فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۱۹، جلد ۵، شماره ۴، پائیز ۹۱، صفحه ۱ تا ۸

# جداسازی، کشت و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به سلول های رده استخوان

زینب صحرائیان[۱]، **مریم آیت الهی**[۲]، رامین یعقوبی[۳]، مهرداد شریعتی[۴]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشکده علوم پایه، شیراز، ایران.
۲- استادیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضاء بیمارستان نمازی، شیراز، ایران. **ayatollmb@yahoo.com**
۳- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضاء بیمارستان نمازی، شیراز، ایران.
٤- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، دانشکده علوم پایه، کازرون. ایران.

**تاریخ دریافت: ۹۱/٦/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱۵**

## چکیده

**مقدمه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بافت‌های متنوعی مثل مغز استخوان یافت می‌شوند. این سلول‌ها با دارا بودن ویژگی چندتوانی، قابلیت تمایز به انواع رده‌های مزودرمی را دارند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان کاندید مناسبی در سلول درمانی معرفی شده‌اند. در این تحقیق توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به سلول های رده استخوان مورد بررسی قرار گرفته است.**

**روش کار: پس از استخراج مغز استخوان از استخوان لگن افراد دهنده، مراحل جداسازی سلول‌ها صورت گرفت. سپس سلول-های جدا شده در محیط کشت مناسب کشت داده شدند. جهت تعیین هویت سلول‌ها از فلو سایتومتری استفاده شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت تمایزی استخوان کشت داده شده و سپس رنگ آمیزی اختصاصی صورت گرفت.**

**یافته ها: نتایج آنالیز فلو سایتومتری نشان داد که این سلول‌ها نسبت به مارکرهای CD ٤٥ و CD ۸۰ منفی می باشند، در حالی که نسبت به مارکر CD ۹۰ مثبت هستند و سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از ۲۱ روز به سلول‌های استخوانی تمایز یافتند.**

**نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان یکی از منابع مهم سلول‌های بنیادی می‌باشند که توانایی تمایز به رده استخوان را دارا می‌باشند.**

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مغز استخوان انسان، استخوان، تمایز.

## مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی اولین بار در سال ۱۹۷۶ توسط Friedenstein کشف شد (۹). هر چند که این سلول‌ها معمولاً از مغز استخوان استخراج می‌شوند، اما در سایر محل‌ها مثل بافت چربی، غشاء سینوویال، مایع سینوویال، ماهیچه اسکلتی، پوست، خون بند ناف، جفت، کبد، طحال و تیموس نیز یافت می‌گردند(۱۴، ۵، ۲). لازم به ذکر است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت های مختلف، ویژگی‌های فنوتیپی مشابهی را نشان می‌دهند. مثلاً در محیط آزمایشگاه از نظر مورفولوژیکی مخروطی شکل و شبیه فیبروبلاست می‌باشند و در مراحل اولیه رشد تشکیل واحدهای کلنی شکل می‌دهند، اما از نظر تکثیر، تمایز و پاسخ به تحریک توسط فاکتورهای رشد، خصوصیات متفاوتی را بروز می‌دهند (۷). جامعه بین المللی سلول درمانی ویژگی‌های لازم برای شناخت سلول‌های بنیادی را چسبندگی، انعطاف پذیری سلول-های جدا شده در محیط کشت آزمایشگاهی، بیان مارکرهای CD۱۰۵، CD۷۳ و CD۹۰ و عدم بیان

