ۱/۵ میلی لیتر Lymphodex قرار گرفت و به مدت نیم ساعت تحت ۱۱۰۰ g سانتریفوژ شد و آنگاه لایه سلول‌های تک هسته‌ای جمع آوری شده، پس از دوبار شستشو با سانتریفوژ (۱۲۰۰ دور در دقیقه، ۵ دقیقه) در داخل فلاسک‌های ۲۵ سانتیمتری کشت گردیدند. به ازای هر استخوان دراز یک فلاسک ۲۵، استفاده شد. محیط مورد استفاده DMEM حاوی ۱۵٪ FCS و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین بود. یک هفته پس از آغاز کشت پاساژ اول انجام گرفت. بدین‌ترتیب که با استفاده از Trypsin- EDTA (ibco,Germany) سلولها از محیط کشت جدا گردیدند و به صورت ۵۰۰ سلول در خانه در ظروف شش خانه‌ای کشت گردیدند. پس از گذشت دو هفته پاساژ دوم انجام گرفت و سلولهای هر خانه به یک فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی منتقل شد. یک هفته بعد پاساژ سوم انجام گرفت بدین ترتیب که سلولها تریپسینه شدند و محتویات یک فلاسک ۲۵ به دو فلاسک ۲۵ منتقل‌گردید و این سلولها پس از تکثیر و پوشاندن سطح ظرف تحت عنوان پاساژ چهارم منجمد گردیدند.

برای انجماد از ترکیب۳۰٪ (Dimethyl Sulfoxide: Sigma, USA) DMSO ، ۵٪ FCS و ۶۵٪ محیطDMEM استفاده گردید. هر فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع به پنج ویال انجماد تقسیم شد.

تمایز به استخوان و چربی . سلولهای پاساژ چهارم پس از ذوب با تراکم ۱۰۰ سلول در سانتیمتر مربع در ظروف ۶ خانه‌ای و با استفاده از محیط DMEM حاوی ۱۵٪ سرم گاوی و آنتی‌بیوتیک کشت شدند. پنج روز پس از آغاز کشت محیط سلولها با محیط تمایز به استخوان یا چربی جایگزین شد. محیط تمایز به استخوان شامل DMEM محتوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Ascorbic Acid 2-phosphate (Sigma, USA) ۱۰ نانو مولار Dexamethasone (Sigma;USA) و ۱۰ میلی‌مولار B-Glycerol Phosphate (Sigma, USA) بود و محیط تمایز به چربی شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Ascorbic Acid 2-phosphate (Sigma, USA) ۱۰۰ نانو مولار Dexamethasone (Sigma;USA) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Indomethacine (Sigma, USA) بود. در پایان‌هفته سوم کشت، تمایز سلولها مورد ارزیابی قرار گرفت برای استخوان از روش آلیزارین رد و چربی ازروش اویل رد (Oil-red) استفاده گردید.

رنگ‌آمیزی آلیزارین رد . تک لایه سلولی با PBS شسته شده و به مدت ۱۰ دقیقه با متانول (Merck, Germany) فیکس گردید و سپس با محلول رنگی (۱٪ الیزارین رد اس در آب آمونیاکی ۲۵٪) به مدت ۲ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. سلولها با آب مقطر شسته شده و خشک گردیدند.

رنگ‌آمیزی Oil Red . سلولها به مدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین ۴٪ فیکس شدند و سپس با الکل ۷۰٪ شسته شده و به مدت ۱۵ـ۱۰ دقیقه با محلول Oil Red ۰/۵٪ در ۹۹٪ الکل ایزوپروپانول رنگ‌آمیزی گردیدند و در انتها محلول رنگی خارج گردید و با الکل ۷۰٪ درصد، سه بار شستشو انجام گرفت.

غلظتهای مختلف سرم . رشد و تکثیر سلولهای مزانشیمی موش وابسته به حضور سرم در محیط کشت می‌باشد. برای تعیین بهترین غلظت‌سرم، درصدهای مختلف آن (۵٪، ۱۰٪، ۱۵٪، ۲۰٪) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب که ۱۰۰ سلول درسانتی‌متر مربع در ظروف ۶۰ میلی متری با غلظتهای مختلف سرم کشت گردید و پس از یک هفته، تعداد آنها شمارش گردید این عمل ۱۵ بار تکرار گردید و نتایج با روش آماری One way ANOVA مقایسه شد.

