

مقایسه ویژگی های سلول های بنیادی مزانشیم انسانی مشتق شده از مغز استخوان و بافت چربی و پرده جنینی

پیده کاظمی^۱، کاظم پریور^۲، نسیم حیاتی رودباری^۳، پریچهر یغمایی^۴، بهنام صادقی^۵

۱-دانشجوی دکترای زیست شناسی علوم جانوری گرایش سلولی - تکوینی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.

۲-استاد، دکترای زیست شناسی علوم جانوری گرایش سلولی - تکوینی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.

kazem_parivar@yahoo.com

۳-استادیار، دکترای زیست شناسی علوم جانوری گرایش سلولی - تکوینی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.

nasimhayati@yahoo.com

۴-استادیار، دکترای فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.

۵-استادیار، دکتری تخصصی ایمونولوژی پزشکی، گروه ایمنی درمانی سرطان و پزشکی ترمیمی، مرکز تحقیقات سرطان پستان، پژوهشکده معتمد، جهاد دانشگاهی،

تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: درمان با سلول های بنیادی، رویکردی نوین را در ترمیم و بازسازی اندام ها و بافت ها پدید آورده است. سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، کاندیدهای نویدبخشی برای سلول درمانی محسوب می شوند. گرچه، MSC های مشتق از مغز استخوان قادرند به چندین رده سلولی تمایز یابند، اما مغز استخوان به دلیل فرآیند جدا سازی مشکل سلول ها و بازدهی پایین، منبع سلولی مناسبی نیست. هدف از این مطالعه، بررسی مقایسه ای توان ترمیمی MSC های انسانی حاصل از ۳ منبع شامل بافت مغز استخوان و چربی و بافت دسیدوآی پرده جنینی در شرایط *in vitro* می باشد.

روش کار: سلول های بنیادی مزانشیمی از ۳ بافت مغز استخوان، بافت چربی و سلول بافت دسیدوآی پرده جنینی جدا شده، و تا ۱۰ پاساژ سلولی کشت داده شدند و برای فنوتیپ با ایمونوفلورسانس و فلوسیتومتری به منظور تعیین بیان مارکرهای سطحی اختصاصی سلول مزانشیمی (CD11b، CD34، CD44، CD45، CD73، CD90 و CD105)، توانایی تمایز به سلول استخوان، چربی و غضروف، رشد سلول ها با محاسبه زمان دو برابر شدن و سطح دو برابر شدن جمعیت لحاظ کیفی و کمی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها: علیرغم شباهت ها از نظر بیان آنتی ژن سطحی و توانایی خود نوزایی، سلول های بنیادی مزانشیمی منابع مختلف، تفاوت های معنی داری را از نظر تکثیر و ظرفیت های تمایز به استخوان چربی و استخوان نشان دادند. DSCs بالاترین ظرفیت تکثیر سلولی را نشان داد و به نظر می رسد که این ویژگی را تا پاساژ ۱۰ حفظ می کند، در حالی که BM-MSCs دارای توانایی تمایز قابل توجهی برای تمایز به استخوان و غضروف، AT-MSC ها بیشترین قدرت تمایز چربی را در بین سایرین نشان دادند. با این توضیحات به نظر می رسد DSC ها با توجه ویژگی های ذکر شده می توانند جایگزین مناسبی برای استفاده در سلول درمانی باشند.

نتیجه گیری: از آنجایی که DSC ها و AT-MSC ها نیز ویژگی های سلول های مزانشیم را به خوبی BM-MSC نشان می دهند این سلول ها می توانند جایگزین مناسبی برای سلول درمانی باشند.

واژه های کلیدی: بافت چربی، مغز استخوان، سلول استرومای دسیدوآی، سلول های بنیادی مزانشیمی، روش های ترمیمی.

مقدمه

راهی بهتر برای درمان این بیماری ها، به سلول درمانی به عنوان بهترین روش درمان روی آورده اند. سلول درمانی، درمان بر اساس سلول های بنیادی است. سلول بنیادی به

در جوامع امروزی، بیماری های مختلفی شیوع پیدا کرده است و به علت وجود دشواری های پیوند و عوارض استفاده از داروهای شیمیایی، پژوهشگران به دنبال

سلول های هماتوپویتیک در مغز استخوان نیز هستند. این سلول ها برای اولین بار توسط فریدن اشتاین (Friedenstei) و پتراکووا (Petrakova) از مغز استخوان رت به دست آمدند اخیراً سلول های مزانشیم را از منابع فرعی دیگری هم مثل بافت های چربی بافت های جفت، خون محیطی، بافت های پیوندی و بند ناف و ماهیچه های اسکلتی جدا کرده اند (۶). سلول های بنیادی مزانشیم انسانی در حقیقت سلول هایی هستند که بر اساس تعریف انجمن بین المللی سلول درمانی International Society for Cellular Therapy (ISCT) دارای سه ویژگی زیر باشند:

- در شرایط کشت معمولی در ظروف کشت پلاستیکی به کف ظرف بچسبند؛
- شاخص های سطحی CD73, CD105, CD90 را بیان کنند و نسبت به بیان شاخص های هماتوپویتیک بالاخص CD45, CD34 و سایر شاخص ها از قبیل CD19, CD79, CD11b, CD14 و HLA-DR منفی باشند؛
- می بایست توانایی تمایز به سلول های چربی، غضروف و استخوان را در شرایط آزمایشگاهی داشته باشند (۱۶).

هرچند که مغز استخوان اولین و شناخته شده ترین منبع سلول های بنیادی مزانشیمی می باشد، اما روش جمع آوری نمونه از مغز استخوان بسیار تهاجمی است. هم چنین تعداد، توان تکثیر و تمایز این سلول ها با افزایش سن کاهش می یابد. بنابراین دسترسی به منابع جایگزین سلول های بنیادی مزانشیمی جهت مطالعات پایه ای و بالینی از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱۶). یک منبع سهل الوصول و ارزشمند بافت چربی است. این نوع بافت حاوی شمار زیادی از سلول های بنیادی مزانشیمی است و به دست آوردن مقادیر زیاد بافت به راحتی ممکن است. مطالعات نشان داده است که سلول های مزانشیمی جدا شده از بافت چربی از نظر ریخت شناسی و حتی بیان نشانگرهای سطحی شبیه همان سلول های جدا شده از مغز

سلولی گفته می شود که توانایی خودنوسازی و تمایز به سلول های دیگر را داشته باشد (۱۶). سلول های بنیادی به سلول های بنیادی جنینی و سلول های بنیادی بالغین طبقه بندی می شوند. سلول های بنیادی جنینی، سلول های بالقوه چند ظرفیتی (totipotential) بوده و اغلب از توده داخل سلولی (mass cell inner) جنین در مرحله بلاستوسیست به دست می آید. این سلول ها دارای ویژگی های خاصی می باشند که از آن جمله می توان به قابلیت تمایز به انواع رده های سلولی و نامیرایی آن ها اشاره نمود. استفاده و کاربرد سلول های بنیادی جنینی از سال ۱۹۸۱ آغاز شده است. برای مطالعه *in vitro* سلول های جنینی به دو روش عمل می کنند. ۱) کشت سلول های بنیادی جنینی بر سطح سلول های فیبروبلاست جنینی موش که قبلاً توسط اشعه γ یا میتومایسی، فعالیت میتوزی آن متوقف شده است. ۲) کشت سلول های بنیادی جنینی در حضور LIF (Leukemia inhibitory factor) که به صورت نو ترکیب فراهم گردیده است. از نظر مورفولوژی، کلونی های فشرده ای از سلول های کوچک با سیتوپلاسم اندک و هستک واضح می باشند. این سلول ها در طی تکثیرهای پی در پی، کاربوتایپ نرمال 46XX, 46XY خود را حفظ می کنند. این سلول ها در عین حال که قابلیت حفظ حالت تمایز نیافته را در شرایط *in vitro* دارا می باشند، می توانند به گستره وسیعی از سلول های بالغ، تحت شرایط خاص متمایز گردند. این سلول ها در طی ۱۸ تا ۱۲ ساعت تقسیم می شوند. مدت زمان تقسیم در این سلول ها به تطبیق آن ها با محیط پیرامون خود در *in vitro* بستگی دارد (۴). از مهم ترین سلول های بنیادی بزرگسالان که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است، می توان به سلول های بنیادی مزانشیم اشاره نمود. سلول های بنیادی مزانشیم در ترمیم بافت هایی با منشاء مزانشیمی مثل استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی شرکت می کنند و البته این سلول ها به عنوان سلول های حمایت کننده برای

سلول های مورد استفاده در این پژوهش قبلاً در انستیتو پاستور ایران جداسازی و شناسایی شده و در نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه نگهداری شده بودند.