www.SID.ir

مارکرهای CD ۱۱ b یا CD ۱۴، CD۴۵، CD ۳۴ و CD۷۹a یا CD۱۹ می داند. قدرت تمایز یافتن به استخوان، چربی و غضروف نیز از ویژگی‌های دیگر این سلول‌ها بیان می‌شود (۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هتروژنی قابل توجهی را نشان می‌دهند. بنابر این همسانی مشخص و قابل قبول، فنوتیپ قطعی و یا مارکرهای سطحی خاصی برای جداسازی آن ها وجود ندارد. شناسایی این سلول‌ها در آزمایشگاه با کمک ترکیبی از مارکرها و قدرت تمایز و ویژگی‌های عملکردی آن ها انجام می گیرد (۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای ظرفیت چند توان می‌باشند. این سلول-ها سریعاً به کف ظرف چسبیده و دارای ویژگی‌های منحصر به فرد هستند. آن ها قادرند به دودمان‌های مزودرمی و غیرمزودرمی شامل سلول‌های استخوان، چربی، غضروف، ماهیچه، قلب، فیبروبلاست، میوفیبروبلاست، سلول‌های اپی تلیال و عصبی تمایز یابند. تمایز این سلول‌ها به سایر رده‌های سلولی، نشان دهنده پتانسیل تمایزی بالای آن ها می‌باشد (۱۸،۱۶،۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی که به عنوان سلول‌های زمینه‌ای مغز استخوان و یا سلول‌های پیش ساز مزانشیم هم شناخته می‌شوند در ترمیم بافت‌هایی با منشاء مزودرمی مثل استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی شرکت می‌کنند(۱). در این تحقیق با توجه به اهمیت کاربرد بالینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به مطالعه قدرت تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به سلول‌های رده استخوانی شده است.

## مواد و روش ها

نمونه‌گیری از مغز استخوان، جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان توسط متخصص مغز استخوان از استخوان لگن افراد دهنده سالم و ترجیحاً جوان (سن ۳۰-۱۷ سال)، در بیمارستان نمازی شیراز، آسپیره و سریعاً به آزمایشگاه سلول‌های بنیادی مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضاء این بیمارستان منتقل شد. به ازای ۵ میلی لیتر خون، ۵ میلی لیتر محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco; Germany) حاوی ۱۰٪ سرم (Fetalbovineserum, Gibco;Germany)، یک درصد ال-گلوتامین (Gibco;Germany,) و یک درصد آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین/پنی سیلین (Gibco;Germany) به آن اضافه و سپس پیپتینگ شد. ۵ میلی لیتر از خون رقیق شده را به آرامی و از جداره فالکون بر روی ۳ میلی لیتر فایکول ریخته و سپس با دور ۲۰۰۰ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سلول‌های تک هسته‌ای از سایر لایه‌ها جدا و به آن حدود ۹ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید. سپس با دور ۱۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دمای۲۵ درجه سانتی-گراد سانتریفوژ شد. حدود یک میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی را در ۴ میلی‌لیتر محیط کشت (حاوی ۱۰ درصد سرمFBS) در فلاسکT۲۵ به طور یکنواخت کشت داده و در داخل انکوباتور( دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسیدکربن) قرار داده شد. پس از ۱۰-۷ روز سلول‌ها با خاصیت چسبندگی خود به کف ظرف چسبیدند، محیط کشت موجود در سطح سلول‌ها را دور ریخته و به همان اندازه محیط کشت تازه به آرامی بر روی سطح سلول‌ها اضافه گردید. در مراحل بعدی هر ۴-۳ روز یک بار با محلول شستشو (phosphate buffered saline, PBS) شستشو صورت گرفت و سپس تعویض محیط کشت انجام شد. پس از ۱۴ روز از شروع کشت اولیه، با رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰-۸۰ درصد، پاساژ سلولی انجام گرفت. برای انجام پاساژ سلولی، پس از دور ریختن محیط کشت روی سلول‌ها و شستشوی آن ها با محلول شستشو، تریپسین روی

Archive of SID

www.SID.ir

سطح سلول‌ها ریخته شد. بعد از طی مدت کوتاهی(۵ – ۲ دقیقه) در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد، با گرد و کنده شدن سلول‌ها از کف ظرف، سلول‌ها جمع آوری و به دو یا چند (بسته به تراکم سلول‌ها) فلاسک جدید حاوی محیط کشت تازه منتقل شدند. سپس روز بیست و دوم، پاساژ دوم و روز بیست و چهارم از شروع کشت، پاساژ سوم و روز بیست و هفتم پاساژ چهارم انجام گرفت. ضمناً سلول‌های شمارش شده در یک فلاسکT۲۵ که تحت پاساژ قرار گرفتند نشان داد که تعداد آن ها حدود $۲\times۱۰^{۵}$ سلول در میلی‌لیتر بود.

