خون
دوره ۵ شماره ۱ بهار ۸۷ (۳۷-۲۵)

# کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی: استفاده از پلاسمای تهیه شده از خون محیطی به عنوان مکمل محیط کشت

دکتر محمدرضا باغبان اسلامی نژاد[۱]، لیلا روحی[۲]، دکتر سید محمود عرب نجفی[۳]، دکتر حسین بهاروند[۴]

## چکیده

### سابقه و هدف

در دستورالعمل‌های رایج جداسازی و تکثیر سلول بنیادی مزانشیمی، استفاده از سرم جنینی گاو(FCS) به عنوان مکمل محیط کشت، اجتناب ناپذیر است. این در حالی است که سرم جنینی گاو در انسان ایمونوژنیک بوده و به هنگام پیوند خطر انتقال عفونت را با خود به همراه دارد. لذا به دنبال یک جانشین مناسب برای سرم جنینی گاو، در مطالعه حاضر، تاثیر پلاسمای تهیه شده از خون محیطی بر رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بررسی شده است.

### مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. سلول‌های مغز استخوان تهیه شده از استخوان‌های دراز موش صحرایی، از کشت اولیه تا پاساژ سوم با استفاده از محیط کشت حاوی FCS و پلاسمای تهیه شده از خون محیطی موش صحرایی کشت شدند و حاصل هر مرحله از کشت که در اصل به ترتیب سلول‌های پاساژ اول تا چهارم محسوب می‌شوند، از لحاظ میزان دو برابر شدگی جمعیت سلولی، توان زیستی و تکثیر سلولی به ترتیب با روش‌های شمارش سلولی، آزمایش MTT و رسم منحنی رشد اندازه‌گیری شد. سلول‌های حاصل از کشت اولیه از لحاظ کلون‌زایی نیز بررسی شدند. هر مطالعه ۱۰ بار تکرار شد و میانگین نتایج، مقایسه آماری شد. در پایان سلول‌های پاساژ سوم از لحاظ پتانسیل تمایز به استخوان و چربی با روش رنگ‌آمیزی اختصاصی RT-PCR بررسی شدند.

### یافته‌ها

سلول‌های کشت شده در پلاسما از لحاظ مورفولوژی، تقریباً یک دست دوکی شکل بودند در حالی که در کشت سلول‌های گروه FCS ، تعدادی سلول غیر دوکی شفاف نیز مشاهده شد. در مجموع، از لحاظ دو برابر شدگی جمعیت سلولی و آزمایش MTT ،سلول‌های گروه FCS به طور معنی‌داری وضعیت بهتری داشتند ولی تفاوت‌ها در سلول‌های حاصل از پاساژ سوم از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. در منحنی رشد، در طول دوره کشت، طول و شیب فازهای نمودار در دو گروه مشابه بود ولی گروه FCS ، رشد بیشتری از خود نشان داد. سلول‌های گروه پلاسما تعداد بیشتری کلون تولید کردند ولی اندازه این کلون‌ها در مقایسه با سلول‌های گروه FCS کمتر بود. سلول‌های هر دو گروه به راحتی به دودمان‌های آدیپوژنیک و استئوژنیک تمایز یافتند. زیرا سلول‌ها به ترتیب با اویل‌رد و آلیزارین رد رنگ شدند و ژن‌های PPAR-gama ، PPAR-alpha و C/EBP-alpha برای چربی و استئوکلسین و استئوپونتین برای استخوان بیان شد.

### نتیجه گیری

روی هم رفته می‌توان گفت که پلاسما به عنوان جایگزین سرم گاو قادر است از تکثیر سلول بنیادی مزانشیمی حمایت کرده و توان زیستی آن را حفظ نماید، اگر چه این حمایت، در مقایسه با FCS تا حدودی کمتر است ولی در عوض جایگزین سالمی محسوب می‌شود.

**کلمات کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش، پلاسما، تکثیر سلولی

*تاریخ دریافت : ۸۶/ ۵/۳۱*
*تاریخ پذیرش : ۸۷/ ۱/۳۱*

۱ـ مؤلف مسؤول: PhD علوم تشریح ـ استادیار پژوهشکده رویان ـ صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴
۲ـ دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی تکوینی ـ دانشگاه تهران
۳ـ PhD زیست‌شناسی تکوینی ـ دانشگاه تهران
۴ـ PhD زیست‌شناسی تکوینی ـ پژوهشکده رویان



Archive of SID
www.SID.ir

**مقدمه**

سلول‌های بنیادی مزانشیمی( Mesenchymal Stem Cells: MSCs) نوعی سلول بنیادی بزرگسال محسوب می‌شوند و با دو خاصیت پتانسیل خود تجدیدی برای مدت طولانی و توان تمایز به سلول‌های رده اسکلتی، شناخته می‌گردند. در واقع، این سلول‌ها، نوعی سلول غیر خون‌ساز ساکن در مغز استخوان بوده و برای اولین بار از این بافت جداسازی و توصیف شده‌اند(۱). علاوه بر مغز استخوان، سایر منابع حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در افراد بزرگسال شامل بافت پریوست، استخوان ترابکولار، بافت چربی، پرده سینویال، عضله اسکلتی، خون محیطی و دندان شیری است(۸-۲).