ذوب و کشت مجدد سلول ها:

پس از آماده کردن بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد، سلول ها به سرعت از تانک ازت به داخل بن ماری منتقل شدند. سپس ویالها به زیر هود منتقل شده با کمک پیت استریل میزان ۴ میلی لیتر از محیط کشت با DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) درصد

گلوکز پایین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنسیلین ۱۰۰ واحد در سی سی (USA, Sigma) و ۱۰۰ میکروگرم در سی سی استروپتومايسين (USA, Sigma) با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به درون فالكون های استریل ریخته شد. محتویات ویال ها داخل فالكون ها ریخته و سپس ساتریفوژ شدند تا اثرات سمی موجود در محیط انجماد برداشته شود. در نهایت پلیت های سلولی حاصل از هر فالكون با ۱ الی ۲ سی سی محیط کشت سوسپانسیون گردیده و مجدداً داخل فلاسک های کشت سلول، کشت گردیدند. سپس فلاسک ها درون انکوباتور با شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و CO₂ ۵ درصد قرار داده تا رشد کنند. پس از ۱۲-۶ ساعت محیط رویی سلول ها که حاوی سلول های نچسبیده بود دور ریخته و محیط جدید اضافه و به منظور تکثیر سلولی، ادامه کشت در همان شرایط انجام شد. هر سه روز یک بار محیط سلول ها تعویض گردیدند. پس از چند ساعت بعد از کشت اولیه، اولین سلول های شبه فیروبلستی مشاهده و بعد از ۸-۶ روز ۸۰-۷۰ درصد سطح ظرف کشت را پوشاندند. سپس سلول ها از پاساژ سوم با کمک EDTA ۰/۰۲ درصد در Trypsin ۰/۲۵ درصد جدا و با تراکم ۵۰۰۰ سلول در سانتی متر مربع در فلاسک های کشت سلولی کشت داده شدند. به این ترتیب از پاساژ ۳ به منظور مراحل بعدی آزمایش استفاده شد. (۷)

استخوان هستند. سلول های مزانشیمی جدا شده از بافت چربی از نظر رفتار سلولی در محیط کشت و قدرت تمایزی به سلول های استخوان، غضروف و چربی تفاوتی با سلول های جدا شده از مغز استخوان نشان نداده اند (۵). بافت چربی می تواند با استفاده از روش های مختلفی مانند لیپوساکشن و یا برش بافتی به دست آید که این بافت را نیز با خطراتی مواجه می کند:

- ورم ناشی از ایجاد حفره در بدن که معمولاً این ورم ماندگار است.
- سوختگی که به خاطر حرارت بالای که بدن داده می شود تا چربی ها ذوب شوند و سپس تخلیه شوند.
- زخم های طولانی مدت که در اثر عمل لیپوساکشن ایجاد می شود.
- صدمه های مکانیکی به ناحیه ای که عمل شده است مانند شکم، ران، باسن، سینه.
- صدمه به عروق لنفاتیکی
- ایجاد فرو رفتگی در بافتی که چربی آن برداشته شده است (۶).

پرده جنینی یک منبع بسیار جوان از سلول های بنیادی مزانشیمی است که به دور از مشکلات اخلاقی، خطر ایجاد واکنش های ایمنی و هم چنین سرطانی شدن، مزایای هر دو منبع سلول های بنیادی جنینی و بزرگسال را دارا می باشد. در این مطالعه سعی بر آن است که هر یک از سلول های مزانشیمی مشتق شده از بافت مغز استخوان، بافت چربی و پرده جنینی با منشأی مادری را به لحاظ عملکرد و توانایی آن ها در استخوان سازی، غضروف سازی و چربی سازی، بیان مارکهای سطح سلولی ویژه سلول های مزانشیمی، توانایی تکثیر و سرعت رشد این سلول ها با یکدیگر مقایسه شود.

مواد و روش ها:

تهیه، جداسازی و کشت سلول های مزانشیمی مغز

استخوان:

سلول ها:

تهیه، جداسازی و کشت سلول های مزانشیمی مشتق از بافت چربی

در این مطالعه آزمایشگاهی (in vitro)، برای جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی جدا شده از چربی، مقدار ۵ گرم بافت چربی شکمی با اخذ رضایت نامه کتبی از بیمارانی که جهت انجام لیپوساکشن مراجعه کرده بودند استفاده شد. نمونه چربی اخذ شده در محلول فسفات بافر سالین (Gibco, Life Technologies, USA) آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین (Gibco, Life Technologies, USA) 1% تحت شرایط استریل از بیمارستان به آزمایشگاه منتقل و پس از چندین بار شستشو با فسفات بافر سالین و سرم فیزیولوژی به قطعات کوچک تبدیل شد. سپس سلول های بنیادی مزانشیمی به وسیله هضم با آنزیم کلاژنازی ۰/۲٪ از بافت چربی استخراج گردید. به این صورت که ابتدا به ازای هر یک گرم چربی ۱/۵ میلی گرم آنزیم کلاژنازی I به آن اضافه و به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار گرفته و در نهایت رسوب سلولی در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA) حاوی آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین ۱٪ و سرم جنین گوساله (Gibco, Life Technologies, USA) ۱۰٪ به فلاسک مخصوص کشت سلول منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی دی اکسید کربن ۵٪ و رطوبت معلق با تعویض محیط از فلاسک حذف شدند. محیط کشت سلول ها هر ۳ روز یک بار تعویض گردید. سلول ها پس از تریپسینه شدن به مرحله پاساژ سوم انتقال یافتند و جهت استفاده آماده شدند (۱).

تهیه، جداسازی و کشت سلول های مزانشیمی مشتق از بافت پرده جنینی:

نمونه پرده جنینی بعد از عمل سزارین و جداسازی از جنینی و پس از دریافت رضایت کامل مادر، به آزمایشگاه کشت سلول منتقل گردید. برای شستشو پرده آمینون درون بشر حاوی آنتی بیوتیک ها (پنی سیلین و استرپتومایسین) و PBS قرار داده خواهد شد. پرده آمینون (پرده آمینون شفاف و بدون عروق است) از کوریون جدا و با قیچی استریل به قطعه های کوچک تقسیم و سپس قطعه ها درون فلاسک چیده خواهد شدند. به فلاسک حاوی قطعات بافت پرده جنینی انسان محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA) حاوی آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین ۱٪ و سرم جنین گوساله (Gibco, Life Technologies, USA) ۱۰٪ به فلاسک مخصوص کشت سلول منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی دی اکسید کربن ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول های معلق با تعویض محیط از فلاسک حذف شدند. محیط کشت سلول ها هر ۳ روز یک بار تعویض گردید. سلول ها پس از تریپسینه شدن به مرحله پاساژ سوم انتقال یافتند و جهت استفاده آماده شدند (۸).

تعیین درصد زنده بودن سلول ها (test Viability)

با استفاده از آنزیم تریپسین سلول های مزانشیمی را کف فلاسک جدا و حدود ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به دست آمده را با ۵۰ میکرولیتر از رنگ تریپان بلو ۰/۴٪ مخلوط کرده پس از ۳۰ ثانیه، ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط را برداشته و با استفاده از لام نئوبار در خانه های مربوط به شمارش سلول های سفید شمارش شدند. رنگ تریپان بلو در سلول های مرده نفوذ کرده و آن ها را آبی رنگ می کند اما وارد سلول های زنده نمی شود. به این ترتیب درصد سلول های زنده به دست آمد (۱۸).

بررسی مارکرهای سطح سلولی:

برای مشخص شدن MSCS جدا شده از بافت های مغز استخوان، چربی و پرده جنینی از فلوسایتومتری استفاده می

ای کشت شدند. پس از مرحله confluency محیط سلول-ها با محیط تمایز به استئوسیت جایگزین شدند که این محیط (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد FBS، DMEM شامل محیط فسفات- ۲ اسید آسکوربیک $50 \mu\text{g/ml}$ L- حاوی 10 (Sigma, USA) serum، 7 (Sigma, USA) - دگزامتازون 10mM M و بتا گلیسرول فسفات (Sigma, USA) بود. هر ۲-۳ روز یکبار محیط کشت تعویض شد و به مدت ۲۱ روز سلول ها تحت تأثیر محیط القاکننده تمایز به استئوسیت قرار گرفتند. به عنوان گروه کنترل، محیط برخی از خانه ها با محیط معمولی با ۱ درصد DMEM گلوکز پایین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتیبیوتیک جایگزین شد (۳).

