Archive of SID

مقایسه تأثیر دو روش کشت سلولی بر مورفولوژی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه

دکتر مینا رمضانی* فاطمه پیریایی**

* استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان
** کارشناس ارشد علوم جانوری دانشگاه پیام نور مرکز تهران

آدرس نویسنده مسؤول: آشتیان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی، تلفن۰۸۶۲-۷۲۲۴۳۷۳
Email: ramezani@mail.aiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۸

چکیده

زمینه: نظر به اهمیت عملی جداسازی و کشت سلول های بنیادی، این مطالعه بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه انجام شد.

هدف: این مطالعه به منظور تعیین اثر روش‌های جداسازی و کشت سلولی بر مورفولوژی و تمایز سلول‌های حاصل انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۸ در انستیتو پاستور ایران انجام شد، ابتدا ۱ میلی‌لیتر مغز استخوان آسپیره شده از درشت نی جوجه‌های نژاد Raf (گوشتی) با سن متوسط ۲ هفته، به روش کشت مستقیم (بدون حذف گلبول‌های قرمز) و روش بارگیری بر فایکول (به منظور حذف گلبول‌های قرمز) در محیط کشت DMEM با درصد گلوکز پایین، سرم جنین گاوی ۱۰٪، پنی‌سیلین و استروپتومایسین کشت شد. سپس سلول‌های پاساژ ۴ حاصل از دو سیستم کشت، از لحاظ مورفولوژی، تمایز به استخوان، چربی و غضروف مقایسه شدند. داده‌ها با آزمون آماری آنووای یک طرفه تحلیل شدند.

یافته‌ها: در سیستم کشت مستقیم در مقایسه با سیستم کشت با روش بارگیری بر فایکول، کلون‌زایی بیش‌تری اتفاق افتاد و اغلب سلول‌ها مورفولوژی فیبروبلاستی داشتند. سلول‌های حاصل از روش کشت مستقیم به ترتیب ۲۱، ۲۷ و ۴۰ درصد بیش‌تر به استخوان، غضروف و چربی تمایز یافتند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سیستم کشت مستقیم، روش مناسب‌تری برای تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه محسوب می‌شود.

کلیدواژه‌ها: سلول بنیادی مزانشیمی، کشت، تمایز، جوجه

مقدمه :

امروزه خصوصیات، ویژگی و اهمیت سلول‌های بنیادی بر کسی پوشیده نیست. سلول بنیادی، نوعی سلول سوماتیکی است که می‌تواند در محیط کشت به صورت نامحدودی تکثیر یابد یا به سلول‌های تخصص یافته تبدیل‌شود. به همین دلیل این سلول‌ها می‌توانند به عنوان منبع پایان ناپذیری برای تمام سلول‌های بدن محسوب شوند.[۱] سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های نامتمایزی هستند که در میان سلول‌های متمایز و اختصاصی یک بافت یا اندام یافت می شوند، قادر به تکثیر خود هستند و می‌توانند به انواع سلول‌های اختصاصی آن بافت یا اندام متمایز شوند. نقش اساسی این سلول‌ها در موجود زنده، حفظ و ترمیم بافتی است که در آن حضور دارند.[۲-۴] سلول‌های بنیادی مغز استخوان به دو دسته سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSC_s) تقسیم می‌شوند. سلول‌های بنیادی خون‌ساز، سلول‌هایی با عمر طولانی یا عمر کوتاه هستند.[۵] سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌هایی چند توان با قدرت بالا در تزاید هستند که اکثراً با شناساگرهای ویژه سطحی شناسایی می‌شوند. این سلول‌ها نه تنها خاصیت خود تجدیدی با مورفولوژی فیبروبلاستی شکل را تا حدود ۲۰ تا ۳۰ پاساژ حفظ می‌کنند، بلکه همچنان توانایی تمایز به انواع بافت‌های همبند مثل ماهیچه، استخوان، غضروف،

www.SID.ir

Archive of SID

تاندون، چربی، بافت‌های کبدی و عصبی را تا تقسیم‌های بالا حفظ می‌کنند.[۶و۷] به دلیل اهمیت سلول‌های مزانشیمی در سلول درمانی، محققین همواره در صدد یافتن راهی مناسب برای جداسازی و تکثیر این سلول‌ها از مغز استخوان نمونه‌های حیوانی بوده اند.[۸-۱۳] با توجه به ضرورت و اهمیت سلول‌های بنیادی در زندگی و کاربرد آن در زمینه‌های مختلف علوم پزشکی، تحقیق‌های بسیاری در زمینه سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسان و حیوان‌هایی مثل گاو، خوک، بز و گوسفند انجام شده است،[۱۴-۱۹] ولی هنوز بررسی و گزارش مستندی برای مؤثرترین روش جداسازی، کشت و تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان جوجه انجام نشده است.