پتانسیل تمایز و نیز توان تکثیر برای مدت طولانی سبب شده است که سلول بنیادی مزانشیمی به یک منبع مناسب در استراتژی‌های ترمیم بافتی، سلول درمانی و مهندسی بافت تبدیل شود(۱۲-۹). تعداد بسیار اندک این سلول‌ها در بدن، تکثیر آن‌ها را پیش از مطالعات بالینی اجتناب ناپذیر کرده است. این در حالی است که همه دستورالعمل‌های رایج برای کشت آزمایشگاهی MSCs ، از سرم جنین گاوی (FCS) به عنوان مکمل تغذیه‌ای استفاده می‌کنند. مانع اصلی استفاده بالینی از MSCs ، به حضور FCS در محیط کشت مربوط می‌شود زیرا این مکمل محیط کشت ممکن است حامل بیماری‌های ویروسی و پریونی باشد(۱۴، ۱۳).

سرم محتوی پروتئین‌ها، پلی‌پپتیدها، هورمون‌ها، متابولیت‌ها، مواد غذایی و معدنی است. نگرانی عمده دیگری که در استفاده از FCS وجود دارد این است که پروتئین‌های آن که منشاء گاوی دارد به عنوان یک عامل خارجی بوده و سلولی که در محیط حاوی سرم کشت شده، می‌تواند برخی از این پروتئین ها را به بدن پیوند شونده منتقل نماید. اخیراً نشان داده شده که $10^8$ سلول MSCs رشد یافته تحت شرایط استاندارد در محیط حاوی FCS ، حدود ۳۰-۷ میلی‌گرم پروتئین FCS را حمل می‌کنند(۱۴ ، ۱۳).

اگر چه برخی مطالعات نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ایمونوژنیک نیستند، با این وجود زمانی که این سلول‌ها در محیط حاوی FCS تکثیر شوند، احتمال بروز پاسخ ایمنی در بدن میزبان افزایش می‌یابد(۱۶، ۱۵). البته این موضوع در مورد برخی سلول‌ها نشان داده شده است، به طوری که پیوند سلول‌های دندرتیک و لنفوسیت کشت شده در محیط حاوی FCS سبب بروز پاسخ ایمنی و واکنش آنافیلاکسی در میزبان شده است(۱۹-۱۷). دلیل آن این است که در زمان کشت سلول در FCS ، پروتئین‌های موجود در سرم وارد سلول شده، به همراه آن به بدن میزبان منتقل می‌شود(۱۸، ۱۳).

اخیراً دانشمندان سعی کرده‌اند که کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در محیط حاوی جانشین‌های FCS از قبیل سرم تهیه شده از خون محیطی انجام دهند و این روش تا حدودی موفقیت‌آمیز بوده است(۲۵-۲۰). فاکتور دیگری که می‌تواند به عنوان جانشین سرم مورد استفاده قرار گیرد، پلاسما می‌باشد که از نظر اجزای تشکیل‌دهنده همانند سرم حاوی پروتئین‌ها، هورمون‌ها، مواد غذایی، متابولیت‌ها و مواد معدنی است. هم چنین پلاسما حاوی پلاکت‌هاست که منبعی از فاکتورهای رشد موثر در تکثیر و تمایز سلولی می‌باشند و مطالعات پیشین نشان داده است که این پلاکت‌ها تاثیر مثبتی در کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارند(۲۸-۲۶). ولی واقع امر این است که مطالعات در ارتباط با تاثیر پلاسما بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بسیار اندک است. در این ارتباط شکرون و همکاران در سال ۲۰۰۴ از پلاسمای تهیه شده از مغز استخوان استفاده کردند و نشان دادند که این مکمل محیط کشت قادر است تعداد کلون‌های آلکالین فسفاتاز مثبت(سلول‌های پروژنیتور استخوانی) را افزایش دهد(۲۹).

موضوع مطالعه حاضر نیز بررسی امکان رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از پلاسما به جای FCS است. در مطالعه حاضر از پلاسمای تهیه شده از خون محیطی استفاده شده است و هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر پلاسما بر رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در کشت طولانی مدت، با استفاده از شاخص‌های متعدد از قبیل آزمایش MTT ، سنجش توان کلون‌زایی و مقایسه قطر کلون‌ها، محاسبه



Archive of SID
www.SID.ir

تعداد دو برابر شدگی جمعیت سلولی در طول دوره کشت و رسم منحنی رشد بوده است. در این مطالعه تاثیرات پلاسما با FCS مقایسه شده است. هم چنین پتانسیل تمایز سلول‌های تکثیر شده با پلاسما نیز بررسی شده است.