ارزیابی تمایز استئوسیت:

در تمایز استئوژنیک، سلول ها دو بار با محلول saline buffered Phosphate (PBS) شستشو شدند. سپس در پارافرمالید ۴ درصد برای مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفته و فیکس شدند. پس از اتمام زمان ذکر شده، سلول ها مجدداً با محلول PBS کاملاً شستشو داده شدند. سپس سلول ها با رنگ آلیزارین رد ۲ s ۲ درصد با $\text{pH} = 1/4$ به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند و در انتها رنگ اضافی با آب مقطر خارج گردید. پس از رنگ آمیزی، رسوبات کلسیم که محصول سلول های استخوانی هستند در ظرف کشت ۱۲ خانه ای مورد بررسی قرار گرفتند.

القا سلول های بنیادی مزانشیمی به آدیپوسیت در

شیشه

سلول های پاساژ ۳ با دانسیته 5000 سلول بر سانتی متر مربع در ظرف های ۱۲ خانه ای کشت شدند و پس از این که سلول ها به سطح پوشاندگی رسیدند، محیط آن ها با محیط القاکننده تمایز به آدیپوسیت جایگزین شد. این محیط M محتوی FBS ۱۰ درصد، DMEM-LG شامل ۷- ۱۰ ایزوبوتیل- 3.5mM دگزامتازون 1 - متیل گترانتین (Sigma, USA) (Sigma, USA)، ۱ واحد از ترکیب انسولین- ترانسفرین- سلنیت سدیم (Gibco) و 10mM

شود. در این روش از 250000 سلول استفاده شد، فلاسک T ۷۵ که حاوی این سلول ها در پاساژ ۳ بود را بعد از شستشو با PBS و تریپسینه کردن، سانتریفیوژ کرده و بعد از شمارش با ۲-۳ میلی لیتر محلول PBS سانتریفیوژ و سوسپانسیون رویی دور ریخته و با استفاده از 250 میکرولیتر PBS سلول ها هموژن گردید. از سوسپانسیون مذکور، مقدار 50 میکرولیتر و از هر یک از آنتی بادی های مونوکلونال کونژوگه به رنگ های فلورسنت نیز مقدار 5 میکرولیتر به هر لوله افزوده خواهد شد. به موازات، سلول ها با آنتی بادی ایزوتایپ کنترل نیز مجاور شدند. سپس لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای یخچال انکوبه و سپس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری آنالیز شدند (۷). فلوسایتومتری بر اساس پراکنده سازی نور توسط سلول های مورد آزمایش و انتشار فلورسانس از آن ها استوار است. نشر فلورسانس با استفاده مستقیم از فلوروکروم های متصل شونده به اجزای سلولی یا ترکیبی از رنگ فلورسنت با آنتی بادی های مونوکلونال حاصل می شود. این آنتی بادی های کونژوگه با فلورسانس می توانند مولکول های سطحی و یا ترکیبات داخلی سلول ها را ردیابی کرده و به آن ها متصل شوند و شناسایی انواع سلول های موجود در یک جمعیت سلولی متنوع را توسط فلوسایتومتری امکان پذیر می سازند و در نهایت با توجه به جمعیتی از سلول ها که این مارکرها را بیان کرده اند نتایج را به صورت درصد نسب به کل جمعیت سلولی مورد آنالیز ارائه می دهد.

لیست آنتی بادی ها شامل :

CD44-، CD29-PE، CD90-FITC، CD73-PE

CD105-، CD11b-PE، CD45-FITC، FITC IgG1-

PE-CD34 و FITC PE-IgG1/FITC

بررسی توان تمایزی سلول ها

القا سلول های بنیادی مزانشیمی به استئوسیت در

شیشه

بدین منظور از سلول های پاساژ ۳ استفاده و با دانسیته 5000 سلول بر سانتی متر مربع سلول ها در ظروف ۱۲ خانه

پارافرمالدهید ۱۰ درصد فیکس شد، سپس با استفاده از الکل و گزلیل به ترتیب آبگیری و شفاف سازی و در پارافین قالب گیری شده، با استفاده از میکروتوم، برش های ۵ میکرومتری تهیه گردید. سپس رنگ تولوئیدن بلو با غلظت ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه به مقاطع بافتی افزوده شد. در انتها رنگ اضافی با آب مقطر شسته شد. هسته، اسید موکوپلی ساکاریدها و موکوپلی ساکاریدهای سولفات متراشحه از سلول های غضروفی به وسیله میکروسکوپ نوری تحت بررسی قرار گرفت.

محاسبه تعداد دو برابر شدگی جمعیتی (PDN) و زمان دو برابر شدن جمعیت (PDT):

تعداد دو برابر شدگی جمعیت برای سلول های مزانشیم جدا شده از هر ۳ منبع بافت مورد استفاده در این تحقیق از پاساژهای سوم تا دهم بررسی شد. بدین ترتیب که سلول ها با تراکم 2×10^3 سلول (NO) در چاهک های پلیت ۶ خانه به صورت ۳ بار تکرار کشت داده شد هر سه روز یک بار محیط کشت تعویض شد. در هر بار پاساژ پس از جدا سازی سلولی، ضمن برآورد درصد سلول های زنده، تعداد آن ها نیز با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. سپس میزان دو برابر شدن جمعیت (PDN) و زمان دو برابر شدن سلول های مزانشیم (PDT) با استفاده از فرمول زیر قابل محاسبه می باشد. سلول ها جدا شده و شمارش شدند (N). و بر اساس فرمول $\text{Log}_2 = \text{PDN} = \text{N0/N}$ دو برابر شدن جمعیت سلولی محاسبه گردید. و با تقسیم زمان تقسیم بر دو برابر شدگی جمعیت زمان دو برابر شدن جمعیتی محاسبه گردید (۱۸).

نتایج:

مورفولوژی سلولی:

سلول ها، روزانه با میکروسکوپ کنتراست مشاهده شد. مورفولوژی سلول های کشت اولیه سلول های چسبنده، جمعیت سلولی هتروژن بود. در این زمان، سلول هایی با مورفولوژی متفاوت از قبیل پهن، دوکی و چندوجهی مشاهده شد. در پاساژهای بالاتر تعداد سلول های دوکی

ایندومتاسین (USA, Sigma) بود که سلول ها به مدت ۲۱ روز تحت تأثیر القا قرار گرفتند. هر سه روز یک بار تعویض محیط صورت گرفت. به عنوان گروه کنترل، محیط برخی از خانه ها با محیط معمولی یعنی DMEM با درصد گلوکز پایین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی بیوتیک جایگزین شد (۳). ارزیابی تمایز آدیپوسیت. سلول ها بعد از دو بار شستشو با محلول PBS و تثبیت شدن با پارافرمالدهید ۴ درصد به کمک رنگ اوایل رد (با غلظت ۰/۳ درصد ایزوپروپانول ۶۰ درصد) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، رنگ آمیزی و سپس با آب مقطر شستشو شد. واکوئل های چربی در سلول ها مورد بررسی قرار گرفتند.