نکته مهم در ارتباط با سلول‌های بنیادی مزانشیمی، خاصیت کلون‌زایی (تکثیر سلول بنیادی مزانشیمی در شرایط مناسب و ایجاد جمعیتی از سلول‌های یکسان) است.[۲۰و۲۱] بدیهی است که معیارهای مختلفی در ایجاد شرایط مناسب برای کلون‌زایی لازم است. یکی از آن‌ها، تعداد سلول‌های اولیه جدا شده از مغز استخوان (تراکم سلولی) است.

لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر روش‌های جداسازی و کشت سلولی بر مورفولوژی و تمایز سلول‌های حاصل انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۸ در انستیتو پاستور ایران انجام شد. جهت استخراج سلول‌های مغز استخوان، تعداد ۱۰ قطعه جوجه نژاد Raf به سن تقریبی۲ هفته با کلروفرم بی‌هوش شدند. سپس استخوان‌های ران و درشت نی آن‌ها جدا و عضله‌ها و بافت نرم اطراف پاک شد و در داخل محیط DMEM (Dulbecos Modified Eagle Medium) قرارگرفت.لوله محتوی استخوان‌های ران و درشت نی بر روی یخ قرار داده شده و به زیر هود استریل منتقل شد. دو انتهای استخوان‌ها قطع و با استفاده از سرنگ و سر سوزن شماره ۱۹ مغز استخوان خارج شد و در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت معلق شد. سپس سلول‌های مزانشیمی با دو روش کشت مستقیم و بارگیری بر فایکول جدا شدند.

برای کشت به روش مستقیم، فالکون حاوی مغز استخوان به مدت ۴ دقیقه و در دور ۱۲۰۰rpm سانتریفوژ شد. پلیت سلولی حاصل در ۱ میلی‌لیتر محیط جدید معلق گردید. سوسپانسیون سلولی، در محیط کشت DMEM با درصد گلوکز پایین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد در سی‌سی پنی‌سیلین و۱۰۰ میکروگرم در سی‌سی استروپتومایسین (سیگما، آمریکا) در داخل فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت شد.

جهت کشت به روش بارگیری بر فایکول، مغز استخوان آسپیره شده با ۲ میلی لیتر محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی رقیق شد و به آرامی بر روی محلول فایکول (Inotrain) بارگذاری شد. پس از ایجاد محلول دو فازی، فالکون حاوی مغز استخوان با دور ۱۲۰۰rpm به مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ شد. با ایجاد گرادیان غلظت توسط محلول فایکول، سلول‌های هسته‌دار موجود در یک لایه ظریف بین گلبول‌های قرمز و پلاسما به آرامی برداشته شده و در فالکون‌های ۱۵ سی‌سی ریخته شدند. سپس با ریختن حجم مساوی از محلول بافر فسفات به منظور خنثی کردن اثر سمی فایکول در سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. پس از خارج کردن مایع رویی، پلیت سلولی تشکیل شده در کف فالکون در ۵ سی‌سی محیط کشت معلق و در۱۰ میلی‌لیتر محیط حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد در سی‌سی پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در سی‌سی استروپتومایسین داخل فلاسک ۲۵ سانتی‌متری کشت داده شد.