## مواد و روش ها

در مطالعه تجربی حاضر، تعداد ۱۰ سر موش صحرایی، نژاد Wistar ، با سن تقریبی ۱۰-۸ هفته که به طور روتین طبق برنامه حیوان‌خانه تغذیه می‌شدند، استفاده شد. موش‌ها با استفاده از کلروفرم بیهوش شدند، استخوان‌های فمور و تیبیا جدا گردید و بافت هم‌بند اطراف آن‌ها پاک شد و داخل محیط DMEM (Dulbecco Modified Eagles Medium) حاوی ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین (آلمانی، جیبکو) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین (آلمانی، جیبکو) قرار گرفت و به داخل هود استریل منتقل گردید. دو انتهای استخوان‌ها قطع گردید و با استفاده از سر سوزن ۲۲، مغز استخوان به داخل لوله ۱۳ میلی‌لیتری محتوی محیط DMEM حاوی FCS و آنتی‌بیوتیک Flush شد. سلول‌های مغز استخوان، پس از یک بار سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه، شمارش شده و به شش قسمت مساوی تقسیم گردید و در ظروف شش چاهکی کشت شد. بدین صورت که سه چاهک، محیط حاوی سرم جنینی گاو(FCS) و سه چاهک دیگر، محیط محتوی پلاسمای رت دریافت کرد. برای هر موش کشت جداگانه‌ای با تکرار مراحل فوق ترتیب داده شد.

۴۸ ساعت پس از آغاز کشت، سلول‌های غیر چسبیده با انجام تعویض محیط و شستشو با $PBS^{+}$ دور ریخته شد و پس از آن محیط سلول‌ها، ۴ روز یک بار تعویض شد. ۱۰ روز پس از آغاز کشت، ۹۰-۸۰ درصد کف ظرف کشت پر از سلول شد که در این زمان،اولین پاساژ سلولی انجام گرفت. بدین ترتیب که سلول‌ها تریپسینه شدند و مورد شمارش قرار گرفتند. از کل سلول‌ها، $10^{6}$ سلول از هر گروه به منظور بررسی برخی شاخص‌های رشد از قبیل توان کلون‌زایی، محاسبه تعداد دو برابر شدگی جمعیت سلولی، بررسی توان زیستی با روش MTT و ترسیم منحنی رشد استفاده شد و بقیه سلول‌ها در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت شدند(پاساژ اول). کشت سلولی تا پاساژ سوم ادامه یافت و حاصل هر مرحله از کشت که در اصل به ترتیب سلول‌های پاساژ اول تا چهارم محسوب می‌شوند، از لحاظ شاخص‌های رشد یاد شده بررسی شدند.

*تهیه پلاسما از خون محیطی رت:*

پس از این که رت‌ها توسط کلروفرم بیهوش شدند، قفسه سینه آن‌ها باز شد و با استفاده از سرنگ ۲۰ میلی‌لیتر، کل خون محیطی آن‌ها از داخل قلب آسپیره شد. به ازای هر میلی‌لیتر خون محیطی یک واحد هپارین به خون اضافه شد. خون به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد و مایع رویی(پلاسما) جدا گردید و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۷۰۰ سانتریفوژ شد. پلاسمای حاصل در دمای ۲۰- منجمد شد. در هنگام استفاده، پس از ذوب کردن پلاسماهای تهیه شده، برای جلوگیری از تشکیل ژل (ایجاد لخته) در محیط کشت، ۱ واحد هپارین در میلی‌لیتر به محیط کشت اضافه شد.

*آزمایش کلون‌زایی:*

بدین منظور ۱۰۰ سلول از کشت اولیه در دیش ۶۰ میلی‌متر مربع در دو محیط حاوی FCS و پلاسما به مدت ۱۴ روز کشت شدند. در پایان کشت، سلول‌ها دو بار با محلول PBS شسته شده و با رنگ کریستال ویولت به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی گردیدند. کلون‌های تشکیل شده در دو گروه FCS و پلاسمای رتی، در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید و مورد شمارش قرار گرفت. این کار برای ۱۰ موش به طور جداگانه انجام شد و میانگین تعداد کلون برای سلول‌های دو گروه پلاسمای رتی و FCS محاسبه شده و با آزمون آماری t-test مقایسه گردید. هم چنین قطر کلون‌ها نیز در دو گروه بر حسب میکرومتر اندازه‌گیری شده و مقایسه گردید، بدین ترتیب که در هر نمونه از هر گروه، ۲۰ کلونی به طور تصادفی انتخاب شده و اندازه‌گیری شد.

*محاسبه تعداد دو برابر شدگی جمعیت سلولی( (PDN) population Doubling Number):*

برای محاسبه PDN ، $10^{4} \times 5$ سلول حاصل از کشت



Archive of SID
www.SID.ir

اولیه تا پاساژ سوم که در اصل به ترتیب سلول‌های پاساژ اول تا چهارم محسوب می‌شوند، در داخل پلیت ۱۲ خانه‌ای کشت شدند. هر چند وقت یک بار کشت سلول در زیر میکروسکوپ کنترل گردید تا با confluence شدن (زمانی که تمام سطح کشت پوشیده از سلول می‌شود) کشت، شمارش سلولی انجام شود. در مطالعه حاضر سلول‌های گروه FCS زودتر به مرحله confluency رسیدند(در طی ۱۵ روز). در این زمان کشت هر دو سلول(سلول‌های گروه FCS و پلاسما) تریپسینه شدند و مورد شمارش قرار گرفتند. کشت confluenced در پلیت ۱۲ خانه‌ای حدود $۳/۲ \times ۱۰^{۵}$ سلول داشت. میزان دو برابر شدگی جمعیت سلولی از فرمول $۳/۳۱ \times \log (N_1 \times N_0)$ تعیین شد(۱۲). در این فرمول، $N_1$ برابر است با تعداد سلول در پایان کشت و $N_0$ برابر است با تعداد سلول‌ها در آغاز کشت. PDN کل به صورت مجموع PDN های کشت اولیه، پاساژ اول، دوم و سوم در نظر گرفته شد. این بررسی در ۱۰ موش به طور جداگانه انجام گرفت و میانگین PDN کل دو گروه PBDS و FCS با آزمون t-test مقایسه شد.