تراکم سلولی . از آنجایی که تعداد سلول استفاده شده در شروع کشت، بر میزان تکثیر سلول موثر است، سلول‌های پاساژ چهارم با تراکم های ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۵۰۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع در دیش‌های ۶۰ میلی‌متری کشت شد و به مدت یک هفته در شرایط ۳۷ درجه و ۵٪ CO2 نگهداری شد در پایان این مدت سلول‌ها با استفاده از تریپسین جدا گردیدند و مورد شمارش قرار گرفتند. این‌عمل ۱۵ بار تکرار گردید. نتایج حاصل با روش One Way ANOVA آنالیز شد.

CFU-F Assay . برای ارزیابی قدرت تکثیر سلولهای جداشده،

www.SID.ir

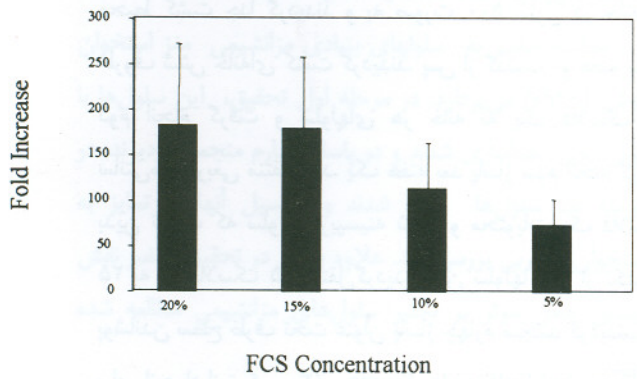
Archive of SID

از روش سنجش واحد کلونی فیبروبلاستی استفاده شد بدین ترتیب که ۱۰۰ سلول از پاساژ چهارم شمارش گردید و در یک دیش ۶۰ میلی‌متری به مدت یک هفته کشت گردید. در انتهای دوره کشت، سلولها با استفاده از کریستال ویولت ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه رنگ شدند و کلونهای حاصل شمارش‌شد.

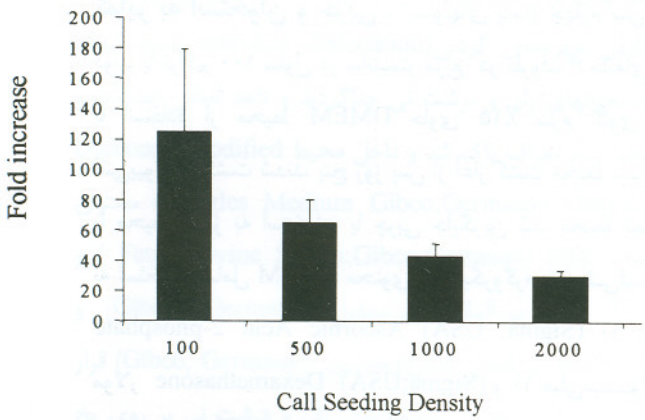
یافتـه‌هـا

کشت سلول . ۲۴ ساعت پس از آغاز کشت، با تعویض محیط، سلولهای شناور دور ریخته شدند و سلولهای چسبنده با تکثیر و تشکیل کلون منشاء کشت اولیه گردیدند. کلونها ابتداً از چند سلول تشکیل شده بود و به تدریج در طی دوره کشت، تعداد سلول آنها افزایش یافت. در پایان روز هفتم هر فلاسک حاوی ۲۵ـ۲۰ کلون بود. سلولهای تشکیل دهنده کلونها، از لحاظ مورفولوژی هتروژن بوده و از سلول‌های دوکی، ستاره‌ای و چند وجهی تشکیل یافته بود (شکل ۱الف). در مواردی برروی کلونها سلولهای ریزی (احتمالاً خونساز) سوار بودند. با ادامه کشت اولیه به مدت بیش از ۷ روز تعداد سلولهای ریز روی کلونها زیاد شد به طوریکه در پایان روز ۲۰ تقریبا تمام سطح کشت از این سلولها پوشیده بود (شکل ۱ ب). به همین دلیل‌در مطالعه حاضر، کشت اولیه سلول، در پایان روز هفتم، با انجام اولین پاساژ خاتمه داده شد. سلولها در پاساژ اول با تراکم پایین (۵۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع) کشت شدند. سلولهای فوق به سطح ظرف کشت چسبیدند و پس از چند روز تکثیر آغاز شد. در این زمان اکثر سلولها چند وجهی و نسبتاً پهن بودند (شکل ۱ پ) و میزان تکثیر پایین بود. در طی هفته دوم، به صورت ناگهانی، کلونی از سلولهای دوکی با توان تکثیر بالا ظاهر گردید. در پایان هفته دوم ۶۰-۷۰٪ سطح کشت پر شد. در این زمان پاساژ دوم انجام گرفت. سلولها به سطح کشت چسبیده و کلونهایی از سلولهای دوکی ایجاد شد و در طی یک هفته ظرف کشت پر شد و آماده پاساژ سوم گردید (شکل ۱ج). سلولهای پاساژ سوم پس از ۵ روز به مرحله confluency رسیدند (شکل ۱چ) و در نتیجه پاساژ چهارم انجام گرفت. سلول‌های پاساژ چهارم (شکل ۱ح) منجمد شد و در مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