القا سلول های بنیادی مزانشیمی به کندروسیت در شیشه

سلول ها از فلاسک کشت با دانسیته 200000 سلول بر سانتی متر مربع به تیوب ۱۵ میلی لیتری از جنس پروپیلن منتقل و در دور rpm 2000 و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و توده کوچک سلولی در ته تیوب تشکیل شد و بعد، محیط القاکننده تمایز به غضروف که شامل محیط محتوی ۱۰ درصد FBS ۱/۶ درصد، DMEM-LG کشت - ۱/۶ اسید آسکوربیک $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ - (Sigma, USA) دگزامتازون رشد فاکتور $10 \text{ ng}/\text{ml}$ ، (Sigma, USA) فسفات - ۲ ترانسفورمینگ بتا (USA, Sigma) و ۱ واحد از ترکیب انسولین - ترانسفرین - سلنیت سدیم (Gibco) بود به مدت چهار هفته به سلول ها اضافه شد. در این مدت هر سه روز یک بار محیط سلول ها تعویض شد. به عنوان گروه کنترل، محیط برخی از کشت ها با محیط معمولی یعنی DMEM با درصد گلوکز پایین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی بیوتیک جایگزین شد (۱۲). ارزیابی تمایز کندروژنیک. نمونه ها به روش روتین بافتی پردازش و برش های ۵ میکرومتری از آن ها تهیه شد. به این ترتیب که پلیت سلولی موجود در انتهای تیوب پلی پروپیلن به مدت ۲ ساعت در

پایان دوره تمایز (روز ۲۱)، اغلب سلول‌ها حاوی قطرات چربی بودند شکل قطرات چربی، به دنبال رنگ آمیزی اوایل رد، قرمز رنگ شدند، در مقابل در سلول‌های کنترل که به مدت ۲۱ روز در محیط فاقد مواد چربی قرار داشتند، قطره چربی تشکیل نشد. با استفاده از رنگ آمیزی اوایل رد، تمایز آدیپوزن در AD-MSK و BM-MSK و DSCs دیده می‌شود. در برش‌های تهیه شده از کشت تمایز به غضروف، که با تولوئیدین آبی رنگ آمیزی شدند، مناطق بنفش رنگ مربوط به نواحی تمایز یافته به غضروف را نشان می‌دهد در حالی که نقاط آبی رنگ مناطق تمایز نیافته را نشان می‌دهد. از آن جا که رنگ آمیزی بنفش از طریق تولوئیدین آبی نشان دهنده تمایز کندروستیک است، BM-MSK بیشترین پتانسیل برای تمایز کندروستیک و سپس DSCs و AD-MSK به ترتیب بالاترین توانایی تمایز به غضروف را نشان دادند.

تعداد دو برابر شدگی جمعیتی (PDN) و زمان دو برابر شدن جمعیت (PDT):

همان طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است. DSCs نسبت به BM-MSK و AD-MSK در طول زمان‌های P1 تا P10 به طور مضاعف زمان دو برابر شدن جمعیت را کمتر نشان می‌دهند ($P \leq 0.05$). میانگین زمان دو برابر شدن جمعیت برای سلول‌های DSC در پاساژ ۱ تقریباً ۱۸ ساعت بود و تا پاساژ ۱۰ نیز این زمان تغییر قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشده بود.

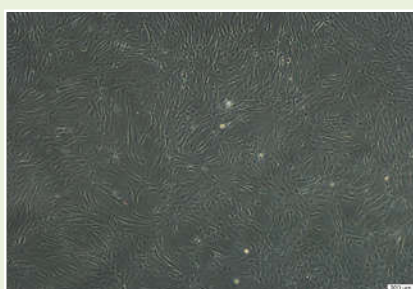
شکل بیشتر شد. به طوری که در پاساژ سوم اکثریت سلول‌ها دوکی شکل بودند (شکل ۱). مارکرهای سلول مزانشیمی شامل CD44، CD73، CD90 و CD105 با میزان مثبت بالا در همه سه نوع MSC بیان شد. با این وجود، هیچ نشانه‌ای از نشانگرهای سلول‌های هماتوپوئیتیک شامل CD11b، CD34 و CD45 در تمام منابع مختلف MSCs نمایش داده نشد. CD90 در BM-MSK ها نسبت به AD-MSK ها و DSC میزان بیان بالاتری داشت. CD44 در DSC به مقدار قابل ملاحظه‌ای نسبت به BM-MSK و AD-MSK بیان شده است (شکل ۲).

بررسی توانایی تمایز

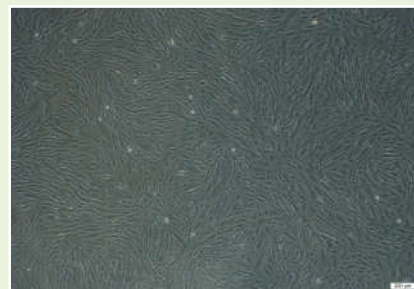
بر اساس نتایج ما، سلول‌های مزانشیم جدا شده از هر سه منبع می‌تواند به سه شکل از استئوسیت‌ها، آدیپوسیت‌ها و کندروسیت‌ها تمایز پیدا کند (شکل ۳). اولین نشانه‌های تغییرات ریخت‌شناسی و تمایز به استخوان یک هفته پس از القای تمایز مشاهده گردید، بدین ترتیب که در مناطقی از تک لایه سلولی، توده‌های سلولی در روز هفتم تشکیل شد و به تدریج بزرگ‌تر و در روز ۲۱ تعداد فراوانی توده در ظرف کشت قابل مشاهده بود. در این زمان، کشت تمایزی سلول، خاتمه داده و سلول‌ها از نظر ترشح ماتریکس معدنی با روش آلزارین قرمز ارزیابی شدند که حاصل آن قرمز شدن توده‌های مذکور بود. در کشت کنترل که سلول‌ها در معرض محیط معمولی فاقد مواد القاکننده تمایز به استخوان قرار داشتند، توده‌های سلولی تشکیل نشد و این کشت با آلزارین قرمز رنگ نشد. بر اساس نتایج ما BM-MSK ها بالاترین میزان تمایز را برای استئوسیت‌ها نسبت به AD-MSK و DSC نشان دادند که به واسطه رسوب کلسیم در شکل ۳ با رنگ آمیزی آلزارین رد نشان داده شده است. اولین قطرات چربی ۳ روز پس از آغاز کشت در برخی از سلول‌ها مشاهده شد. این قطرات به تدریج در سایر سلول‌ها نیز ظاهر شد، به طوری که در



AD-MSC,P3



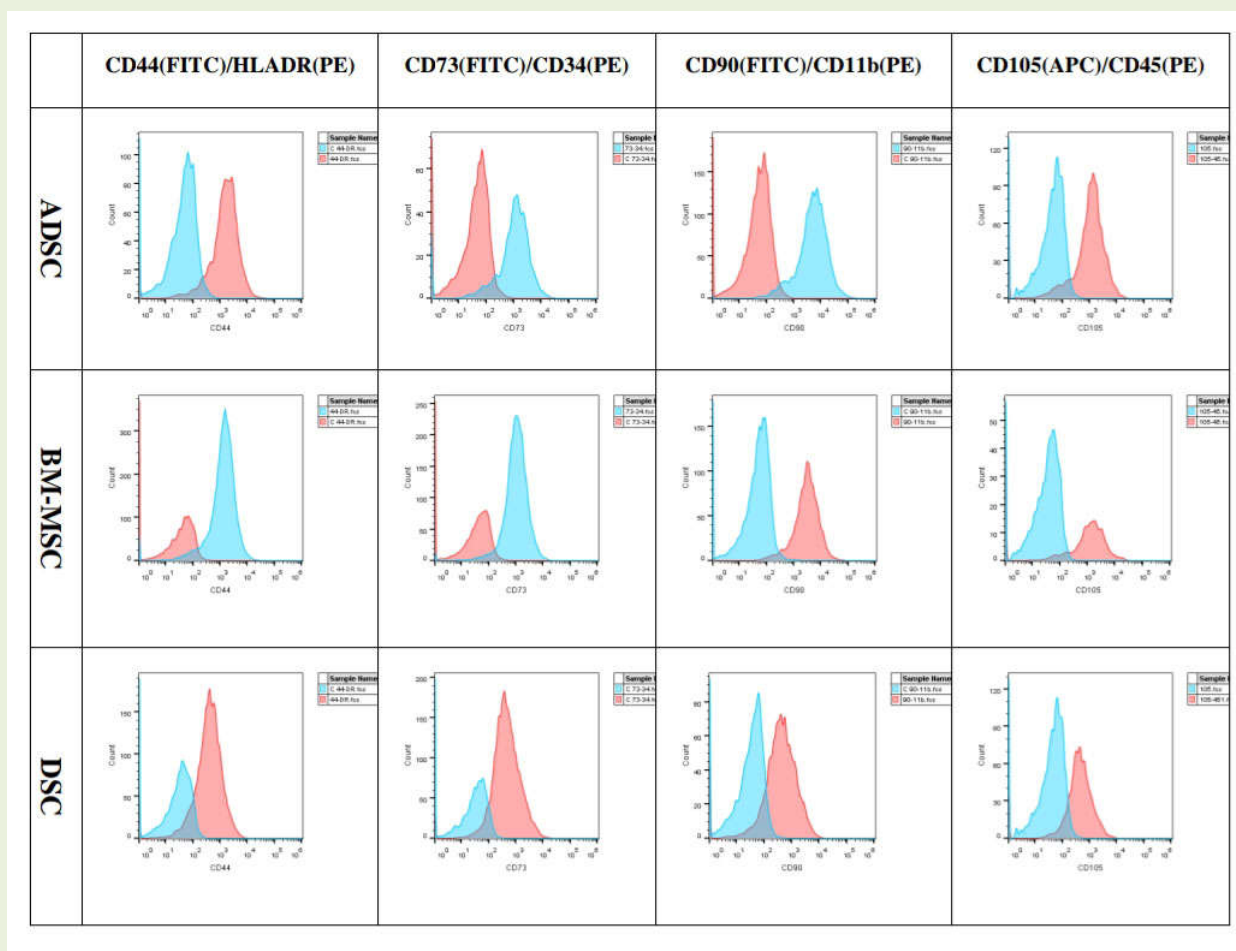
BM-MSC,P3



DSC,P3

شکل ۱- مورفولوژی AD-MSC، BM-MSC و DSC در پاساژ ۳.