*آزمایش MTT (Methyl Tetrazolium) :*

این آزمایش به منظور ارزیابی توان زیستی سلول‌های دو گروه استفاده شد. اساس این آزمون بر تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان در اثر عملکرد سیستم سوکسینات ـ تترازولیوم رودکتاز متعلق به زنجیره تنفسی میتوکندریایی، بر روی نمک‌های تترازولیوم MTT استوار است. در این روش ابتدا یک منحنی استاندارد رسم شد تا رابطه بین سیگنال بهینه(OD در طول موج ۵۴۰-۶۳۰ نانومتر) و تعداد سلول‌ها یافت شود($R^2$ = ۰/۹۴۶۶) که در یک محدوده $۸ \times ۱۰^{۴}$ تا $۱۰^{۴}$ سلول / چاهک قرار داشت. برای انجام آزمایش مورد نظر از $۱۰^{۴}$ سلول در هر چاهک استفاده شد. برای انجام آزمایش MTT ، $۱۰^{۴}$ سلول به ظروف ۹۶ چاهکی محتوی ۱۰۰ µl محیط حاوی ۱۵٪ FCS یا ۱۵٪ پلاسمای رتی اضافه شد و به مدت ۶ روز در شرایط ۳۷°C و ۵٪ $CO_2$ انکوبه شد. در تمام این مدت به طور روزانه( روز صفر، اول، دوم، سوم، چهارم، پنجم و ششم) در هفت نوبت، از لحاظ آزمایش MTT ارزیابی شد، بدین ترتیب که در هر مرحله ذکر شده، به هر چاهک ۲۰ µl محلول زرد رنگ MTT (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)(آلمانی، سیگما) اضافه گردید و کشت به مدت ۲-۱ ساعت در ۳۷°C انکوبه شد. سپس محیط رویی سلول‌ها تخلیه شد و ۲۰۰ µl دی‌متیل سولفوکساید(آلمانی، مِرک) اضافه گردید تا کریستال‌های تشکیل شده حل شوند(دور از نور مستقیم). سپس جذب چاهک به وسیله دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. این آزمایش برای سلول‌های حاصل از هر مرحله از کشت(کشت اولیه، پاساژ اول، دوم و سوم) به طور جداگانه انجام شد و برای ۱۰ موش مورد استفاده تکرار گردید. برای مقایسه بهتر سلول‌های دو گروه PBDS و FCS ، میانگین جذب در روز ۶ هر مرحله کشت برای ۱۰ بار تکرار هر گروه محاسبه شد و با میانگین مشابه از گروه دیگر با آزمون T-test مقایسه گردید.

*منحنی رشد:*

برای رسم منحنی رشد $۵ \times ۱۰^{۵}$ سلول حاصل از کشت اولیه و پاساژهای یک تا سه در ظروف شش چاهکی کشت شدند، به طور روزانه تا هفت روز سلول‌ها تریپسینه شده، تعداد آن‌ها توسط لام نئوبار شمارش و منحنی رشد آن‌ها ترسیم شد.

*تمایز به استخوان و چربی:*

برای اطمینان از ماهیت مزانشیمی سلول‌های مورد بررسی در این مطالعه از آزمایش تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. برای این منظور $۱۰^{۵}$ سلول از پاساژ سه در ظروف شش چاهکی در محیط FCS و ۱۵٪ پلاسمای رتی کشت شدند. برای تمایز به استخوان، به علت این که سلول‌ها در گروه پلاسما در پاساژ سه به طور خود به خود به سمت تمایز به چربی می‌روند، پس از ۲۴ ساعت محیط سلول‌ها با محیط تمایز به استخوان محتوی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسکوربیک اسید ۳- فسفات، ۱۰ نانو مولار دگزامتازون و ۱۰ میلی‌مولار بتا ـ گلیسرول فسفات(آمریکا ـ سیگما) تعویض شد و برای تمایز به چربی، پس از این که سلول‌ها کف ظرف را پر کردند، محیط سلول‌ها با محیط تمایز به چربی محتوی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک ۳- فسفات ، ۱۰۰ نانو مولار دگزامتازون و