تمایز به استخوان و چربی . سلولهای پاساژ چهارم که به مدت ۳ هفته در معرض محیطهای استخوانساز و آدیپوژنیک قرار گرفته بودند، به طور چند روز در میان با میکروسکوپ معکوس مورد مشاهده قرار گرفتند. در طی این مدت تعدادی از سلول‌های مزانشیمی از سطح ظرف کشت جدا گردیده در محیط کشت شناور شدند. این امر بیشتر در حواشی ظرف کشت مشاهده شد. همچنین مورفولوژی سلولها در محیط تمایز دستخوش تغییر شد. بدین ترتیب که این سلولها با ادامه دوره تمایز در بعضی مناطق متراکم‌تر شدند و مناظر نودول مانند ایجاد گردید. در پایان



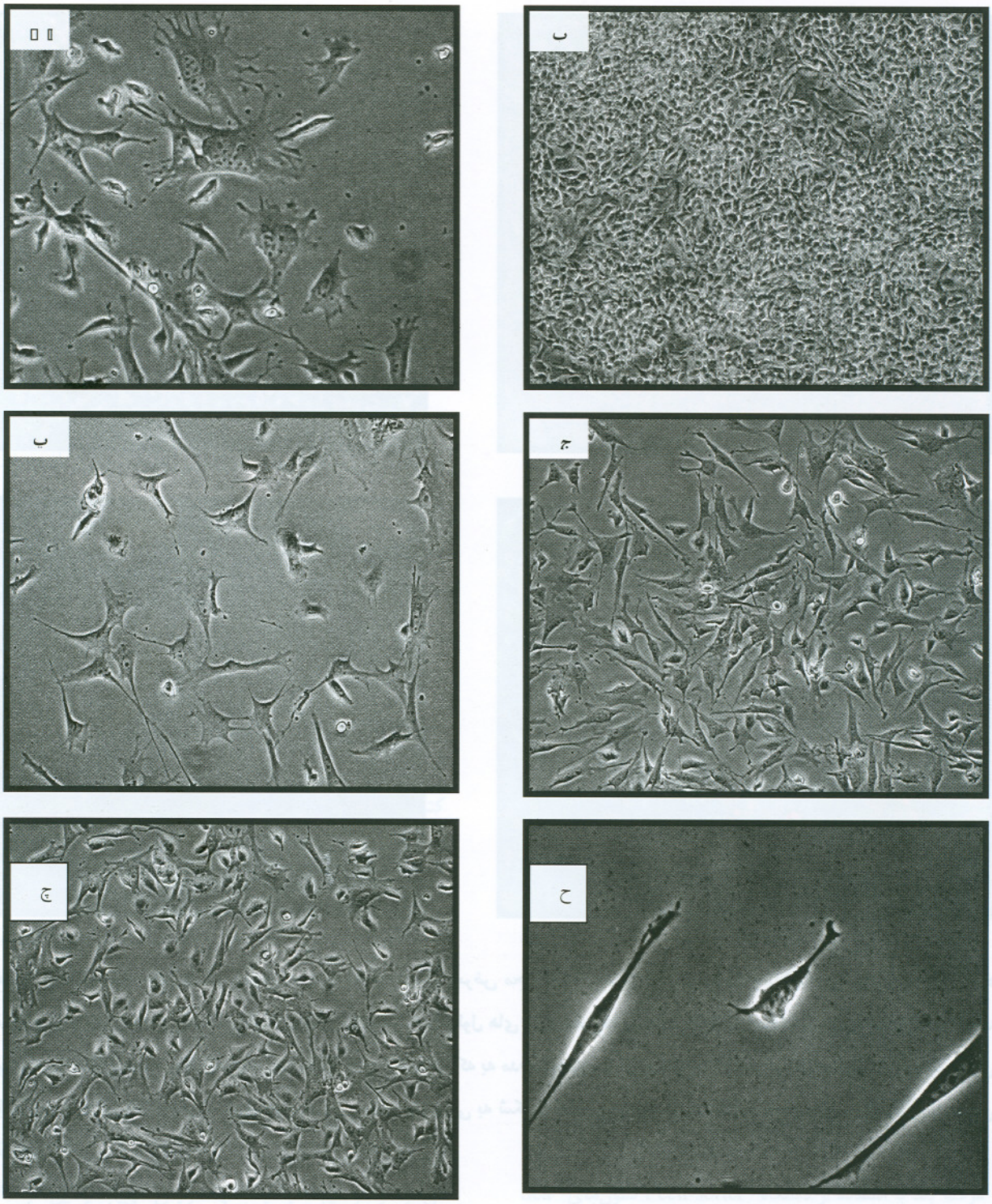
نمودار ۱: تاثیر غلظتهای مختلف سرم گاوی بر تکثیر سلولهای مزانشیمی موش



