Archive of SID

مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۹، شماره‌ی ۷۷، زمستان ۱۳۹۰، صفحات ٦٢ تا ٦٩

بررسی بازده شیب چگالی در جدا سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نمونه‌ی مغز استخوان

ناصر احمدبیگی[۱]، دکتر مسعود سلیمانی[۲]، دکتر یوسف مرتضوی[۳]

نویسنده‌ی مسؤول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه هماتولوژی soleim_m@modares.ac.ir

دریافت: ۹۰/۳/۳۰ پذیرش: ۹۰/۶/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: *امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمی امیدهای تازه‌ای را برای درمان بیماری‌های مختلف به‌وجود آورده‌است. اما تعداد کم این سلول‌ها، تکثیر آن‌ها را اجتناب ناپذیر کرده است. به نظر می‌رسد تکثیر در محیط خارج بدن کیفیت این سلول‌ها را برای پیوند تحت تاثیر قرار می‌دهد. در تمامی روش‌های جدا سازی از شیب چگالی فایکل به‌عنوان کاهش دهنده‌ی حجم نمونه‌ی اولیه و حذف کننده RBC استفاده می‌شود. در این مطالعه بازده شیب چگالی فایکل مورد ارزیابی قرار گرفت.*

روش بررسی: *نمونه‌های مغز استخوان انسانی بر روی فایکل برده شد و پس از سانتریفوژ، سلول‌های لایه‌ی تک هسته‌ای روی فایکل و لایه‌ی RBC زیر فایکل کشت داده شد. سپس تعداد و خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از دو لایه با یکدیگر مقایسه گردید.*

یافته‌ها: *نتایج کشت نشان داد که لایه‌ی RBC زیر فایکل حاوی سلول‌های با مشخصات سلول‌های بنیادی مزانشیمی بودند. این سلول‌ها دوکی شکل بوده، از قدرت تکثیر بالا برخوردار بودند. هم‌چنین دارای پتانسیل تمایزی به رده‌ی چربی و استخوان می‌باشند. آنالیز سیتوفلورومتریک نشان داد که این سلول‌ها برای مارکرهایی سطحی CD73,CD90,CD105 مثبت و برای مارکرهایی CD45,CD34,CD31 منفی بودند. هم‌چنین این سلول‌ها ۲۲ ± ۵۸ درصد از کل سلول‌های بنیادی مزانشیمی یک نمونه را تشکیل می‌دادند.*

نتیجه‌گیری: *روش شیب چگالی از بازده لازم برای جدا سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی برخوردار نبوده، بیش از نیمی از کل سلول‌ها حین سانتریفوژ به زیر فایکل غوطه‌ور شده و حذف می‌شوند. در نتیجه روشی جایگزین برای جداسازی مقادیر بیشتری از این سلول‌ها از نمونه‌ی مغز استخوان مورد نیاز می‌باشد.*

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، جدا سازی سلول، شیب چگالی

مقدمه

امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) به‌واسطه‌ی قدرت تکثیر و تمایز بالا و همچنین جداسازی ساده، کاندید مطرحی در پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت به شمار می‌آیند (۲و۱). اما فراوانی کم این سلول‌ها مانع بزرگی بر سر راه استفاده از این سلول‌ها محسوب شده و امکان استفاده مستقیم از این سلول‌ها را غیر ممکن کرده است (۴و۳).

۱- دانشجوی دکترای هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- دکترای هماتولوژی، استادیار دانشگاه تربیت مدرس
۳- دکترای هماتولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