Archive of SID
www.SID.ir

**جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در RT-PCR**

| Target cDNA | Primer Sequence (5'-3') | Size product | Annealing Temperature (C°) | PCR cycles |
|---|---|---|---|---|
| ALP | F: CGGACCCTGCCTTACCAACTCATTTGTGCC<br>R: CGCACGCGATGCAACACCACTCAGG | ۳۹۶ | ۷۲ | ۳۵ |
| Osteopontin | F: GATTATAGTGACACAGAC<br>R: AGCAGGAATACTAACTGC | ۲۸۷ | ۵۰ | ۳۵ |
| Osteocalcin | F: GTCCCAACAAGCAACTCG<br>R: CCAAAGCTGAAGCTGCCG | ۳۸۱ | ۵۶ | ۳۵ |
| C/EBP-alpha | F: ACGTGGAGACGCAGCAGAA<br>R: AGGCGGTCATTGTCACTGG | ۳۴۰ | ۶۱ | ۳۵ |
| PPAR-alpha | F: CCCTGCCTTCCCTGTGAACTGAC<br>R: GGGACTCATCTGTACTGGTGGGGAC | ۳۶۳ | ۷۰ | ۳۵ |
| PPAR-gama | F: GGTGAAACTCTGGGAGATCC<br>R: TGAGGGAGTTTGAAGACTCTTC | ۴۰۰ | ۵۷ | ۳۵ |
| GAPDH | F: TGCTGAGTATGTCGTGGAGTC<br>R: AAAGGTGGAAGAATGGGAG | ۳۸۰ | ۵۳ | ۳۵ |

۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین(آمریکا ـ سیگما) جایگزین شد. کشت تمایز به مدت سه هفته ادامه یافت و در پایان این مدت، وقوع تمایز با روش‌های هیستوشیمی و RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

*رنگ‌آمیزی آلیزارین رد:*

ابتدا لایه سلولی به وسیله PBS شسته شده و با متانول (آلمان ـ مِرک) به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شد، سپس با آلیزارین رد(یک درصد در آب آمونیاکی ۲۵ درصد)(آمریکا ـ سیگما) به مدت دو دقیقه رنگ شد و در ادامه سلول‌ها با آب مقطر شسته شدند.

*رنگ‌آمیزی اویل رد:*

سلول‌ها به مدت یک ساعت با فرمالین ۴٪ فیکس شدند و سپس با الکل ۷۰٪ شسته و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با رنگ اویل رد(۰/۵ درصد در ۹۹ درصد ایزوپروپانول)(آمریکا ـ سیگما) رنگ‌آمیزی شد. در انتها محلول رنگی خارج شد و سلول‌ها، سه بار با الکل ۷۰ درصد شسته شدند.

*آنالیز RT-PCR:*

سلول‌ها در روز ۲۱ از لحاظ بیان ژن‌های استخوانی نظیر استئوکلسین، استئوپونتین و آلکالین فسفاتاز(ALP) و ژن‌های چربی از قبیل PPAR-gama ، PPAR-alpha و C/EBP-alpha مورد بررسی قرار گرفتند(جدول ۱). برای این منظور RNA کل سلول‌های مورد نظر با استفاده از RNX-Plus (تهران ـ سیناژن) و مطابق با دستورالعمل این شرکت جداسازی شد. سپس cDNA تک زنجیره‌ای برای RT-PCR با استفاده از آغازگر oligo (dt) و آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس(First) Revert Aid Strand cDNA synthesis kit (فرمنتاز) تهیه شد. در ادامه واکنش PCR در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای آنیلینگ به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی و در ۳۵ سیکل انجام شد. در پایان محصول PCR درون چاهک‌های ژل ۱/۷ درصد آگاروز ریخته شده و پس از الکتروفورز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس ارزیابی شد.

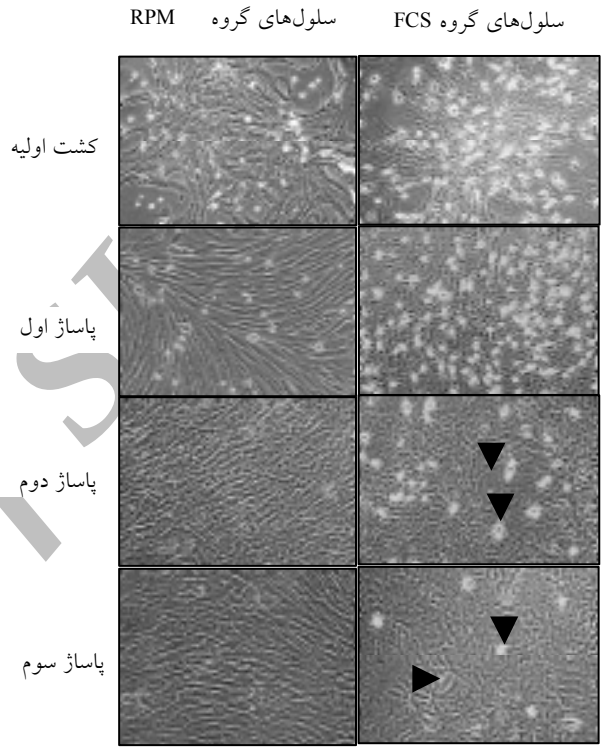
## یافته ها

در کشت اولیه هر دو گروه پلاسما و FCS کلون‌هایی تشکیل شد. بر روی کلون‌های گروه FCS تعداد زیادی سلول روشن مشاهده شد. سلول‌های کشت شده در گروه پلاسما در پاساژ دو، مورفولوژی کاملاً دوکی داشتند در حالی که در کشت سلول‌های گروه سرم هم چنان سلول‌های غیر دوکی روشن دیده می‌شد. کشت پاساژ دو و سه سلول‌های گروه پلاسما حاوی سلول‌های