سپس سلول‌ها جهت تکثیر در دمای۳۷درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز کربنیک انکوبه شدند. پس از ۴۸ ساعت، محیط رویی سلول‌ها که حاوی سلول‌های خونی شناور و سلول‌های نچسبیده بود، دور ریخته و محیط جدید اضافه

www.SID.ir

Archive of SID

شد. هر۳ روز یک بار محیط سلول‌ها تعویض و این کار تا زمانی که کف پلیت به وسیله سلول‌ها پر شود، تکرار شد. در این زمان، سلول‌ها پاساژ داده شدند. بدین ترتیب که سلول‌ها با تریپسین -EDTA جدا و به نسبت ۱:۲ تقسیم شدند (سلول‌های یک فلاسک ۲۵ بین دو فلاسک ۲۵ تقسیم شد) این کار تا پاساژ چهارم ادامه یافت و از سلول‌های این پاساژ برای بررسی‌های بیش‌تر یعنی بررسی توان تمایز سلول‌ها استفاده شد.

در مرحله بعد به منظور اطمینان از ماهیت سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان جوجه و نیز بررسی توان تمایزی آن‌ها، از آزمون تمایز به استخوان، چربی و غضروف استفاده شد.

برای تمایز به استخوان و چربی، ۵۰۰۰ سلول پاساژ ۴، در هر یک از خانه‌های ظروف کشت ۶ چاهکی در داخل محیط DMEM حاوی۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک کشت داده‌شد. پس از یکنواخت شدن سلول‌ها، محیط آن‌ها با محیط تمایز به استخوان جای‌گزین شد و کشت تمایزی سلول به مدت ۲۱ روز، هر ۳ روز یک بار تعویض شد. محیط تمایز به استخوان شامل DMEM ، ۱۰درصد FBS محتوی۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر L- اسید اسکوربیک ۲ فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون و ۱۰ میلی مولار بتا-گلیسرول فسفات (سیگما، آمریکا) بود. محیط تمایز به چربی شامل DMEM، ۱۰ درصد FBS حاوی۱۰ نانومولار دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین، ۰/۵ میلی‌مولار۳- ایزوبوتیل ۱- متیل گزانتین (سیگما، آمریکا) و ۱ واحد از ترکیب انسولین- ترانسفرین-سلنیت سدیم (Gibco) بود. برخی از خانه‌های پلیت ۶ چاهکی به عنوان گروه شاهد، محیط معمولی DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی دریافت کردند.

برای تمایز به غضروف، ۲۰۰ هزار سلول پاساژ ۴ از فلاسک کشت به لوله ۱۵ میلی‌لیتری از جنس پروپیلن منتقل و در دور ۱۸۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و توده کوچک سلولی در ته لوله تشکیل شد و سپس محیط غضروف‌ساز که شامل محیط کشت DMEM ، ۱۰ درصدFBS محتوی ۱۰۰ نانوگرم دگزامتازون،۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسیدL- اسکوربیک ۲ فسفات، ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر عامل رشد ترانسفورمینگ بتا (سیگما، آمریکا) و ۱ واحد از ترکیب انسولین- ترانسفرین- سلنیت سدیم (Gibco) بود، به مدت ۲۱ روز به سلول‌ها اضافه شد. در این مدت هر سه روز یک بار محیط سلول‌ها تعویض شد. برخی از کشت‌ها به عنوان گروه شاهد، محیط معمولی DMEM حاوی۱۰ درصد سرم جنین گاوی دریافت کردند.

در پایان ۲۱ روز، تمایز سلول‌ها با روش هیستوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای استخوان از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، برای چربی از رنگ‌آمیزی اویل رد و برای غضروف از رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو استفاده شد.

جهت مطالعه تمایز به استخوان تک لایه سلولی با بافر فسفات شسته شده و به مدت ۲۰ دقیقه با پارافرمالدئید ۴ درصد فیکس شد و سپس رنگ‌آمیزی با محلول رنگی رنگ آلیزارین رد (۲ گرم پودر آلیزارین رد در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در ادامه سلول‌ها با آب مقطر شسته شدند و پس از خشک شدن با میکروسکوپ معکوس مشاهده شدند. پس از رنگ‌آمیزی با آلیزارین رد، با استفاده از میکرومتر چشمی، درصد مناطق رنگی (معدنی شده) در دو سیستم کشت سلولی تعیین شد و میانگین آن‌ها از نظر آماری مورد مقایسه قرار گرفت.