www.SID.ir

Archive of SID

هر چند این سلول‌ها قدرت تکثیر بالایی داشته و در مدت کوتاهی چندین برابر خواهند شد ولی تکثیر آن‌ها در خارج از نیچ طبیعی و در فضای دو بعدی کشت منجر به تغییر خصوصیات آن‌ها از جمله تغییر مارکرهای سطحی، خصوصیات تمایزی و اختلالات کرموزمی می‌گردد (۶و۵). متداول‌ترین روش جداسازی این سلول‌ها، روش مستقیم است که بر اساس قدرت اتصال این سلول به سطح پلاستیکی فلاسک کشت طراحی شده است (۷). روش‌های دیگری از جمله انتخاب مثبت و منفی هم معرفی شده‌اند که از مارکرهایی سطحی برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده می‌کنند (۹و۸). وجه مشترک تمامی این روش‌ها استفاده از شیب چگالی فایکل، به‌عنوان کاهش دهنده‌ی حجم نمونه و حذف کننده‌ی RBC می‌باشد. فایکل پلیمری قندی است که دارای چگالی ۱/۰۰۷ می‌باشد. پس از انتقال نمونه بر روی فایکل و سانتریفیوژ، RBC و سلول‌های چند هسته‌ای به دلیل داشتن چگالی بالاتر نسبت به فایکل، به زیر فایکل غوطه‌ور شده و سلول‌های تک هسته‌ای، مانند منوسیت ولنفوسیت در سطح فایکل باقی‌خواهند ماند. استفاده از شیب چگالی فایکل برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر این تصور استوار است که این سلول‌ها در نمونه‌ی مغز استخوان به‌صورت تک‌هسته‌ای و سینگل وجود دارند. تا به‌حال هیچ مطالعه‌ای به‌صورت مستقل بازده شیب چگالی فایکل را برای جداسازی این سلول‌ها بررسی نکرده و نشان نداده‌است که این روش قادر است چند درصد از کل سلول‌های بنیادی مزانشیمی را جداسازی کند. آیا فراوانی MSC به‌صورت ذاتی کم است و یا روش‌های مرسوم قادر به استحصال تمامی آن‌ها از نمونه‌ی مغز استخوان نیستند؟ به منظور پاسخ به این سوالات، در این مطالعه، ابتدا لایه‌ی سلول‌های زیر فایکل جدا سازی شد. سپس RBC آن لیز شده ،کشت داده شد و از نظر وجود سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، تعداد این سلول‌ها در لایه‌ی تک هسته‌ای روی فایکل و لایه‌ی RBC زیر فایکل با یکدیگر مقایسه شد.

روش بررسی

تهیه‌ی پلیت RBC: در این مطالعه از نمونه‌ی مغز استخوان ۱۰ داوطلب سل‌تراپی که به بیمارستان شریعتی مراجعه کرده بودند، استفاده شد. قبل از گرفتن نمونه، از تمامی داوطلبان رضایت نامه گرفته شد. بعد از رقیق کردن نمونه‌ی مغز استخوان با هم حجم خود از PBS (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) و انتقال ۱۰ میلی‌لیتر از این نمونه بر روی ۳ میلی‌لیتر از فایکل درون لوله ۱۵ فالکن (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) و سانترفیوژ آن در دور 2000 RPM به مدت ۲۰ دقیقه، لایه‌ی تک هسته‌ای روی فایکل و پلیت RBC باقی مانده زیر فایکل برداشته و داخل لوله های جدا گانه ریخته شد وسپس برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مورد کشت قرار گرفتند.

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی: پلیت RBC بدست آمده از زیر فایکل به نسبت یک به هشت با بافر لیز RBC (Sigma-Aldrich) مخلوط شد. بعد از ۱۵ دقیقه سانترفیوژ، پلیت سلولی باقی مانده در ۱۲ میلی‌لیتر محیط کشت کامل سینگل و به یک فلاسک T۷۵ منتقل شد. سلول‌های تک هسته‌ای روی فایکول هم به فلاسک دیگر منتقل شد. سپس هر دو فلاسک در شرایط CO_2 ۵ درصد و گرمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. محیط کشت پایه شامل محیط DMEM است که با ۱۰ درصد سرم گاوی (FBS) غنی شده است. بعد از گذشت چند روز که کلنی‌های سلولی مشاهده شد با استفاده از تریپسین ۰/۰۵ درصد (هر سه از GIBCO-BRL) کلنی‌های سلولی جدا شده و به فلاسک جدید منتقل شدند و بعد از گذشت ۱۰ روز ماهیت سلول‌های تکثیر شده از نظر بیان مارکرهای سطحی و قدرت

www.SID.ir

Archive of SID

تمایز مورد بررسی قرار گرفته، تعداد سلول به‌دست آمده از رو و زیر فایکل به‌صورت جداگانه شمارش شده و به‌عنوان درصدی از کل MSC گزارش شد.