Archive of SID
www.SID.ir

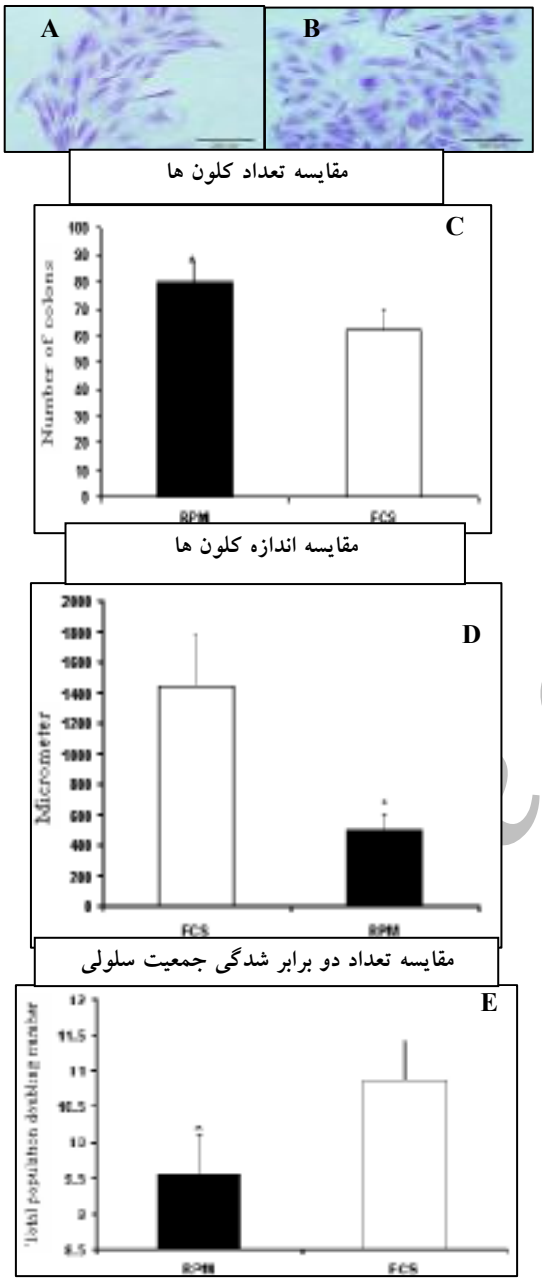
فیبروبلاستی بود در حالی که در کشت سلول‌های گروه FCS ، سلول‌های غیر مزانشیمی روشن و سلول‌های غیر دوکی(فلش) نیز به چشم می‌خورد(شکل ۱).




**شکل ۱: کشت اولیه و سه پاساژ متوالی سلول‌های کشت شده در پلاسما و FCS . کشت سلول‌های گروه پلاسما، از پاساژ دو عمدتاً حاوی سلول‌های دوکی شکل بود درحالی که کشت سلول‌های گروه FCS تعدادی سلول غیر دوکی(فلش) نیز داشت(بزرگ‌نمایی × ۴۰).**

تعداد کلون‌ها در نمونه‌های مختلف متفاوت بود، به طوری که در یکی از نمونه‌ها، تعداد کلون‌ها در دو گروه برابر بود در حالی که در بقیه نمونه‌ها تعداد کلون‌ها در گروه پلاسما، بیش از گروه FCS بود. در مجموع میانگین کلون‌ها در گروه پلاسما(۲/۲۷ ± ۷۹/۷) به طور معنی‌داری بیش از گروه FCS (۲/۲۰۲ ± ۶۱/۴) بود(شکل ۲ ، p< ۰/۰۵).

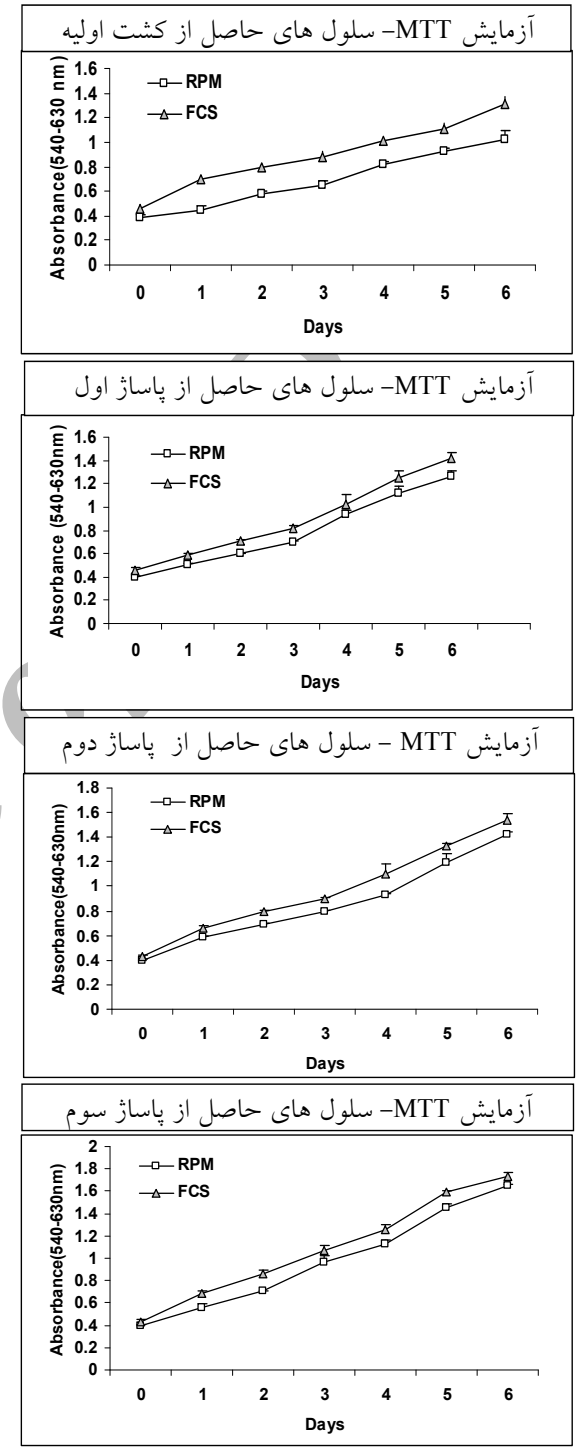
بر اساس نتایج به دست آمده، جمعیت سلول‌های کشت شده در پلاسما، در طول دوره کشت (کشت اولیه، پاساژ اول، دوم و سوم) به طور متوسط ۱/۷۱ ± ۹/۵۵۷۷