**اثبات هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی**

برای اثبات این که سلول‌های به دست آمده از نوع بنیادی مزانشیمی هستند از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد. از سلول های دو فلاسک T۲۵ در مرحله پاساژ سوم با تراکم بیش از ۸۰ درصد جهت انجام فلوسایتومتری استفاده گردید. پس از تریپسینه کردن سلول‌ها، آن‌ها را با دور ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و سلول‌ها با یک میلی لیتر بافر شستشو، شستشو داده شدند. سپس با دور ۲۱۰۰، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۴ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر FBS به رسوب سلولی اضافه گردید و در دمای ۴درجه سانتی-گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. مجدداً مرحله شستشو و سانتریفوژ را تکرار نموده و پس از پیپتینگ، به رسوب سلولی آنتی‌بادی‌های CD۴۵، CD۸۰ و ۹۰ CD آغشته به ایزوتیوسیانات فلورسنت اضافه شدند و پس از پیپتینگ، به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شدند. محلول موجود را با یک میلی‌لیتر بافر، شستشو داده و سپس سانتریفوژ گردیدند. محلول رویی را دور ریخته و با پارا فرمالدئید ۴ درصد فیکس شد. نهایتاً پس از قرار دادن در دستگاه فلوسایتومتر و به دست آوردن نتایج، تجزیه و تحلیل و رسم نمودارهای مورد نظر انجام گرفت.

**تمایز سلول ها ی بنیادی مزانشیمی به استئوسیت**

برای تمایز دادن سلول‌ها به رده سلول‌های استخوانی، ابتدا محیط کشت تمایزی مخصوص، جهت تمایز استخوان که شامل محیط کشت High glucose – DMEM حاوی ۱۰٪ FBS، ۸ –۱۰ مول بر لیتر دگزامتازون (Sigma;USA)، ۱۰ میلی مول بر لیتر β – گلیسرول فسفات (Sigma;USA)، ۳/۷ گرم بر لیتر بی-کربنات سدیم و ۰/۰۵ گرم بر لیتر اسید آسکوربیک (Sigma;USA) می باشد، تهیه شد. سپس سلول‌های یک فلاسک T۲۵ با تراکم ۸۰–۷۰ درصد در مرحله پاساژ چهارم تریپسینه گردید. سلول‌ها با دور ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. محلول رویی جهت به دست آوردن یک میلی لیتر سولوشن سلولی خارج شد. سلول‌ها در محیط کشت تمایزی مخصوص استخوان در پلیت شش خانه کشت داده شدند و در داخل انکوباتور قرار داده شدند. هر ۴–۳ روز یک بار حدود یک میلی‌لیتر از محیط کشت تمایزی را خارج و محیط تمایزی تازه اضافه شد. به عنوان گروه کنترل، سلول‌های یک فلاسک نیز با محیط کشت فاقد مواد تمایزی کشت داده شدند. ویژگی‌های مورفولوژیک و بافتی سلول‌ها مرتباً با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند و پس از طی مدت زمان ۲۱ روز و کامل شدن پروسه تمایزی، سلول ها با آلیزارین رد ( Sigma;USA) رنگ آمیزی و از آن ها عکس تهیه شد.

**رنگ آمیزی سلول‌های استخوانی**

پس از کامل شدن پروسه تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی، جهت تشخیص بهتر آن‌ها، سلول‌ها با آلیزارین رد رنگ آمیزی شدند. برای رنگ‌آمیزی سلول‌ها، ابتدا محیط کشت روی سلول‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