فلوسیتومتری: بعد از تریپسینه کردن فلاسک و جدا سازی سلول‌ها از کف، شمارش آن‌ها انجام شد. سپس سوسپانسیونی از این سلول‌ها در آلبومین سرم گاوی ۳ درصد تهیه شد به‌صورتی که تعداد سلول نهایی آن ۱۰۰۰۰۰ سلول به ازای هر ۱۰۰ ماکرولیتر باشد. سپس یک‌صد ماکرولیتر از این سوسپانسیون درون چندین لوله ریخته شده، به هر کدام از آن‌ها، آنتی‌بادی‌های مورد نظر شامل CD90 ,CD105, CD73,CD31 CD45, CD34 و ایزوتیپ کنترل آن‌ها (eBioscience, San Diego, CA, USA) اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در یخچال قرار داده شد، سپس با PBS شستشو داده و آنالیز فلو (Partec, Münster, Germany) انجام شد. برای بررسی توانایی تمایز سلول‌های تکثیر شده، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول به چاهک‌های پلیت ۴ خانه منتقل شده و بعد از اتصال آن‌ها به کف، محیط القا کننده‌ی استخوان و چربی به آن اضافه شد، هر سه روز یک‌بار و به مدت ۲۱ روز با این محیط تعویض محیط انجام شد. نحوه‌ی آماده سازی محیط‌های تمایزی در کار قبلی ما توضیح داده شده است (۶). برای بررسی تمایز بعد از گذشت دوره‌ی ۲۱ روزه‌ی سلول‌ها در کف فلاسک با پارافرم آلدهید ۴ درصد فیکس شده، سپس از رنگ آلیزارین قرمز (alizarin red) برای بررسی وجود رسوب کلسیم در تمایز استخوان و از رنگ Oil Red برای بررسی قطرات چربی داخل سلولی در تمایز چربی استفاده شد وسپس با میکروسکوپ مورد مشاهده قرار گرفت.

یافته‌ها

مشاهده‌ی کلنی‌های بزرگ سلولی از کشت لایه زیر فایکل: ۲۴ ساعت بعد از کشت، سلول‌های غیر چسبنده با شستشو حذف شده، محیط کشت جدید به فلاسک‌ها اضافه شد و مورد مشاهده میکروسکوپی قرار گرفت. در فلاسک حاصل از کشت لایه‌ی زیر فایکل کلنی‌های سلولی که در بعضی موارد تعداد سلول‌های آن‌ها به ۵۰ عدد هم می‌رسید، مشاهده شد. مشاهده‌ی روزانه فلاسک نشان داد که سلول‌های این کلنی‌ها به سرعت تکثیر شده، به اطراف گسترش پیدا می‌کنند. مرفولوژی این سلول‌ها دوکی بوده، به‌طور میانگین تا پاساژ ۶ تکثیر شدند و پس از آن پهن شده و تکثیر آن‌ها متوقف شد (شکل ۱). این سلول‌ها ۲۲± ۵۸ درصد از کل سلول‌های بنیادی مزانشیمی هر نمونه را تشکیل دادند.