همه سلول ها مورفولوژی مشابه فیبروبلاست یعنی فرم دوکی شکل و چسبنده را نشان دادند.

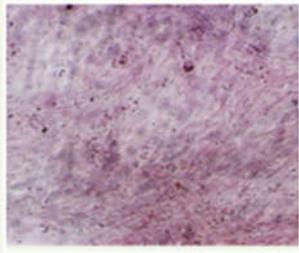


شکل ۲- نمودار فلوسیتومتری، نشان دهنده میزان بیان CD105, CD90, CD73, CD44 در سلول های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان، بافت چربی و پرده جنینی. HLADR, CD34, CD11b, CD45 در تمام نمونه ها منفی گزارش شدند.

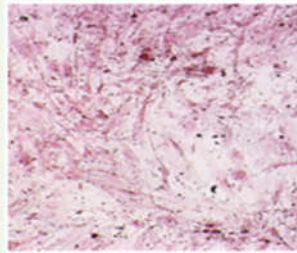
طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، سطح دو برابر شدن جمعیت، برای DSC تقریباً ثابت بود، در حالی که برای BM و AD در طی پاساژ سلولی کاهش یافت.

با این حال، زمان دو برابر شدن جمعیت برای BM-MSC ها و AD-MSC ها به ترتیب ۳۵ و ۴۰ ساعت بود و پس از پاساژ ششم افزایش قابل توجهی مشاهده می شود. همان

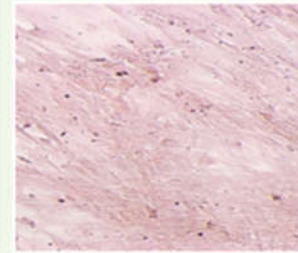
1.



AT-MSC control

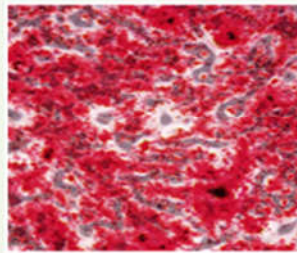
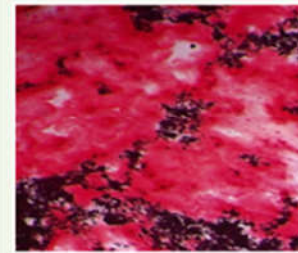


BM-MSC control



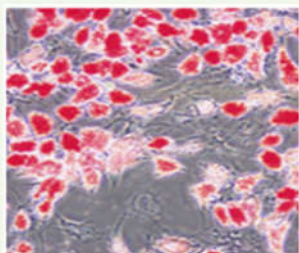
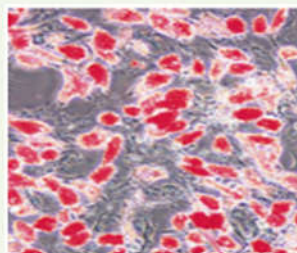
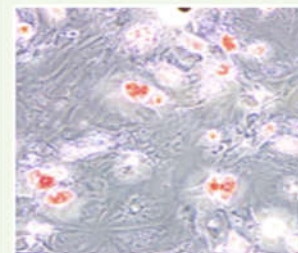
DSC control

2.

AT-MSC
osteogenesisBM-MSC
osteogenesis

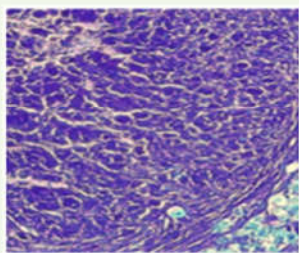
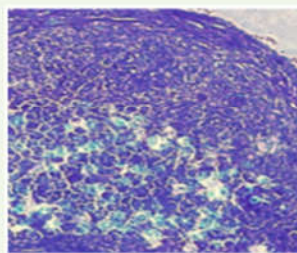
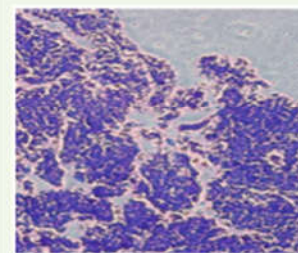
DSC osteogenesis

3.