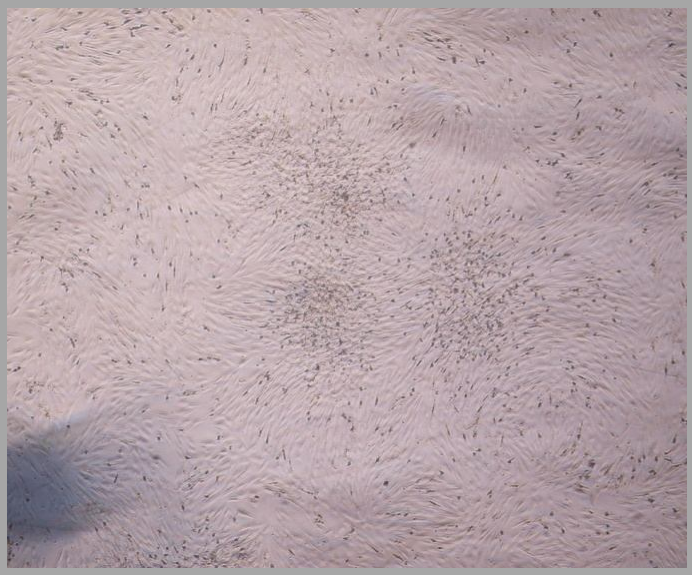
را برداشته و سپس با محلول شستشو (PBS) سلول‌ها را ریخته تا فیکس شدن سلول‌ها انجام پذیرد. در مرحله بعد اتانول را برداشته و سلول‌ها در معرض آلیزارین رد به مدت ۱۰-۲ دقیقه قرار می‌گیرند. در مرحله نهایی سلول‌ها را با آب مقطر شستشو داده و پس از خشک شدن، مورد بررسی میکروسکوپی و عکس برداری قرار گرفت.

## نتایج

نتایج جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای پس از ریختن خون رقیق شده با محیط کشت DMEM بر روی فایکول و سانتریفوژ کردن، چهار لایه مجزا در لوله آزمایش قابل مشاهده می‌باشد که از پایین به بالا شامل: گلبول‌های قرمز خون، فایکول، لایه سلول‌های تک هسته‌ای که مابین فایکول و پلاسما قرار گرفته است و پلاسما می‌باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در لایه سلول‌های تک هسته‌ای قرار دارد که به صورت هاله بسیار باریکی می‌باشد. پس از جمع‌آوری و کشت شستشو داده و یک میلی‌لیتر اتانول بر روی سلول‌ها سلول‌ها و بررسی میکروسکوپی، در ابتدا تعداد بسیار زیادی سلول از انواع مختلف شامل انواع گلبول‌های سفید، گلبول قرمز و غیره دیده می‌شود که در طی مراحل خالص سازی به تدریج حذف می‌شوند.

### نتایج مربوط به کشت اولیه سلول‌ها

پس از کشت اولیه سلول‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به طور روزانه با کمک میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار می‌گیرند. بر اساس این مشاهدات، از بین هزاران سلول موجود، در روزهای دوم و سوم سلول‌های بسیار کمی در کشت اولیه فیبروبلاستی و دوکی شکل شده و به کف ظرف می‌چسبند. کلنی‌های بزرگ سلولی با گذشت زمان رشد نموده (شکل۱) و ۸ روز پس از آغاز کشت، کلنی‌ها در محیط پخش شده و به صورت تک لایه‌ای از سلول‌های دوکی شکل، کف ظرف را می‌پوشانند (شکل۲).