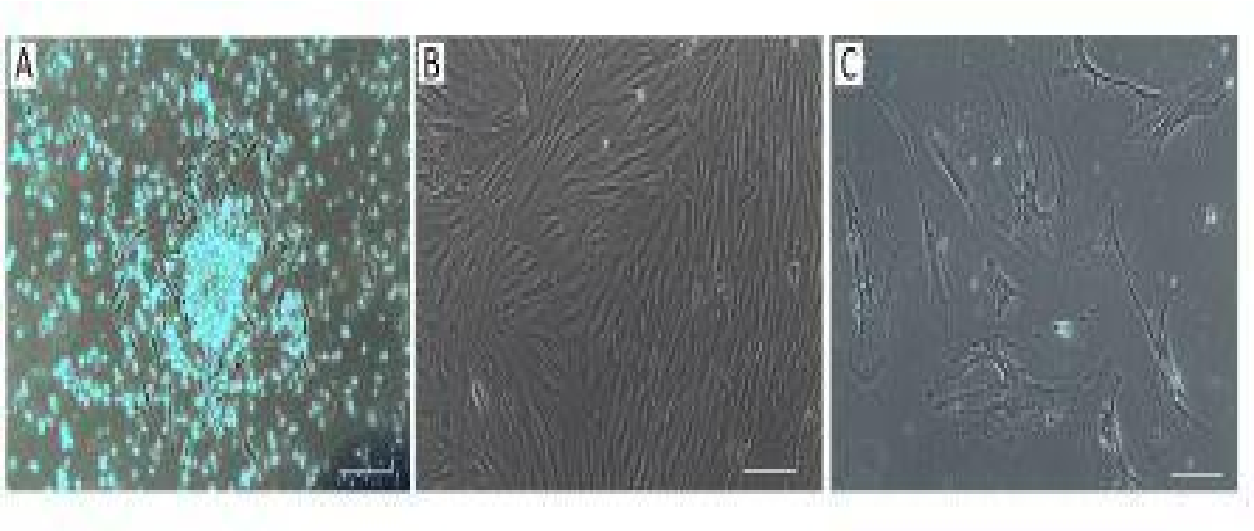
توانایی تمایز سلول‌های جدا شده به چربی و استخوان: بعد از اضافه کردن محیط تمایز استخوان، تقریبا از روز دهم کریستال‌های کلسیم با رنگ آمیزی اختصاصی آلیزارین رد مشاهده شد و در پایان دوره‌ی تمایز (روز ۲۱) سطح پلیت کاملا از رسوب قرمز رنگ پوشیده شده بود که حاکی از تمایز کامل این سلول‌ها به رده‌ی استوبلاستی می‌باشد. در محیط القا کننده به رده‌ی آدیپوسیتی نیز در روز پنجم واکوئل‌های چربی در بعضی سلول‌ها مشاهده شد که بدون رنگ آمیزی هم کاملا قابل مشاهده بود و در پایان تمایز تقریبا تمامی سلول‌ها تبدیل به رده‌ی آدیپوسیتی شده بودند که با رنگ آمیزی اختصاصی Oil Red تایید شد (شکل ۲). سلول‌های جدا شده از لایه‌ی تک‌هسته‌ای روی فایکل نیز قدرت تمایزی به دو رده را داشتند.

بیان مارکرهای معمول سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط سلول‌های جدا شده: برای تائید ماهیت سلول‌های جدا شده پانلی از مارکرهای مثبت و منفی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انتخاب شد. آنالیز فلوسیتومتری در روز پانزدهم انجام شد و نتایج نشان داد سلول‌ها برای مارکرهای رده‌ی مزانشیمی شامل CD73 (97% ± 5), CD90 (95± 5) CD105 (92%± 6) مثبت و برای مارکرهای رده‌ی خونی واندوتلیالی شامل CD31 (3% ± 1) CD34 (5% ±1), CD45 (1%±1) منفی

www.SID.ir

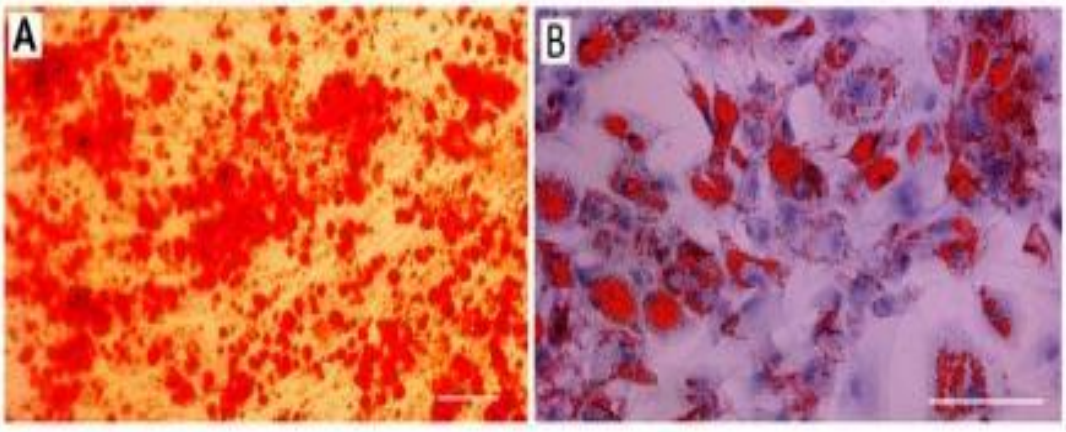
Archive of SID

بودند (شکل ۳). این نتایج با مارکرهای سلول‌های جدا شده از روی فایکل در همان نمونه کاملا مشابه بود.