برای مطالعه تمایز به چربی، ابتدا سلول‌ها ثابت شده و در مجاورت رنگ اویل رد (۰/۳۶ گرم پودر رنگ اویل رد در ۱۰۰ میلی لیتر ایزوپروپانول ۶۰ درصد (سیگما، آمریکا) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از شستشوی سلول‌ها با آب مقطر و خروج رنگ اضافی، لام‌ها خشک شده و با میکروسکوپ مشاهده شدند. پس از رنگ‌آمیزی با اویل رد، درصد مناطق رنگی (قطرات چربی) در دو سیستم کشت سلولی با استفاده از میکرومتر چشمی تعیین و میانگین آن‌ها از نظر آماری مقایسه شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جهت مطالعه تمایز به غضروف، پلیت سلولی به مدت ۲ ساعت در پارافرمالدئید ۱۰ درصد ثابت شد و پس از انجام مراحل آبگیری و تهیه بلوک پارافینی، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شد و لام‌های به دست آمده به منظور مشاهده هسته، اسید موکوپلی ساکاریدها و موکوپلی ساکاریدهای سولفاته مترشحه از سلول‌های غضروفی با استفاده از رنگ تولوئیدن بلو(سیگما، آمریکا) رنگ‌آمیزی شد. سپس شمارش سلولی در دو گروه به وسیله میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار موتیک انجام و میانگین آن‌ها از نظر آماری مقایسه شد.

آزمایش‌ها حداقل ۵ بار تکرار شدند، تمام نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS۱۰ و آزمون آماری آنووای یک طرفه تحلیل و اختلاف $P<۰/۰۵$ معنی‌دار گزارش شد.

*** یافته‌ها:**

مشاهده کشت سلول‌های مزانشیمی به روش مستقیم با میکروسکوپ معکوس نشان داد که در کشت اولیه پس از ۳ روز، اولین سلول‌ها با مورفولوژی دوکی به شکل کلونی و تعدادی سلول گرد و پهن دیده شدند. کشت اولیه پس از دو هفته به مرحله یکنواختی رسید. در این زمان تک لایه‌ای از سلول‌های عمدتاً کشیده فیبروبلاستی در کف ظرف کشت تشکیل شد. در پاساژ یک، سلول‌های شناور و سلول‌های غیردوکی به تعداد زیاد حذف شدند. در پاساژ دو، سلول‌های دوکی فیبروبلاستی تقریباً خالص شدند.

مشاهده کشت سلول‌های مزانشیمی به روش بارگیری بر فایکول با میکروسکوپ معکوس نشان داد که در کشت اولیه، سلول‌ها به صورت هتروژن بودند. پس از ۵ روز، اولین سلول‌ها با مورفولوژی دوکی شکل، ستاره ای، گرد و پهن دیده شدند. کشت اولیه پس از سه هفته به مرحله یکنواختی رسید. در این زمان تک لایه‌ای از سلول‌های عمدتاً کشیده فیبروبلاستی و تعدادی سلول گرد، پهن و ستاره‌ای در کف ظرف کشت تشکیل شد. در پاساژ یک، تک لایه سلولی حاوی مورفولوژی‌های متنوعی شامل سلول‌های چند وجهی، کشیده و ستاره‌ای شکل بود. با انجام پاساژ دو جمعیت سلول‌های کشیده فیبروبلاستی افزایش یافت. در پاساژ سه، کشت سلول‌ها از لحاظ مورفولوژی یکنواخت‌تر شد، ولی با این وجود تعداد زیادی سلول گرد در کنار تک لایه فیبروبلاستی دیده شد.

جهت بررسی تمایز به استخوان، سلول‌های پاساژ چهار که به مدت ۲۱ روز در محیط استئوژنیک قرار گرفته بودند، با روش رنگ‌آمیزی آلیزارین رد ارزیابی شدند. نتیجه رنگ‌آمیزی، قرمز شدن مواد خارج سلولی معدنی بود. کشت سلول‌های حاصل از سیستم کشت مستقیم به طور تقریباً یکنواخت (۲/۴ ±۸۵ درصد) قرمز رنگ شد، در حالی که در سلول‌های جدا شده به روش بارگیری بر فایکول، تنها ۱/۹±۶۴ درصد مناطق کشت رنگ گرفت که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$).