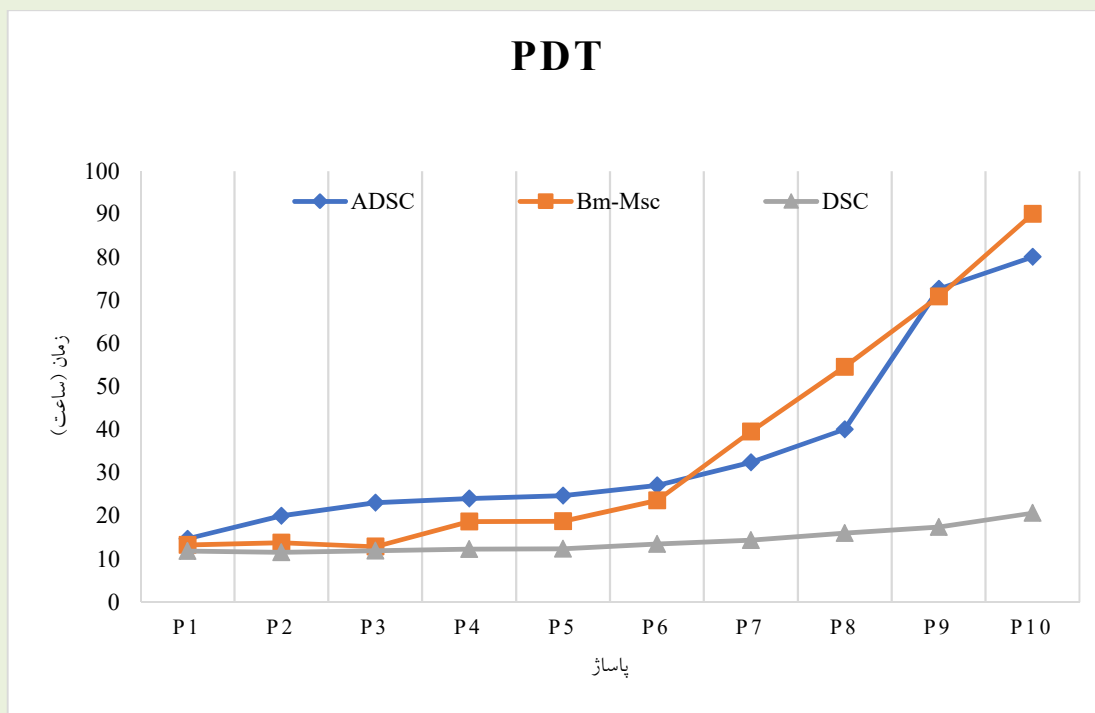
AT-MSC
adipogenesisBM-MSC
adipogenesis

DSC adipogenesis

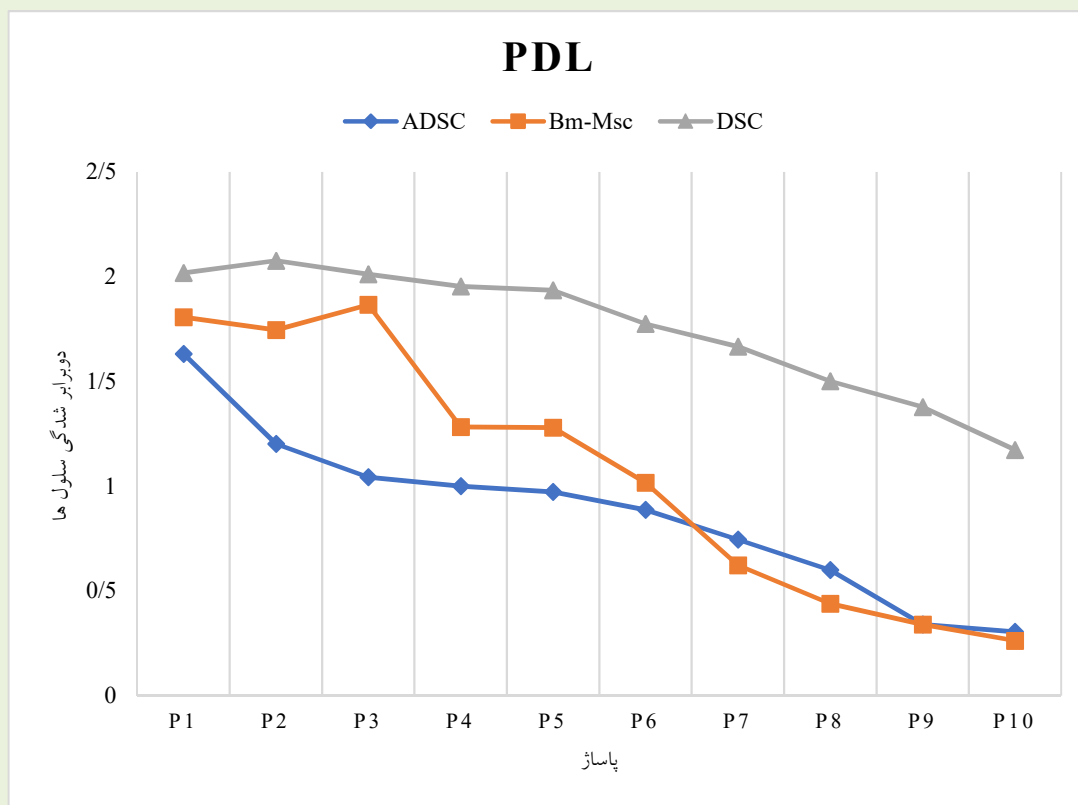
4.

AT-MSC
chondrogenesisBM-MS
chondrogenesisDSC
chondrogenesis

شکل ۳-مقایسه قابلیت تمایز به ۳ رده استخوان، چربی و غضروف در سلول های مزانشیم جداشده از مغز استخوان، بافت چربی و پرده جنینی. (۱) مورفولوژی سلول ها با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (۲)، رنگ آمیزی oil Red نشان دهنده تمایز چربی (۳) و رنگ آمیزی رنگ آلیزارین رد که نشان دهنده تمایز استئوژنیک است (۴) رنگ آمیزی تولوئیدین آبی نشان دهنده تمایز غضروفی است.



نمودار ۱- زمان دو برابر شدن جمعیت (PDT). مقایسه زمان دو برابر شدن جمعیت AD-MSC ، BM-MSC و DSC .



نمودار ۲- مقدار دو برابر شدن جمعیت (PDL). مقایسه تعداد دو برابر شدن جمعیت AD-MSC ، BM-MSC و DSC .

بحث و نتیجه گیری

معمولاً کم بودن تعداد سلول های کشت داده شده در طول ۳ پاساژ به عنوان یک محدودیت مطرح می شود. بنابراین محققین پیوسته به دنبال یک منبع جایگزین با بیشترین بازده می باشند که علاوه بر این که تعداد سلول های بیشتری وجود داشته باشد، سلول ها به لحاظ کروموزومی هم نرمال، هم چنین این سلول ها از بافت بالغ، قابل دسترس و مشکلات اخلاقی و مشکلات ایجاد تراژوما را نیز به همراه نداشته باشد (۶). هر چند که سلول های مزانشیم عمدتاً از مغز استخوان جداسازی می شوند، اما امروزه می توان آن ها را از سایر بافت ها نظیر بافت چربی، جفت، مایع آمیوتیک، بند ناف و پرده جنینی استخراج و جدا کرد. در دسترس ترین منبعی که برای استفاده از این سلول ها پیشنهاد می شود همان مغز استخوان است. گرچه این سلول ها از منابع دیگری مثل کبد، خون نوزادان، خون بند ناف و مایع آمیوتیک بافت چربی و پرده جنینی نیز قابل جداسازی هستند. این سلول ها ۰/۰۱ تا ۰/۱ درصد از جمعیت سلول های هسته دار مغز استخوان انسان را تشکیل می دهند، از استخوان ایلیاک کرسست جدا شده و قابلیت جدا سازی از استخوان های تیبا و فمور را هم دارند و جالب این که توانایی ازدیاد و تکثیر در محیط آزمایشگاهی را به خوبی نشان داده اند. ولی در سال های اخیر به دلیل محدودیت هایی که استفاده از سلول های مزانشیمی مشتق شده از بافت مغز استخوان به همراه داشته از جمله دسترسی مشکل و روند پردرد استخراج مغز استخوان از بیمار استفاده از این سلول ها برای فرد غیر از اهدا کننده میسر نمی باشد و استفاده از این منبع سلول مزانشیمی را با محدودیت هایی مواجه کرده است لذا توجه محققین به سمت بافتی جایگزین به عنوان منشا سلول مزانشیمی جلب شده است (۶). هدف ما در این مطالعه مقایسه ویژگی های فنوتیپی، توانایی تکثیر و تمایز به سه رده سلول های چربی، استخوان و غضروف در ۳ رده سلول مزانشیم جدا شده از بافت های مغز استخوان،

سلول درمانی شاخه ای از پزشکی ترمیمی است که در آن از تزریق سلول های فرآوری شده در خارج از بدن برای پیوند اعضا، بیماری های پوستی، غضروفی، خودایمنی، عصبی، سرطان ها و بیماری های قلبی استفاده می شود. از مهم ترین سلول های بنیادی بزرگسالان که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است می توان به سلول های بنیادی مزانشیم اشاره کرد. سلول های بنیادی مزانشیمی سلول های بالغ غیرهماتوپویتیکی چند ظرفیتی و خودنوساز هستند (۹). این سلول ها اولین بار از مغز استخوان جدا شده و بیشترین مطالعات بر روی این سلول ها انجام شده و به عنوان استاندارد طلایی در مطالعات سلولی و سلول درمانی به حساب می آیند. حدوداً بیش از یک دهه مطالعات تجربی (مدل های حیوانی) مورد استفاده قرار گرفته اند. این سلول ها با توجه به خواص تعدیل کنندگی از طریق عوامل و فاکتورهای سرکوب کننده سیستم ایمنی و توان ترمیمی آن ها، استفاده گسترده ای در درمان بیماری های ایمونولوژیک، بیماری های مزمن و خود ایمنی و غیر ایمونولوژیک، مهندسی بافت، ترمیم، بیماری های تخریب کننده و بدخیم از جمله سرطان دارند. یکی از بزرگترین چالش های استفاده از سلول مزانشیم مغز استخوان در سلول درمانی روند پردرد بودن و پرهزینه بودن استخراج سلول ها می باشد که استفاده از این سلول ها را به عنوان کاندید برای پیوند آلوگرافت با محدودیت مواجه کرده است. به طور نرمال پس از جداسازی سلول های مزانشیم از بافت مورد نظر، سلول ها را تا پاساژ ۳ کشت می دهند و سپس به بیمار تزریق می کنند. لزوم انجام این کار این است که سلول مزانشیم از سایر سلول ها خالص سازی شود و هم چنین تزریق سلول مزانشیم جوانی که هم به لحاظ سرعت تکثیر و هم به لحاظ توانایی در تمایز به رده های مختلف سلولی (استخوان، غضروف و چربی) و خاصیت بنیادینگی سلول نیز حفظ شود. اما