شکل ۱: مرفولوژی سلول ها جدا شده از لایه‌ی زیر فایکل

(A) کلنی چند سلولی ۲۴ ساعت بعد از کشت (B) مرفولوژی دوکی شکل سلول‌ها در پاساژ دوم (C) مرفولوژی سلول‌ها در پاساژ ۷ کاملا پهن شده، تکثیر آن‌ها متوقف می‌شود. خط روشن مقیاس ۱۰۰ میکرون را نشان می‌دهد.



شکل ۲: سلول‌های جدا شده از لایه‌ی زیر فایکل قدرت تمایز بالایی دارند.

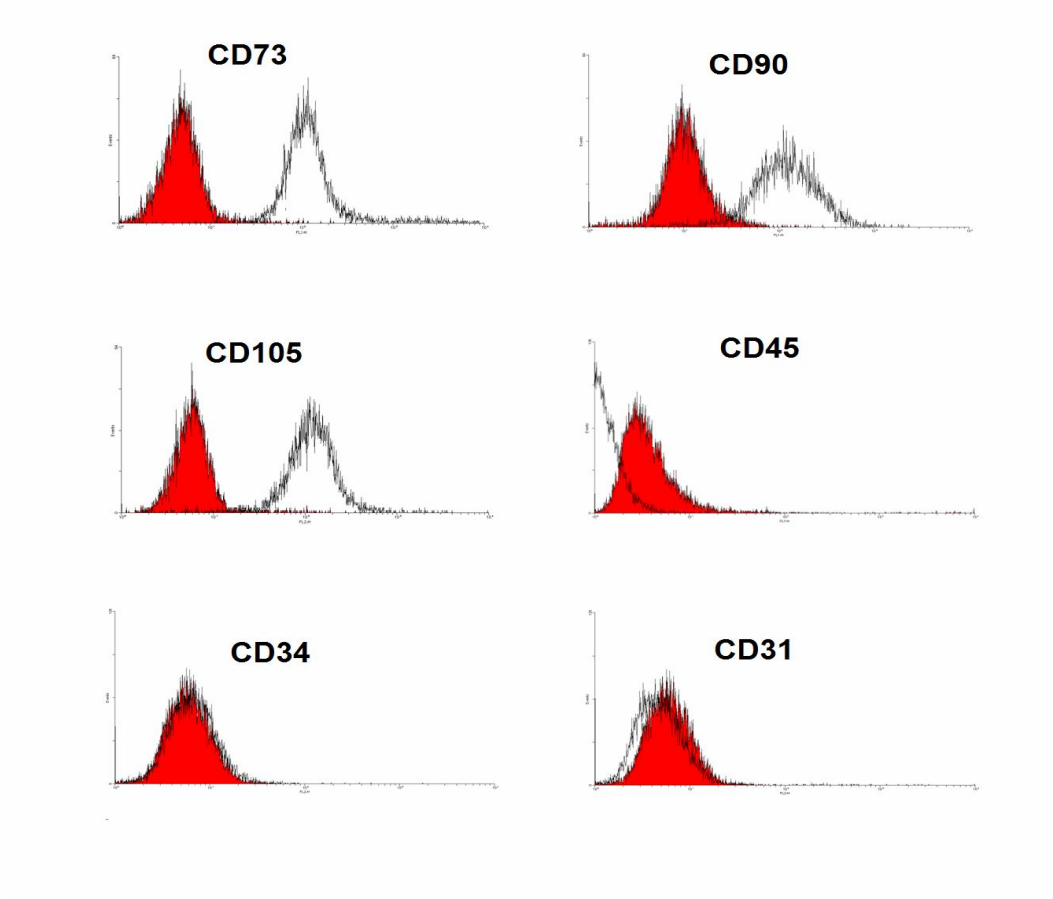
شکل (A) رسوب کلسیم رنگ شده با رنگ آلیزارین قرمز را نشان می‌دهد که نشان دهنده‌ی تمایز به رده‌ی استخوانی است.