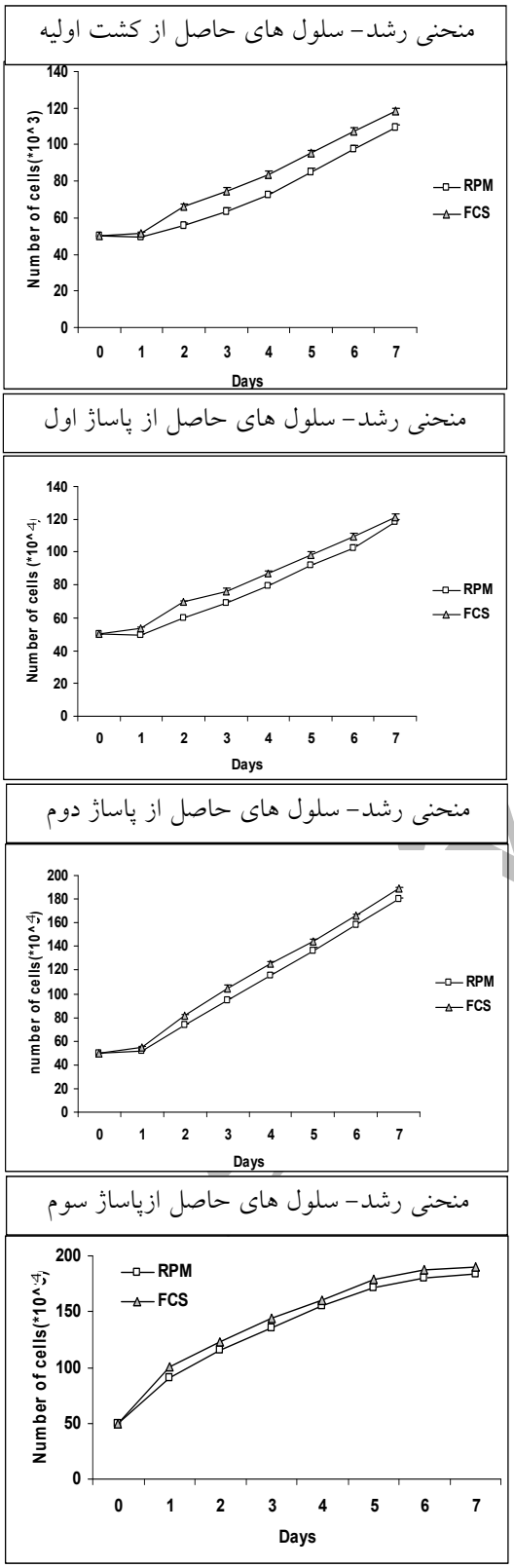

**شکل ۲: A) کلون سلول رنگ‌آمیزی شده با کریستال ویولت از گروه پلاسما B) کلون سلولی با همان رنگ‌آمیزی از گروه FCS C) میانگین تعداد کلون‌ها در دو گروه پلاسما(RPM) و سرم گاوی(FCS) D) میانگین قطر کلون در دو گروه E) میزان دو برابر شدگی جمعیت سلولی کل در دو گروه.**