در بررسی تمایز به چربی، در سلول‌های پاساژ چهار که به مدت ۳ هفته در محیط آدیپوژنیک قرار گرفته بودند، قطره‌های چربی به تدریج ظاهر شدند. برای اثبات چربی بودن این قطره‌ها از رنگ‌آمیزی اویل رد استفاده شد.در گروه سلول‌های جدا شده به روش کشت مستقیم، تعداد سلول‌های چربی ۳/۲ ±۹۵ درصد و سلول‌های جدا شده به روش بارگیری بر فایکول ۱/۷±۵۵ درصد و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$).

تمایز به غضروف در سلول‌های پاساژ چهار که به مدت ۲۱ روز در محیط کندروژنیک قرار گرفته بودند، با رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدن بلو ارزیابی شد. در سلول‌های حاصل از سیستم کشت مستقیم به طور تقریباً یکنواخت (۳/۴±۹۲درصد) هسته‌ها بنفش رنگ شد، در حالی که در سلول‌های جدا شده به روش بارگیری بر فایکول، تنها ۱/۵±۶۵ درصد مناطق کشت رنگ گرفت که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی دار بود ($P<۰/۰۵$).

www.SID.ir

Archive of SID

* بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد کـه روش کشـت مسـتقیم روش مناسـبی بـرای کشـت و جداسـازی سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی مغز اسـتخوان جوجـه اسـت؛ چـرا کـه درصـد بیش‌تری از سلول‌ها به سلول‌های استخوانی، غضـروف و چربی تمایز یافتند.

محققین پیشین بارهـا از خصوصـیات چسـبندگی بـه پلاستیک، تمایز و مورفولوژی دوکی فیبروبلاسـتی بـرای ارزیابی مزانشـیمی بـودن سـلول‌هـای جـدا شـده از مغـز استخوان استفاده کرده‌اند.[۲۲] نتایج حاضر اولین گـزارش مبنی بر وجود برخی تفاوت‌های معنی‌دار بین سلول‌های حاصل از دو روش کشت است.

در روش اول، کشت به طور مستقیم و بدون حـذف گلبول‌های قرمز انجام شد. در روش دوم برای جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان جوجه پـیش از کشت مغز استخوان، به منظور حذف گلبول‌های قرمز از روش بارگیری مغز استخوان بر روی فایکول و چنـدین مرحله سانتریفوژ استفاده شد. از معایب ایـن روش ایـن است که دو مرحله سانتریفوژ به مـدت حـدود ۱۵ دقیقـه سبب می‌شود سلول‌ها در خارج از بدن یا انکوباتور بمانند و تحت تغییرات دمایی محیط و فشار مکانیکی حاصل از سانتریفوژ قرار گیرند. همچنین در حین جمع‌آوری ، مغز استخوان بیش‌تری لازم است کـه آسـپیره کـردن ایـن مقدار مغز استخوان از حیوان، خود آسیب زاست.

معیار مورفولوژیکی یا فنوتیپی برای تشـخیص تمـایز جمعیت سلول‌های بنیادی مزانشـیمی در مطالعـه حاضـر، خاصیت آدیپوژنز، استئوژنز و کندروژنز آن‌ها و میزان تمایز سلول‌ها به این سه رده بود.[۲۳] اکثر سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی در محیط کشت به راحتی ندول‌های استخوانی غنی از پروتئوگلیکان تولید می‌کنند که بـا روش آلیـزارین رد رنگ پذیر هستند. بسیاری از کلونی‌هـای سـلول‌هـای بنیادی مزانشیمی، تحت شرایط کشت صحیح، قطره‌هـای چربـی در سیتوپلاسـم خـود تولیـد مـی‌کننـد و در مسـیر آدیپوژنیـک قـرار مـی‌گیرنـد و بـا اویـل رد، قرمـز رنـگ می‌شوند. تعداد کمی از کلـونی‌هـای سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی، براساس نـوع گونـه و شـرایط محـیط کشـت می‌توانند پروتئین‌های گلیکوزآمینو گلیکان را تولید کنند و به کندروسیت‌های بالغ تمایز یابند و بـا تولوئیـدن بلـو بـه رنگ بنفش در آیند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با میزان کمی مغز استخوان و بـدون اسـتفاده از گرادیـان سـانتریفوژی نیـز می‌توان سلول بنیادی مزانشیمی استخراج و تکثیر کـرد. در شرایط کشت به روش مسـتقیم، خاصـیت کلـون‌زایـی سلولی که نتیجه آن تکثیر و افزایش جمعیت سلولی است بروز پیدا می‌کند. در حالی که در شرایط کشـت بـه روش بارگیری بـر روی فـایکول، خاصـیت کلـون‌زایـی سـلول مزانشیمی به دلیل حضور سلول‌های غیـر مزانشـیمی بـه طور کامل بروز پیدا نمی‌کنـد و در نتیجـه جمعیـت آن‌هـا رشد نکرده باقی می‌ماند.