نمودار۲: تاثیر غلظت های مختلف سلول در آغاز کشت بر تکثیر سلولهای مزانشیمی موش

www.SID.ir

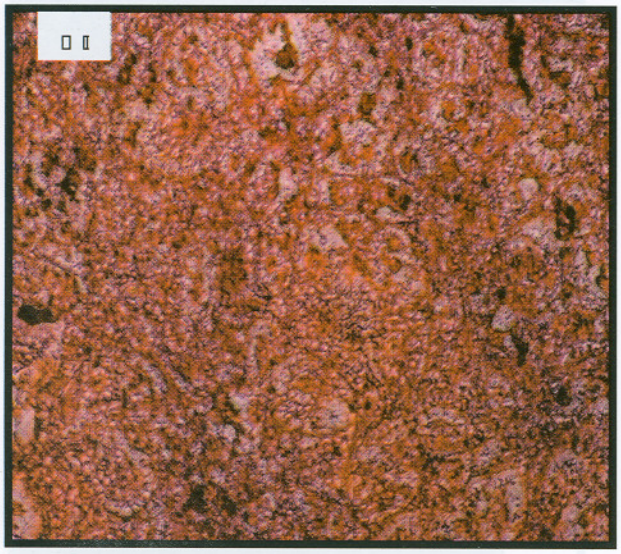
Archive of SID

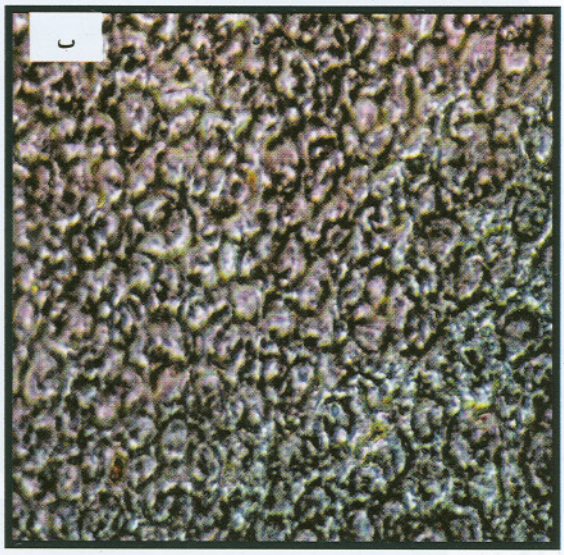


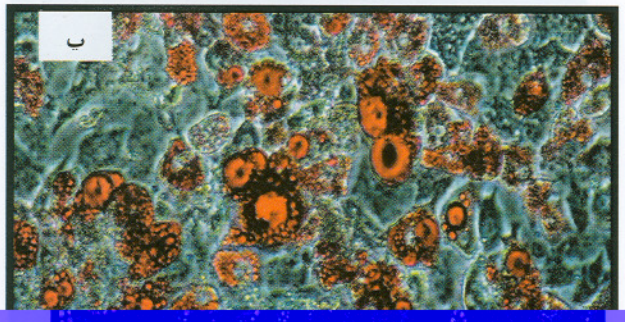
شکل۱:الف)کشت اولیه سلول های تک هسته ای مغز استخوان موش:جمعیت سلولی از لحاظ مورفولوژی ناهمگون است(روز چهارم کشت ،میکروسکوپ فاز کنتراست،بزرگنمایی۱۰۰).ب)کشت اولیه:سلول های ریز با مورفولوژی اپیتلیوییدی بر کشت غالب شده است(روز ۱۷ کشت ،میکروسکوپ فاز کنتراست،بزرگنمایی ۱۰۰).پ)سلول ها در اولین پاساژ: بیشتر سلول ها چند وجهی هستند(روز پنجم کشت،میکروسکوپ فاز کنتراست،بزرگنمایی۱۰۰).ج وچ) به ترتیب پاساژ دوم و سوم: به دنبال کشت با تراکم پایین تعداد سلول های دوکی افزایش یافته است (روز ششم کشت،میکروسکوپ فاز کنتراست،بزرگنمایی۱۰۰).ح)سلول های پاساژ چهارم. مورفولوژی دوکی شکل سلول بخوبی مشخص است (۲۴ ساعت پس از آغازکشت، میکروسکوپ فاز کنتراست ، بزرگنمایی۲۰۰).