**شکل۱- کلنی های تشکیل شده در مراحل اولیه کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان**

Archive of SID

www.SID.ir

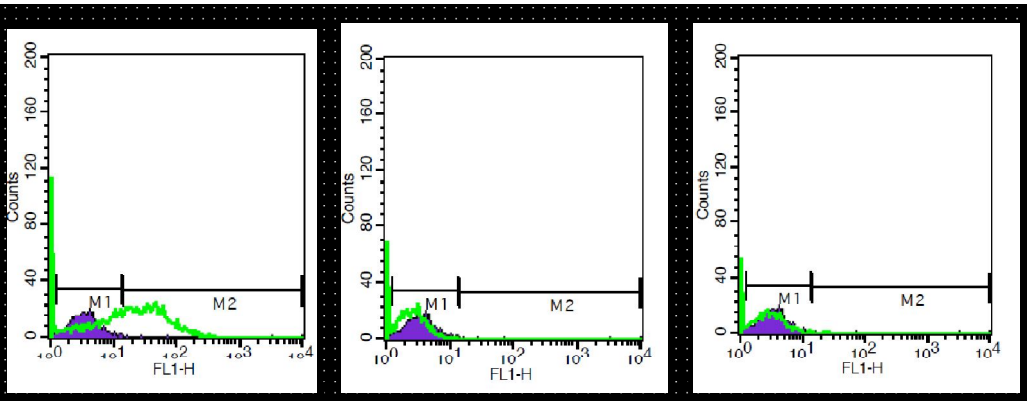
هر روز با مشاهده میکروسکوپی انجام شده، ملاحظه شد که به طور فزاینده‌ای بر تعداد سلول‌های چسبنده افزوده می‌شود. این سلول‌ها در طی دوره رشد، ریخت‌شناسی فیبروبلاستی خود را حفظ نمودند. پس از طی شدن مرحله کشت اولیه و رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰-۷۰ درصد، جهت جلوگیری از مرگ سلول‌ها و به‌دست آوردن دودمان خالص از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان، پاساژهای متوالی مورد نیاز است. اولین پاساژ، در روز چهاردهم پس از کشت اولیه سلول‌ها، انجام گرفت. سلول‌ها پس از این که توسط تریپسین تیمار شدند از نظر ریخت شناسی تغییر نمودند. شکل سلول‌ها در این مرحله از حالت فیبروبلاستی و دوکی شکل به صورت کاملاً گرد در آمدند که در محیط کشت معلق بودند. پس از طی یک روز مجدداً سلول‌ها به فرم کشیده در آمده و به کف ظرف چسبیدند. از این مرحله به بعد سلول‌ها با رشد شگفت‌آوری افزایش یافته و هشت روز بعد، سلول‌ها برای انجام پاساژ دوم آماده شدند. پاساژ سوم، دو روز بعد و پاساژ چهارم، سه روز پس از پاساژ سوم انجام گرفت. ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال نیز که مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کف ظرف می‌چسبند، با انجام پاساژهای متوالی حذف می‌شوند. در مرحله پاساژ سلولی، ملاحظه شد که زمان مناسب انجام پاساژ و انتقال تعداد کافی از سلول‌ها به ظروف کشت جدید از اهمیت به سزایی برخوردار است که توجه به این نکات در داشتن سلول‌هایی کاملاً ایده آل کمک کننده است.

**نتایج مربوط به فلوسایتومتری**

بیان مارکرهای خاص از اختصاصات ویژه هر رده سلولی محسوب می‌شود. از این ویژگی در جهت تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان استفاده می‌شود. نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که این سلول‌ها نسبت به مارکرهای CD ۴۵ و CD ۸۰ منفی می‌باشد، در حالی‌که نسبت به مارکر CD ۹۰ مثبت می‌باشند. نتایج به دست آمده ویژگی منحصر به فرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به اثبات می‌رساند(نمودار۱).