در مجمـوع سـلول‌هـای حاصـل از کشـت مسـتقیم مورفولوژی نتایج بهتری داشته‌اند و درصـد بـیش‌تـری از آن‌ها توان تمایز به استخوان، چربی و غضروف را داشـتند که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بـود. بنـابر ایـن می‌توان آن را به عنـوان یـک روش مناسـب اسـتخراج و کشت سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان جوجـه معرفـی کرد.

* مراجع:

1. Rider DA, Dombrowski C, Sawyer AA, et al. Autocrine fibroblast growth factor 2 increases the multipotentialy of human adipose-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells 2008 Jun; 26 (6): 1598-608

2. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. Science 2000 Feb 25; 287 (5457): 1427-30

3. Jäger M, Wild A, Lensing-Hohn S, Krauspe R. Influence of different culture solutions on osteoblastic differentiation in cord blood and bone marrow derived

www.SID.ir

Archive of SID

progenitor cells. Biomed Tech (Berl) 2003 Sep; 48 (9): 241-4
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999 Apr 2; 284 (5411): 143-7
5. Smith LG, Weissman IL, Heimfeld S. Clonal analysis of hematopoietic stem - cell differentiation in vivo. Proc Natl Sci USA 1991 Apr 1; 88 (7): 2788-92
6. Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. Rheumatology 2008; 47 (2): 126-31
7. Izad panah R, Kaushal D, Kriedt C, et al. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cell. Caner Res 2008 Jun 1; 68 (11): 4229-38
8. Eslaminejad MB, Mirzadeh H, Mohamadi Y, Nickmahzar A. Bone differentiation of the marrow-derived mesenchymal stem cells using beta tricalcium phosphate - alginate - gelatin hybrid scaffolds. J Tissue Eng Regen Med 2007 Nov-Dec; 1 (6): 417- 24
9. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, et al. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from Aug feline bone marrow. Exp Hematol 2002 Aug; 30 (8): 879-86
10. 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 Mar-Apr; 6 (2): 125-34
11. Shao X, Goh JC, Hutmacher DW, et al. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in rabbit model. Tissue Eng 2006 Jun; 12 (6): 1539-51
12. Jessop HL, Noble BS, Cryer A. The differentiation of a potential mesenchymal stem cells population within ovine bone marrow. Biochem Soc Trans 1994 Aug; 22 (3): 248S
13. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. Cell Tissue Res 2002 Mar; 307 (3): 321-7
14. Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. Stem Cells 2002; 20 (3): 249-58
15. Nadri S, Soleimani M, Hossni RH, et al. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. Int J Dev Biol 2007; 51 (8): 723-9
16. Kogler G, Sensken S, Wernet P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with Mesenchymal stem cells from human cord blood. Exp Hematol 2006 Nov; 34 (11): 1589-95
17. Gong Z, Niklason LE. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow derived mesenchymal stem cell (hMSCs). FASEB J 2008 Jun; 22 (6): 1635-48
18. Inguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. Experimental and Biological Medicine (Maywood) 2001; 226 (6): 507-20
19. Weiss ML, Mitchell KE, Hix JE, et al. Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. Exp Neurol 2003 Aug; 182 (2): 288-99
20. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol 1974; 2 (2): 83-92
21. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK,

www.SID.ir

Archive of SID

Latsinik NV and et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation 1974 Apr; 17 (4): 331-40

22. 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 Mar 15; 72 (4): 570-85

23. Sun S, Guo Z, Xiao X, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. Stem Cells 2003; 21 (5): 527-35

www.SID.ir