خود نگه می دارد. هم چنین در این مطالعه م به بررسی میزان توانایی تمایز سلول های بنیادی به ۳ رده اصلی استخوان، چربی و غضروف پرداخته شده است، که توانایی تمایز را در هر ۳ رده مشاهده نمود، علاوه بر آن با توجه به این که هر سلول مزانشیم از چه منبع جدا می شود توانایی تمایز را به صورت متفاوت نشان می دهد که این موضوع بر می گردد به ریز محیط سلول های مزانشیمی که از هر منبع گرفته می شود. به عنوان مثال سلول های مزانشیم که از بافت چربی گرفته می شود توانایی تمایز به بافت چربی را بسیار بیشتر از سایر سلول ها نشان می دهد. سلول-های مزانشیمی که از بافت مغز استخوان گرفته می شود توانایی استخوانی شدن را بیشتر از سایر سلول ها نشان می دهد. Anker t In و همکارانش در سال ۲۰۰۴، اولین بار نشان دادند که پرده ی آمیون شامل تعداد زیادی سلول-های بنیادی مزانشیمی با توانایی تمایز به آدیپوژنیک و استئوژنیک است (۲). پرده جنینی ۳ لایه آمیون، کوریون و بخش دیسیجوآ دارد، که از این ۳ لایه فقط بخش دیسیجوآ سلول هایی با منشا مادری دارد، از آن جایی که استفاده از سلول های بنیادی با منشا جنینی خطرات ایجاد تراتوما را به دنبال دارد، در این مطالعه از بخش دیسیجوآ استفاده شد. این سلول ها را بعد از این که اطمینان پیدا شد تمامی سلول ها منشا مادری دارند مارکر های سطح سلولی و توانایی تمایزی به استخوان غضروف و چربی را در آن ها بررسی گردید. Alviano و همکارانش موارد به دست آمده توسط Anker t In و همکارانش را که در مورد ظرفیت تمایز سلول های مزانشیمی استخراج شده از پرده جنینی به آدیپوژنیک و استئوژنیک بود، را مورد تایید قرار دادند (۲). علاوه بر این، lans-portsmann و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که سلول های مزانشیم جدا شده از جفت، قادر به تمایز به دودمان کندروژنیک و میوژنیک و نوروژنیک بودند و همچنین با تفاوت های عمده در میان انواع سلول ها در ارتباط با منابع مختلف جنینی جفت،

چربی و پرده جنینی بود. در این راستا بافت چربی جایگاه ویژه ای را در این خصوص پیدا کرده است. این سلول ها توانایی تمایز به غضروف، استخوان، عضله و چربی را در حضور فاکتورهای تمایزی و شرایط کشت مناسب دارا هستند. هم چنین در مقایسه با سلول های مشابه مشتق از بافت های دیگر از جمله مغز استخوان، دارای ویژگی ها و مزایای فراوانی هستند که از جمله آن ها می توان به دسترسی آسان این سلول ها از بیمار در مقادیر نسبتاً فراوان با استفاده از روش لیپوساکشن اشاره نمود. بنابر این امکان استفاده از این سلول ها به فرد دیگر با محدودیت های کمتری مواجه می باشد (۱۵). یکی دیگر از بافت های پیشنهادی بافت های خارج جنینی می باشد. از آن جایی که جنین در داخل رحم مادر به عنوان یک موجود نیمه بیگانه حفظ می شود و بافت های خارج جنینی توانایی سرکوب پاسخ ایمنی مادر بر علیه جنین را دارد، بنابراین سلول های مزانشیم مشتق شده از بافت پرده جنینی با منشا مادری علاوه بر این که جز سلول های مزانشیمی بافت بالغ محسوب می شود و خطرات و مشکلات استفاده از سلول-های بنیادی جنینی از جمله احتمال بروز عارضه تراتوما و مسائل اخلاقی را در بر ندارد، میتواند گزینه مناسبی برای رفع چالش رد پیوند در سلول درمانی نیز محسوب شود (۱۱). ونگ و همکارانش در سال ۲۰۰۴ سلول های مزانشیم را از ژله وار تون بند ناف انسان جدا کردند و نشان دادند که این سلول ها نسبت به CD10 CD44 بیان مثبت دارند و قادر هستند به سلول های چربی و استخوان تمایز یابند (۲). بر اساس نتایجی که از این مطالعه به دست آورده شده است، میزان بیان بالایی از CD44 را در سلول های مزانشیم استخراج شده از پرده جنینی را مشاهده می گردد، مارکر CD44 از آن جایی که مارکر اصلی اتصال سلولی می باشد، گواه این موضوع می باشد که سلول های مزانشیم جدا شده از پرده جنینی این ویژگی اتصال سلولی که از مهم ترین خواص سلول های مزانشیم است را در

استخراج شده از مغز استخوان می باشد. بیشترین توانایی تمایز به چربی و تشکیل و زیکول های چربی در سلول های مزانشیم استخراج شده از بافت چربی می باشد. تجزیه و تحلیل منحنی های رشد در طول پاساژهای مختلف نشان داد که DSC دارای قوی ترین پتانسیل تکثیر است که به دنبال AD-MSCs و BM-MSCs است. گزارش های قبلی نشان داده است که AD-MSC ها ظرفیت تکثیر بیشتری در مقایسه با BM-MSC ها را نشان می دهند (۴). در مطالعه انجام شده توسط پنگ و همکاران، AD-MSCs زمان دو برابر شدن جمعیت را به ۲/۴۵ ساعت نشان داد که به طور معنی داری کمتر از BM-MSC ها بود که برابر با ۲/۶۱ ساعت بود (۶). هم چنین لازم به ذکر است که AD-MSC های جدا شده از نواحی مختلف بدن دارای ظرفیت های تمایزی متفاوت هستند (۱۵، ۱۴، ۶). علیرغم این یافته ها، برخی معتقدند که تفاوت های رشد ممکن است به تفاوت بین اهدا کنندگان مربوط باشد. به این ترتیب سلول های چربی هرچقدر از بافت های چربی اهدا کنندگان جوان تر دریافت شود سرعت تکثیر و توانایی تمایز بهتری را نشان می دهند (۱۱). نتایج این پژوهش به وضوح نشان داد که AD-MSC ها و BM-MSC ها به آدیپوسیت ها به خوبی تمایز می یابند که با نتایج Rebelatto و همکاران متفاوت است (۱۷، ۱۴). با این حال، DSCs نسبت به آدیپوسیت ها کمی متفاوت است. از نظر استئوژنز، نتایج نشان داده شد که BM-MSCs و AD-MSCs بیشترین تمایز را نشان دادند که با یافته های گزارش شده توسط Shafiee و Zhang و همکاران مطابقت داشت (۱۷، ۱۳). DSC کمترین قدرت را در تمایز استئوژنیک نیز نشان داد. شدت غضروفی شدن در BM-MSC ها بالاتر از سایرین بود و AD-MSCs و DSCs بالاترین شدت را داشتند. بر اساس نتایج بافت شناسی هر ۳ منبع تحت شرایط القایی مناسب از توان بالایی جهت تمایز به بافت استخوان و غضروف برخوردارند. در حالی که بر خلاف

کوربون، آمینون هستند (۶). در این مطالعه به بررسی توانایی تمایز سلول ها به ۳ رده استخوان و چربی و غضروف پرداختیم که با اثبات این که سلول های مزانشیم جدا شده از پرده خواص اصلی و کلیدی سلول مزانشیم را دارا می باشد در قدم بعدی از آن ها برای مطالعات بیماری های مختلف از جمله MS نیز استفاده می گردد و توانایی تمایز به سلول عصبی را نیز بررسی می شود. Viano و همکارانش Al در سال ۲۰۰۷ سلول های مزانشیمی را از پرده آمینون جدا کردند و دریافتند که قدرت رشد و تکثیر سلول های مزانشیمی مشتق شده از پرده جنینی در شرایط آزمایشگاهی نسبت به مغز استخوان بیشتر است. در آنالیز فلوسایتومتری سلول های مزانشیمی مشتق شده از پرده جنینی مشخصات فنوتیپی برای آن ها که مارکرهای ویژه ای MSC ها هستند، CD44، CD166، CD105، CD73، CD29، مثبت و برای CD34، CD45، مارکرهای سلول های خونساز و CD14 مارکر سایر سلول ها، منفی بودند. Mihu و همکارانش در سال ۲۰۰۹ سلول های مزانشیمی را از پرده آمینون جدا کردند و نشان دادند که این سلول ها نسبت به CD105، CD73، CD29، CD49، مثبت و برای CD4 و CD14، CD34 منفی هستند (۱۰). در این مطالعه با بررسی زمان ۲ برابر شدن سلول ها با توجه به این که مدت زمانی که طول می کشد تا سلول ها ۲ برابر شوند در محیط کشت و شرایط آزمایشگاهی از سلول های مزانشیم مغز استخوان و چربی بسیار پایین تر است، بنابر این نتیجه گرفته می شود که این سلول ها به لحاظ اقتصادی نیز بسیار به صرفه می باشند زیرا در مدت زمان کوتاه تری به سلول های بیشتری دست پیدا می گردد. در این مطالعه با بررسی توانایی تمایز به استخوان، چربی و غضروف، بر روی سلول های مزانشیم استخراج شده از سلول های چربی، مغز استخوان و پرده جنینی مشاهده شد که بیشترین توانایی تمایز به استخوان و تشکیل رسوب کلسیم مربوط به سلول های مزانشیم

CD 34, 11b, 1در هر ۳ منبع بسیار پایین می باشد. به طور خلاصه بر اساس نتایج این تحقیق بر خلاف سلول های بنیادی مزانشیمی که به تدریج پس از ۹ پاساژ سلولی توان تکثیر خود را به میزان زیادی از دست می دهند، سلول های بنیادی مزانشیمی پرده جنینی توان خود نوزایی را طی پاساژهای متعدد حفظ می کنند. از آن جا که در سلول درمانی همواره با یستی تعداد زیادی از سلول های فعال از نظر متابولیک در دسترس باشند، توان تکثیر بالا در طی پاساژهای متعدد به عنوان یک مزیت برای این منبع سلولی محسوب می شود.