شکل (B) گرانول‌های چربی رنگ شده با رنگ Oil Red را نشان می‌دهد که حاکی از تمایز به سلول‌های چربی است.

(مقیاس: ۱۰۰ میکرون)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: مارکرهای سطحی سلول‌های جدا شده از لایه‌ی زیر فایکل
سلول‌ها در روز ۱۵ بعد از جداسازی برای مارکرهایی CD73, CD90,CD105 مثبت و برای مارکرهایی CD45,CD34, CD31 منفی هستند. گراف رنگی نشان دهنده‌ی ایزوتیپ است.

بحث

نتایج مطالعه نشان داد که از لایه‌ی RBC زیر فایکل مقدار زیادی MSC جدا می‌شود که خصوصیات آن‌ها از نظر کینتیک رشد، مارکرهای سطحی و پتانسیل تمایزی کاملا مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان می‌باشد. اگرچه بازده شیب چگالی فایکل برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای مانند لنفوسیت ومنوسیت مورد ارزیابی قرار گرفته است، اما بازده این روش برای جداسازی MSC مورد بررسی دقیق قرار نگرفته است. اساس جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با روش فایکل براین فرضیه استوار است که این سلول‌ها در نمونه‌ی مغز استخوان به‌صورت تک هسته‌ای وسینگل وجود دارند. در مطالعه‌ی حاضر، کلنی‌های چند سلولی ۲۴ ساعت بعد از کشت MSC دیده شد. از آنجایی‌که این تعداد سلول نمی‌تواند حاصل از تکثیر یک عددMSC باشد، بنابراین می‌توان گفت این سلول‌ها احتمالا به‌صورت مجتمع و در قالب کلمپ هستند. مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ توسط هورن انجام گرفت نشان داد که تعداد سلول‌های MSC حاصل از روش لیز RBC نسبت به تعداد سلول به دست آمده از روش فایکل بیشتر است. آن‌ها نیز کلنی‌های بزرگ سلولی را مشاهده کردند ولی

www.SID.ir

Archive of SID

علت بزرگی آن کلنی‌ها را فاکتورهای رشد ترشح شده از پلاکت‌ها معرفی کردند (۱۰). در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۱ انجام شد، پیشنهاد شد که روش لیز نسبت به روش فایکل روش مناسب‌تری برای جداسازی این سلول‌ها می‌باشد (۱۱). در مطالعه‌ی دیگری مشخص شد MSC به‌دست آمده از کشت مستقیم نمونه‌ی مغز استخوان بیشتر از MSC به‌دست آمده از روش فایکل است (۱۲). این دو مطالعه نیز می‌توانند شاهدی بر ماهیت مجتمع بودن این سلول‌ها باشند. شاهد دیگر بر این مدعا مطالعات جین و بلازسک می‌باشد. آن‌ها نشان دادند که کلمپ‌های سلولی باقیمانده پشت فیلتر بعد از فیلتر کردن نمونه‌ی مغز استخوان حاوی مقادیر زیادی از MSC هستند. آن‌ها از این کلمپ‌ها به‌ترتیب به‌عنوان دبری‌های مغز استخوان و یا هماتون‌ها نام بردند (۱۳–۱۵). اینساسکی نیز نشان داد که از چربی پلاسمای روی فایکل، MSC جدا می‌شود که این نشان دهنده‌ی آن است که این سلول‌ها نه تنها در زیر فایکل بلکه در پلاسمای روی فایکل نیز باقی مانده و حذف می‌شوند (۱۶).

نتیجه‌گیری

با توجه به‌نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت که حداقل قسمتی از v نمونه‌ی مغز استخوان در قالب کلمپ و به‌صورت مجتمع وجود دارند در نتیجه روش مرسوم فایکل نمی‌تواند تمامی MSC را جدا سازی کند واز طرفی شاید فیلتری با قطر مناسب بتواند روش موثرتری در جداسازی این سلول‌ها باشد که باید در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

References

1- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005; 7: 393-5.

2- Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12: 126-31.

3- Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev*. 2007; 3: 239-48.

4- Prockop DJ, Olson SD. Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood*. 2007; 109: 3147-51.

5- Ahmadbeigi N, Seyedjafari E, Gheisari Y, Atashi A, Omidkhoda A, Soleimani M. Surface expression of CXCR4 in unrestricted somatic stem cells and its regulation by growth factors. *Cell Biol Int*. 2010; 34: 687-92.

6- Ahmadbeigi N, Soleimani M, Gheisari Y, et al. Dormant phase and multinuclear cells: two key phenomena in early culture of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2011; 20: 1337-47.

7- Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, et al. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2004; 6: 372-9.

8- Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord

www.SID.ir

Archive of SID

P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs.* 2002; 170 (2-3): 73-82.

9- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* 2001; 98: 2615-25.

10- Horn P, Bork S, Diehlmann A, et al. Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell lysis. *Cytotherapy.* 2008; 10: 676-85.

11- Horn P, Bork S, Wagner W. Standardized isolation of human mesenchymal stromal cells with red blood cell lysis. *Methods Mol Biol.* 2011; 698: 23-35.

12- Kasten P, Beyen I, Egermann M, et al. Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro. *Eur Cell Mater.* 2008; 16: 47-55.

13- Jin JD, Wang HX, Xiao FJ, et al. A novel rich source of human mesenchymal stem cells from the debris of bone marrow samples. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 376: 191-5.

14- Blazsek I, Misset JL, Comisso M, Mathe G. Hematon: a multicellular functional unit in primary hematopoiesis. *Biomed Pharmacother.* 1988; 42: 661-8.

15- Blazsek I, Misset JL, Benavides M, Comisso M, Ribaud P, Mathe G. Hematon, a multicellular functional unit in normal human bone marrow: structural organization, hemopoietic activity, and its relationship to myelodysplasia and myeloid leukemias. *Exp Hematol.* 1990; 18: 259-65.

16- Insausti CL, Blanquer MB, Olmo LM, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the fat layer on the density gradient separated bone marrow. *Stem Cells Dev.* 2011 In press.

www.SID.ir

Archive of SID

The Efficiency of Density Gradient for Separation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow Sample

Ahmadbeigi N[1], Soleimani M[2], Mortazavi Y[3]

[1]Dept. of Hematology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[2]Dept. of Hematology Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[3]Dept. of pathology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Corresponding Author: Soleimani M, Dept. of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

E-mail: soleim_m@modares.ac.ir

Received: 20 Jun 2011 **Accepted:** 12 Sep 2011

Background and Objective: Nowadays, mesenchymal stem cells (MSCs) are considered as a promising tool for treatment of different diseases. Due to the low frequency of MSCs, however, it seems inevitable to expand them *in vitro* prior to use, which could affect the quality of the cells. In all isolation procedures, the density gradient separation of Ficoll is used for volume reduction and RBC exclusion. In this study, the efficiency of Ficoll density gradient was evaluated.

Materials and Methods: Human bone marrow samples were laid over Ficoll. Following centrifugation, the upper fraction containing the mononuclear cell layer and the lower fraction (RBC layer) were used for *in vitro* culture. The number and characteristics of MSCs in both layers were then compared with each other.

Results: Inspection of the cultured cells showed that the lower fraction contained MSC-like cells. These cells had spindle–like appearances and exhibited a high capacity for expansion. Furthermore, they showed a potential for differentiating into adipocyte and osteocyte differentiation. Cytofluorometric analysis showed that these cells were positive for CD73, CD90, and CD105, and negative for CD45, CD34, and CD31. It was also found that this fraction contained 58 ± 22% of the total isolated MSCs.

Conclusion: Density gradient is not a very efficient method for separation of MSCs because it leads to sedimentation of most of the cells to the lower compartment during centrifugation, which results in their exclusion. Therefore, there is a need for developing new methods to obtain larger amounts of MSCs from bone marrow.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Cell separation, Density gradient

www.SID.ir