Archive of SID

www.SID.ir

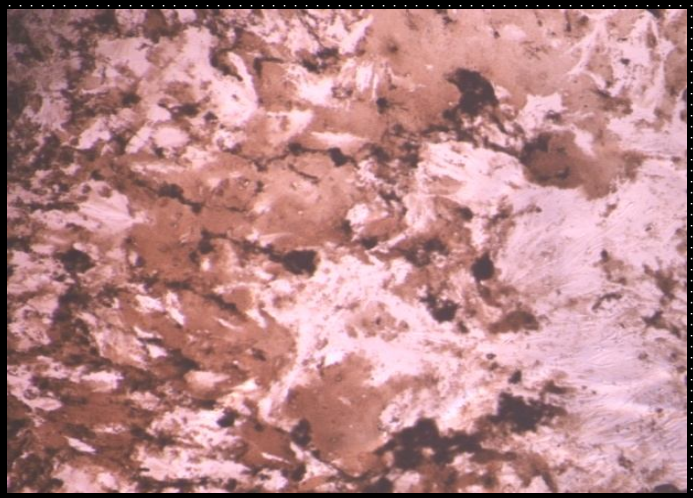



**نتایج تمایز سلول‌ها به استخوان**

سلول‌های پاساژ چهارم را پس از در معرض قرار دادن با محیط کشت تمایزی استخوان، به طور روزانه با میکروسکوپ معکوس بررسی نمودیم. اولین نشانه-های تغییرات ریخت شناسی و تمایز به استخوان یک هفته پس از القای تمایز مشاهده شد. مشاهدات میکروسکوپی، توده‌های سلولی را نشان دادند که در مناطقی از محیط کشت به وجود آمده بودند که در روزهای بعد بزرگ‌تر شدند. در پایان دوره تمایز(روز ۲۱) تعداد فراوانی از این توده‌ها در ظروف کشت ملاحظه شد. در این زمان تمایز سلول‌ها به استخوان خاتمه یافته و سلول‌ها جهت اثبات حضور ترشحات ماتریکس معدنی با روش رنگ آمیزی آلیزارین‌رد ارزیابی شدند.

**نتایج رنگ آمیزی سلول‌های تمایز یافته به استخوان**

نتایج رنگ‌آمیزی سلول‌ها ی تمایز یافته به استخوان با آلیزارین رد نشان داد که توده‌های سلولی قرمز رنگ شدند اما در کشت کنترل که محیط کشت فاقد مواد تمایزی بود هیچ گونه توده قرمز رنگی ایجاد نشد (شکل ۳).



Archive of SID

www.SID.ir

## بحث و نتیجه گیری

اولین بار در سال ۱۹۹۹ در گزارش پیتنجر مشخص شد که برخی از کلنی‌ها در محیط کشت قادر به تمایز به هر سه رده سلولی(استخوان، غضروف و چربی) می-باشند و برخی از کلنی‌های سلولی فاقد قدرت تمایز یافتن به حداقل یکی از رده‌های سلولی بودند. اما این مسأله مشهود بود که همه جمعیت‌های سلولی قادر به تمایز یافتن به رده سلول‌های استخوانی هستند(۱۷). پس از آن تحقیقات در این زمینه ادامه یافت و کاریستینو و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سینوویوم انسانی قادر به تمایز یافتن به سلول‌های رده استخوان و غضروف می‌باشند در حالی که فقط ۳۰٪ از کلنی‌های سلولی توان تمایز یافتن به رده چربی را دارند(۱۰). هم چنین گزارشاتی نیز از قدرت تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های غیر مزودرمی مثل نورون‌ها داده شدند(۲۲).

قدرت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده استخوان به خاطر اهمیت این سلول‌ها در جهت سلول درمانی بیماری‌های استخوانی، از توجه خاصی برخوردار است. در مطالعه‌ای که توسط موراگلیا بر روی موش صورت گرفت، نشان داده شد که نقص‌های بزرگ استخوانی در شرایط In vivo توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ ترمیم می‌شود(۱۵). تحقیقات مشابهی در حیوانات بزرگ‌تر(۱۱) و انسان (۱۹) نیز انجام گرفت. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ به سلول‌های رده استخوانی می تواند در سلول درمانی بیماری‌های مرتبط با استخوان مفید باشد. یکی از اهمیت‌های این سلول‌های اتولوگ که آن‌ها را به عنوان کاندیدهای مناسب در سلول درمانی معرفی می‌کند، عدم تحریک سیستم ایمنی بدن توسط آن‌ها و در نتیجه عدم سرکوب این سلول‌ها توسط سلول‌های ایمنی بدن ضمن درمان می‌باشد (۲۱).