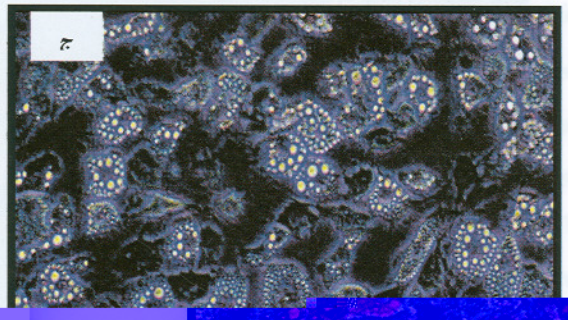
www.SID.ir

Archive of SID









شکل ۲ : الف)سلول های پاساژ چهارم که به مدت ۳ هفته در معرض محیط استخ
اند.این روش مواد معدنی شده را رنگ می کند. ب)گروه کنترل:سلول های مزانشیمی
شده اند و با آلیزارین رد رنگ نگرفتند. پ) سلول های مزانشیمی که به مدت ۳ هفته
با روش Oil Red به رنگ قرمز در آمده اند. ج)قطرات چربی به شکل رنگ نـ
است (بزرگنمایی ۱۰۰).

دوره تمایز، تمایز سلولی با روش رنگ آمیزی آلیزارین رد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتیجه آن قرمز شدن مواد خارج سلولی معدنی شده در بافت استخوان بود (شکل ۲ الف و ب) . در محیط تمایز به چربی نیز تعدادی از سلول‌های مزانشیمی بویژه در بخش‌هـای حاشیه‌ای ظرف کشت از تکیه گاه خود جدا شدند و به حالت شناور

قرار گرف
به تدریج
برای اثبا
گردید. د
(شکل ۲

وانساز قرار گرفته اند و با آلیزارین رد رنگ آمیزی شده
ی که به مدت ۳ هفته با محیط معمولی (DMEM) کشت
در معرض محیط آدیپوژنیک قرار گرفتند و قطرات چربی
شده به وضوح در داخل سلول های چربی قابل تشخیص

تند. قطرات ریز چربی از روز ۴-۳ دوره تمایز ظاهر شده
بزرگ گردیدند (شکل ۲ج).
ت چربی بودن این قطرات از رنگ‌آمیزی Oil red استفاده
ر اثراین رنگ‌آمیزی قطرات فوق به رنگ قرمز ظاهر شدند
پ).

Archive of SID

غلظت سرم . این آزمایش با ۱۵ بار تکرار انجام شد. سلولها در گروه با غلظت ۱۵٪ سرم با ۵ p<./. به طور معنی‌داری بیشترین تکثیر را داشتند.گروه سرم ۱۵٪ تفاوت معنی‌داری با گروه سرم ۲۰٪ وجود نداشت (نمودار ۱).

تراکم سلولی . آزمایش تراکم سلولی نیز با ۱۵ بار تکرار آزمایش انجام شد. نتایج آن در نمودار ۲ آمده است. براساس نتایج حاصله، گروه کشت با تراکم۱۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع با P<./۱ به‌طور معنی‌داری بیشترین تکثیر را نشان داد.

CFU-F Assay : براساس نتایج حاصله به ازای هر ۱۰۰ سلول کشت یافته به‌طور متوسط ۷۰ کلون تشکیل یافت.