منابع

1. Alabdulkarim, Y., Ghalimah, B., Al-Otaibi, M., Al-Jallad, H.F., Mekhael, M., Willie, B. (2017). Recent advances in bone regeneration: The role of adipose tissue-derived stromal vascular fraction and mesenchymal stem cells. *Journal of Limb Lengthening & Reconstruction*, 3(1) 4.
2. Araújo, A.B., Salton, G.D., Furlan, J.M., Schneider, N., Angeli, M.H., Laureano, Á.M. (2017). Comparison of human mesenchymal stromal cells from four neonatal tissues: amniotic membrane, chorionic membrane, placental decidua and umbilical cord. *Cytotherapy*, 19(5); 577-585.
3. Casado-Díaz, A., Anter, J., Müller, S., Winter, P., Quesada-Gómez, J.M., Dorado, G. (2017). Transcriptomic analyses of adipocyte differentiation from human mesenchymal stromal-cells (MSC). *Journal of Cellular Physiology*, 232(4); 771-784.
4. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society For Cellular Therapy Position Statement*, *Cytotherapy*, 8(4); 315-317.
5. Galleu, A., Riffo-Vasquez, Y., Trento, C., Lomas, C., Dolcetti, L., Cheung, T.S. (2017). Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Science Translational Medicine*, 9(416); eaam7828.
6. Jin, H.J., Bae, Y.K., Kim, M., Kwon, S.-J., Jeon, H.B., Choi, S.J. (2013). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord

سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان و چربی بر اساس نتایج رنگ آمیزی Oil red سلول های بنیادی مزانشیمی پرده جنینی تحت شرایط لیپوژنیک از توان بسیار پایینی برای تمایز به بافت چربی برخوردارند. نتایج آزمایش فلوسیتومتری نشان می دهد که سلول های شبه فیروبلاستی جدا شده از پرده جنینی در مقایسه با مغز استخوان و چربی به میزان بالاتری مارکرهای سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی شامل CD 105, CD 90, CD 73, CD 44 را بیان می کنند. بیان مارکرهای اختصاصی سلول های رده خون ساز شامل CD 45, CD

blood as sources of cell therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9); 17986-18001.

7. Li, H., Ghazanfari, R., Zacharaki, D., Lim, H.C., Scheduling, S. (2016). Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1370(1); 109-118.

8. Moll, G., Ankrum, J.A., Kamhieh-Milz, J., Bieback, K., Ringdén, O., Volk, H.-D. (2019). Intravascular mesenchymal stromal/stem cell therapy product diversification: time for new clinical guidelines, *Trends in Molecular Medicine*.

9. Pereira, M.R.d.J., Pinhatti, V.R., Silveira, M.D.d., Matzenbacher, C.A., Freitas, T.R.O.d., Silva, J.d. (2018). Isolation and characterization of mesenchymal stem/stromal cells from *Ctenomys minutus*. *Genetics and Molecular Biology*, 41(4); 870-877.

10. Pfeiffer, D., Wankhammer, K., Stefanitsch, C., Hingerl, K., Huppertz, B., Dohr, G. (2019). Lang, amnion-derived mesenchymal stem cells improve viability of endothelial cells exposed to shear stress in eptfe grafts. *The International Journal of Artificial Organs*, 42(2); 80-87.

11. Rizzuto, G.A., M. Kapidzic, M. Gormley, A.I. Bakardjiev, Human Placental and Decidual Organ Cultures to Study Infections at the Maternal-fetal Interface, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (113) (2016) e54237-e54237.

12. Romanov, Y.A., Darevskaya, A., Merzlikina, N., Buravkova, L. (2005). Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bulletin of*

Experimental Biology and Medicine, 140(1); 138-143.

13. Sharma, R.R., Pollock, K., Hubel, A., McKenna, D. (2014). Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion*, 54(5); 1418-1437.

14. Shi, Y.-Y., Nacamuli, R.P., Salim, A., Longaker, M.T. (2005). The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 116(6); 1686-1696.

15. Schipper, B.M., Marra, K.G., Zhang, W., Donnenberg, A.D., Rubin, J.P. (2008). Regional anatomic and age effects on cell function of

human adipose-derived stem cells. *Annals of Plastic Surgery*, 60(5); 538-544.

16. Squillaro, T., Peluso, G., Galderisi, U. (2016). Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update, *Cell Transplantation*, 25(5); 829-848.

17. Wakitani, S., Saito, T., Caplan, A.I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine, *Muscle & Nerve*, 18(12); 1417-1426.

18. Wilson, A., Chee, M., Butler, P., Boyd, A.S. (2019). Isolation and characterisation of human adipose-derived stem cells. *Immunological Tolerance*, Springer, pp; 3-13.



Comparison of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue and Decidua

S. Kazemi ¹, K. Parivar ², N. Hayati Rudbari ³, P. Yaghmaei ⁴, B. Sadeghi ⁵

1. PhD student in Animal Science, Cell-Tachin Development, Department of Animal Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

2. Professor, PhD in Biology of Animal Sciences, Cell-Developmental Tendency, Department of Animal Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran. kazem_parivar@yahoo.com

3. Assistant Professor, Doctor of Biological Sciences, Animal Sciences, Cell-Technology Development, Department of Animal Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran. nasimhayati@yahoo.com

4. Assistant Professor, PhD in Animal Physiology, Department of Animal Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

5. Assistant Professor, PhD in Medical Immunology, Department of Cancer and Reconstructive Medicine Immunology, Breast Cancer Research Center, Motamed Research Institute, University Jihad, Tehran, Iran

Received:2019.25.12

Accepted: 2020.10.5

Abstract

Introduction & Objective: Stem cell therapy has introduced a new approach to repair and regeneration of organs and tissues. Mesenchymal stem cells (MSCs) are promising candidates for cell therapy. Although bone marrow-derived MSCs are able to differentiate into several cell lines, bone marrow is not an appropriate cell source due to the problem of cell division and low efficiency. The aim of this study was to compare the healing potential of human MSCs obtained from three sources including Bone marrow (BM-MSCs) and adipose tissue (AT-MSCs) and fetal membrane decidua (DSCs) tissue in vitro.

Material and Methods: MSCs were isolated from the human Bone marrow, Adipose tissue and decidua stromal cell, cultured for 10 passages, and assessed for: phenotype with immunofluorescence and flow cytometry, multipotency with differentiation capacity for osteo-, chondro-, and adipogenesis, growth evaluation with population doubling time and population doubling level was performed.

Results: Despite of similarities in terms of surface antigen expression and self-renewal capacity, MSCs of different sources demonstrated significant differences with regards to proliferation and multi-lineage differentiation capacities. DSCs showed the highest cell proliferation capacity and appeared to preserve it up to the tenth passage whereas BM-MSCs possessed significant advantage for osteogenic and chondrogenic differentiation and AT-MSCs showed the most potent adipogenic differentiation capacity among the others. Although demonstrating significant advantage for cell proliferation capacity, DSCs possessed the lowest osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation capacities.

Conclusion: Because AT-MSCs and DSCs as effectively as BM-MSCs, AT-MSCs and DSCs may constitute an alternative source for BM-MSCs.

Keywords: Freshwater Gammarus (*Gammarus fasciatus*), Lakanshahr Altitude, Temp, DO₂.