در چندین تحقیق قدرت تمایز و تکثیر این سلول‌ها در شرایط In vitro مورد بررسی قرارگرفته است. تحقیقات نشان می‌دهد که حداکثر قدرت تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بین پاساژهای ۲ و ۶ می-باشد و در پاساژهای بالاتر توان تمایزی به شدت کاهش می‌یابد(۱۳، ۶، ۴). در تحقیق حاضراز سلول-های بنیادی مزانشیمی در مرحله پاساژ چهارم جهت تمایز دادن آن‌ها به رده سلول‌های استخوانی استفاده گردید. نتایج این مطالعه در راستای تحقیقات قبلی نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط In vitro به صورت کلنی‌هایی از سلول‌های دوکی شکل رشد می‌کنند و از نظر اندازه در طول کشت افزایش می‌یابند. پس از افزودن محیط تمایزی استخوان، پس از ۲ تا ۳ هفته ساختارهایی شکل می‌گیرند که این تغییرات مورفولوژی در ارتباط با بیان پروتئین‌های خاص استخوان می‌باشد(۲۰، ۱۲). این تغییرات پس از ۲۱ روز به طور کامل مشهود بودند.

نتایج ما نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان قادر است در شرایط In vitro پس از ۲۱ روز فنوتیپ رده استخوان را نشان دهند. از سلول‌های استخوانی تمایز یافته با منشأ سلول-های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان فرد اتولوگ می‌توان در زمینه سلول درمانی نارسایی‌های استخوانی استفاده کرد که لزوم انجام مطالعات بیشتر به صورت پیش کلینیکی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

## تشکر و قدردانی

بر خود لازم می دانیم تا از عزیزانی که در مرکز تحقیقات پیوند اعضاء بیمارستان نمازی شیراز ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند، صمیمانه سپاس گزاری نماییم.

Archive of SID

www.SID.ir

## منابع

**1.**Baksh, D., Song, L., Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med, 8(3); 301-316.
**2.**Bianco, P., Robey, P. G., Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts and assays. Cell Stem Cell, 2; 313–319.
**3.**Billon, N. (2007). The generation of adipocytes by the neural crest. Development, 134; 2283–2292.
**4.**Campagnoli, C., Roberts, I. A., Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, I., Fisk, N. M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and marrow. Blood, 98; 2396–2402.
**5.**Chen, F. H., Rousche, K. T., Tuan, R. S. (2006). Technology insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. Nat Clin Pract Rheumatol, 2: 373–382.
**6.**Dennis, J. E., Charbord, P. (2002). Origin and differentiation of human and murine stroma. Stem Cells, 20; 205–214.
**7.**Dexter, T. M. (1982). Stromal cell associated haemopoiesis. J Cell Physiol, 1(suppl): 87-94.
**8.**Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy, 8: 315–317.
**9.**Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol, 4: 267-274.
**10.**Karystinou, A. (2009). Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium. Rheumatology, 48; 1057-1064.
**11.**Kon, E. (2000). Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in criticalsize defects of sheep long bones. J Biomed Mater Res, 49; 328-337.
**12.**Makino, S. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. J Clin Invest, 103; 697–705.
**13.**Martin, D. R., Cox, N. R., Hathcock, T. L., Niemeyer, G. P., Baker, H. J. (2002). Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. Exp Hematol, 30; 879–886.
**14.**Mimeault, M., Batra, S. K. (2008). Recent progress on normal and malignant pancreatic stem/progenitor cell research: Therapeutic implications for the treatment of type 1 or 2 diabetes mellitus and aggressive pancreatic cancer. Gut, 57: 1456–1468.
**15.**Muraglia, A., Cancedda, R., Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. J Cell Sci. 113; 1161-1166.
**16.**O'Rahilly, R., Muller, F. (2007). The development of the neural crest in the human. J Anat, 211: 335–351.
**17.**Pittenger, M. F. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284; 143-147.
**18.**Prockop, D. J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science, 276: 71–74.
**19.** Quarto, R. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. N Engl J Med, 344, 385-386.
**20.**Saito, T., Dennis, J. E., Lennon, D. P. (1995). Myogenic expression of mesenchymal stem cells within myotubes of mdx mice in vitro and in vivo. Tissue Eng, 1; 327–343.
**21.**Van den Berk, L. (2009). Toll-like receptor triggering in cord blood mesenchymal stem cells. J. Cell. Mol. Med., Epub ahead of print.
**22.**Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res, 61; 364-370.

Archive of SID

www.SID.ir