بحـــث

در مطالعه حاضر سلولهای تک‌هسته‌ای مغز استخوان موش در پاساژ اول با تراکم پایین کشت گردیدودر طی چند پاساژ متوالی جمعیت نسبتاً خالصی از سلول‌های تقریبا دوکی مزانشیمی تهیه گردید. با وجودی که مطالعه سلول‌های مزانشیمی در موش به عنوان یک مدل تحقیقاتی اهمیت فراوانی دارد، جداسازی سلولهای مزانشیمی آن با مشکلاتی همراه است مطالعات پیشین نشان داده است که در محیط کشت این سلول‌ها اغلب، سلول‌هایی با مورفولوژی ستاره‌ای وچند وجهی (احتمالاً ماکروفاژ، اندوتلیال و خونساز) رشد نموده و پس از مدت کوتاهی بر جمعیت سلول‌های فیبروبلاستی (مزانشیمی) غالب شده و سطح کشت را فرا می‌گیرد. (۲۹،۳۰) برای حل این مشکل محققین روش‌های متفاوتی را بکار برده اند. Van Vlasselaer و همکاران (۱۹۹۴)، از حضور دو مولکول سطح سلولی برای جدا سازی سلول‌های مزانشیمی سود بردند بدین ترتیب که ابتدا سلولهای مغز استخوان موش با آنتی بادی Sca-1 و Wheat germ agglutinin رنگ شد و در مرحله بعد با استفاده از دستگاه cell-sorter ، سلول‌های Sca^+ و $Wheat\ germ\ agglutinin^+$ جدا گردید و کشت شد که حاصل آن سلول‌های دوکی با توان تمایزی به بافت‌های استخوان و چربی بود. ایراد این روش پایین بودن توان زیستی سلول‌های جدا شده بود. (۳۳) Modderman و همکاران (۱۹۹۴) سلول‌های مغز استخوان موش را کشت دادند و در مرحله بعدی با به کارگیری تیوسیانات پتاسیم، سلول‌های ماکروفاژ و خونساز را حذف کردند. (۳۲) Baddoo و همکاران، برای حذف جمعیت سلول‌های غیر دوکی غیر مزانشیمی از روش تهی‌سازی ایمنی (Immunodepleting) استفاده کردند. (۳۴) بدین ترتیب که ابتدا سلول‌های مغز استخوان را کشت دادند و در زمان اولین پاساژ با استفاده از دانه‌های آهن ربایی متصل به آنتی‌بادیهای CD45, CD34 و MAC1 سلول‌های غیر مزانشیمی را حذف نمودند. ایرادی که به این دو روش وارد است این است که در هردو روش، یک عامل خارجی (آنتی بادی یا مواد سایتو توکسیک) به منظور تخلیص سلول‌های مزانشیمی وارد کشت سلول می‌شود و چه بسا همین عوامل بر سلول‌های مزانشیمی تاثیرات منفی داشته باشند. در مطالعه حاضر سلول‌های مزانشیمی بدون دخالت عوامل خارجی و تنها با فراهم کردن شرایط کشت با تراکم پایین جدا شده است. اینکه در شرایط کشت با تراکم پایین چگونه سلول‌های مزانشیمی از میان انواع سلول‌های مغز استخوان متشکل از خونی و خونساز، ماکروفاژ و اندوتلیال انتخاب شده تکثیر می‌یابد و بر کشت غالب می‌گردد برای ما نیز بدرستی شناخته نشده است. به نظر می‌رسد این پدیده با تحریک تکثیر سلول‌های مزانشیمی تحت شرایط کشت با تراکم پایین در ارتباط است. آنچه واقعیت دارد این است که تعداد این سلول‌ها در مغز استخوان بسیار اندک بوده و مطالعات پیشین نشان داده است که به ازای هر میلیون سلول هسته‌دار مغز استخوان ۵-۲ سلول مزانشیمی وجود دارد. بنابراین در کشت با تراکم بالا طبیعی است که سایر سلول‌ها در مدت زمان کوتاهی کشت سلول را پر نمایند. زمانی که سلول‌ها با تراکم ۵۰۰ سلول در سانتیمتر مربع کشت می‌شوند، تراکم سلولی (اعم از دوکی ، ستاره‌ای و پهن) در محیط کشت کاهش می‌یابد. تحت چنین شرایطی تکثیر سلول‌های دوکی مزانشیمی به شدت تحریک می‌شود و در نتیجه جمعیت آنها افزایش می‌یابد و این در حالی است که سلول‌های غیر مزانشیمی به این شرایط حساس نبوده و حضور آن‌ها با گذشت زمان کم رنگ تر می‌شود. به هر حال صرف نظر از مکانیسم عمل، این روش جدا سازی بسیار ساده و کم‌هزینه بوده ودر مدت زمان نسبتاً کوتاهی جمعیت خالصی از سلول‌های دوکی مزانشیمی تولید می‌کند. در تحقیق حاضر عوامل

www.SID.ir

Archive of SID

موثر بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی و پتانسیل تمایز به استخوان و چربی آنها نیز بررسی گردید. با توجه به نتایج CFU-F ، سلول‌های جدا شده در مطالعه حاضر توان کلونوژنیک نسبتاً بالایی داشتند. با کشت ۱۰۰ سلول در سانتیمتر مربع در محیط حاوی ۱۵٪ سرم بیشترین تکثیر سلولی اتفاق افتاد و نیز سلولهای فوق براحتی به استئوبلاست و سلول چربی تمایز یافتند. این اولین گزارش در مورد سلولهای بنیادی مزانشیمی موش NMRI است. مطالعات پیشین نشان داده است که برخی ویژگی‌های سلولهای مزانشیمی در موش منحصر به نژاد (Strain Specific) است و نژادهای مختلف نیازهای کشت متفاوتی دارند. به‌طوری که سلولهای مزانشیمی برخی از نژادها به راحتی تکثیر می‌شود و برخی دیگر رشد کندی دارد. سلولهای مزانشیمی جدا شده از موش BL/6 و DBA1 به راحتی به سلولهای چربی تمایز نمی‌یابند و تمایز سلولهای مزانشیمی جدا شده از BALB/c و FVB/N به استخوان سخت است. (۳۵)

براساس نتایج مطالعه حاضر، در مواردی که کشت اولیه بیش از ۷ روز ادامه یافت، سلول‌های نسبتاً ریز غیر دوکی بر روی تک لایه سلول‌های دوکی قرار گرفتند و بتدریج بر کشت سلول غالب گردیدند. این وضعیت در کشت سلول‌های مزانشیمی از خون بند ناف انسان توسط Romanov و همکاران نیز گزارش شده است. محققین فوق معتقدند که این سلول‌ها اندوتلیال بوده و از دیواره عروق نافی بداخل خون رها شده‌اند. (۳۶) با توجه به اینکه سلول‌های مطالعه حاضر از مغز استخوان که حاوی میزان زیادی عروق خونی است جدا شده، احتمال اندوتلیال بودن سلول‌های فوق دور از ذهن نیست ولی شواهد موجود تا حدودی فرض هماتوپویتیک بودن را نیز تقویت می‌کند. با توجه به مشاهدات مطالعه حاضر همزمان با پیدایش سلول‌های فوق جمعیت سلول‌های شناور در محیط کشت بطور قابل توجهی افزایش یافت شاید اینها سلولهای خونسازی بودند که مشابه با حالت in vivo با انجام تعامل با سلولهای مزانشیمی تکثیر یافته و با تمایز به سلولهای بالغ به داخل محیط کشت رها می‌شدند. یکی از جنبه‌هایی که در ارتباط با سلول مزانشیمی تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده، مارکرهای منحصر به فرد سطح سلول می‌باشد. مطالعات پیشین نشان داده است که این سلولها ویژگی‌های مشترکی با سلولهای اندوتلیال، اپی‌تلیالی و عضلانی دارند و در نتیجه آنتی‌ژن‌های سطحی متنوعی را بیان می‌کنند. (۳۷-۳۹) با این وجود در ارتباط با سلولهای مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان انسان، مارکر STRO-1 به عنوان مارکر قابل اطمینان برای جداسازی و تخلیص آنها مورد بهره‌برداری قرار گرفته است ولی در مورد سلولهای موش هیچ‌گونه مارکر ویژه معرفی نشده است. بنابراین تنها ویژگی‌که می‌تواند مزانشیمی بودن سلولهای جدا شده از مغز استخوان را اثبات نماید توان تمایزی آنها به استخوان و چربی است. محققین پیشین از این موضوع برای ارزیابی مزانشیمی بودن سلولهای جدا شده مکرراً ا ستفاده کرده‌اند. (۴۰،۳۵،۳۱) مطالعه حاضر نیز سلولهای جدا شده از مغز استخوان موش NMRI از لحاظ پتانسیل تمایز به استخوان و چربی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که سلولهای فوق براحتی به استئوبلاست و سلول چربی تمایز می‌یابند.

محققین اغلب برای نشان دادن تمایز به چربی از روش Oil Red استفاده کرده‌اند. (۴۰،۳۵،۳۱) ولی برای نشان دادن تمایز به استخوان برخی روش آلیزارین رد (۳۵) و برخی روش Von Kossa (۴۰) را برگزیده‌اند. در مطالعه حاضر برای ارزیابی تمایز به چربی روش Oil Red و استخوان روش آلیزارین رد استفاده شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می رسد کشت سلولهای تک هسته ای مغز استخوان موش با تراکم پایین ، روشی ساده و مناسب برای جدا سازی سلولهای مزانشیمی باشد.

تقدیر و تشکر . مطالعه حاضر با حمایت‌های مالی سازمان گسترش و نو سازی صنایع انجام گرفته است.

References

1. Friedenstein AJ, Deriglasora UF, Kulagina NN,Panasuk AF, Rudakowa UF,Luria EA, Ruadkow IA: Precursors for fibroblasts in different populations

www.SID.ir

Archive of SID

of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay methods. Exp Hematol 1974; 2: 83-92.

2. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panansyuk 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: 331-40.

3. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J Cell Biochem 1997; 64: 278-294.

4. 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: 125-134.

5. Prochop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue. Science 1997; 276: 71-74.

6. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavillio F. Muscle regeneration by bone marrow-drived myogenic progenitors. Science 1998; 279: 1528-30.

7. Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher AE, Van Vliet E, Brakel-Van Peer KM, Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. Exp Hematol 1985; 13: 237-243.

8. Caplan AI. The mesengenic process. Clin Plast Surg 1994; 21: 429-435.

9. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. J Cell physiol 1999; 181: 67-73.

10. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation and application in cell therapy. Mol Med 2004; 8: 301-136.

11. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD,mcNall RY,Muul L,Hofmann T. Isolated allogenic bone marrow- drived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 8932-37.

12. Koe ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhonse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, LazarusHM. Rapid hematopoietic recovery after confusion of autologous - blood stem cells in advanced breast cancer patients receiving high dose chemotherapy. J Clin Oncol 2000; 18: 307-316.

13. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, Depollak C, Bourguignon M, Oudina K.Sedel L, Guillemin G. Tissue engineered bone regeneration. Nat Biotechnol. 2000; 18: 959-963.

14. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepdda SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defect with the use of autogenic bone marrow stromal cell. N Engl J Med 2001; 344: 385-386.

15. Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, et al: Xenoreactivity and engrafment of human mesenchymal stem cells transplantation into infarcted rat myocardium. J Thorac Cardiovasc Surg 2004; 127: 1293-1300.

16. Barry FP. Mesenchymal stem cell therapy in joint

www.SID.ir

Archive of SID

disease. Novartis found symp 2003; 249: 86-96.

17. Sugaya K. Potential use of stem cells in neuro-replacement therapies for neurodegenerative diseases. Int Rev Cytol 2003; 228: 1-30.

18. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum A, Fouillard L,Young RG, Frick J, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietics cells to treat a radiation- induced multi- organ failure syndrome. J Gene Med 2003; 5: 1028-38.

19. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: Nature, Biology, and potential applications. Stem cells 2001; 19: 180-192.

20. Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ, Azizi SA. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engrafment in a rat model of Parkinson disease. Hum Gene Ther 1999; 10: 2539-49.

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. 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: 125-134.

23. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, et al. Mesenchymal 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 Joing Surg 1994; 76: 579-592.

25. Awad HA, Butler DL, Boivine 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, Haupl T, Sittinger 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, et al. 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. Meirelles LDS, Nardi NB. Murine marrow derived mesenchymal stem cell: Isolation, in vitro expansion, and characterization. Brit J Hemat 2003; 123: 702-711.

30. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL,Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. J Cell Biochem 1999; 72: 570-585.

31. Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F.Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. Exp Cell Res 2004; 295: 395-406.

www.SID.ir

Archive of SID

32. Modderman WE, Vrigheid - Lamers T, Lowik CWGM.Removal of hematopoietic cells and marcophage from mouse bone marrow culture: isolation of fibroblastic stromal cells. Exp Hemat 1994; 22: 194-201.

33. Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H, Mathieu E. Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. Blood 1994; 84: 753-763.

34. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. J Cellul Biochem 2003; 89: 1235-49.

35. Peister A, Mellad JA, Larsen LL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of stem cells are capable of homing to the bone marrow inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. Blood 2004; 103: 1662-1668.

36. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smironov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord.Stem Cell 2003; 21: 105-110.

37. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med 2001; 226: 507-520.

38. Vogel W, Gruneback F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Buhring HJ. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. Haematologica 2003; 88: 126-133.

39. Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. Blood 1991; 78: 2848-53.

40. Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang P-H, MAO N. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable methods. stem cells 2003; 21: 527-535.

www.SID.ir