بار دو برابر شده در حالی که در گروه FCS ، سلول‌ها ۲/۴۰ ± ۱۰/۸۷۲۳ بار دو برابر شدند و دو گروه از این نظر تفاوت آماری داشتند(p< ۰/۰۴)، (شکل ۲). لازم به ذکر است که بررسی میزان دو برابر شدن جمعیتی


www.SID.ir



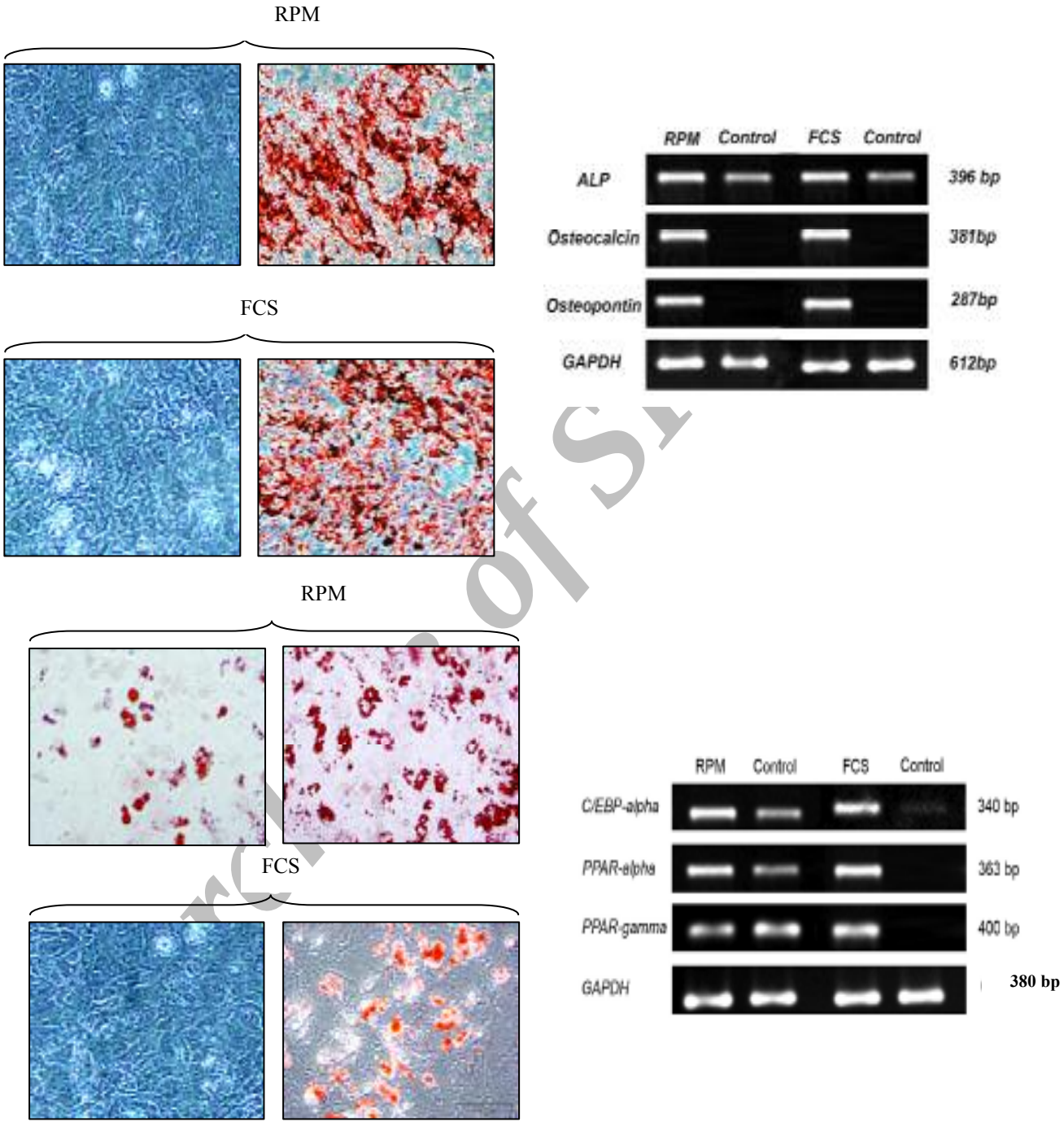

**شکل ۳: نمودارهای آزمایش MTT : در مجموع سلول‌های گروه پلاسما(RPM: Rat Plasma) در تمام مراحل کشت از لحاظ آماری میزان جذب پایین‌تری داشتند که این شاخص نشان می‌دهد که سلول‌های این گروه از توان زیستی پایین‌تری برخوردار بودند. تفاوت‌های بین دو گروه پلاسما و FCS به استثنای پاساژ سوم از لحاظ آماری معنی‌دار بود.**




**شکل ۴: منحنی رشد. میزان رشد سلول‌ها در گروه پلاسما(RPM) نسبت به گروه FCS در تمام طول دوره کشت کمتر بود.**



www.SID.ir




Adipogenesis

**شکل ۵: تمایز سلول‌های کشت شده در پلاسما(RPM) و FCS . سلول‌های هر دو گروه توانستند به استخوان و چربی تمایز یابند(ستون راست) که حاکی از ماهیت مزانشیمی ـ بنیادی آن‌ها بود. در کشت گروه پلاسما، سلول‌های کنترل تمایز آدیپوژنیک، به طور خود به خود به آدیپوسیت تمایز یافته‌اند(بزرگ‌نمایی × ۴۰)**



www.SID.ir

برای سلول‌های حاصل از هر مرحله از کشت به طور مجزا، نشان داد که تفاوت دو گروه از لحاظ PDN در همه پاساژها به استثنای سلول‌های حاصل از پاساژ سوم معنی‌دار است.

سلول‌های رشد یافته در گروه پلاسما، در تمام مراحل کشت و در تمام روزهای مورد بررسی، میزان جذب پایین‌تری در مقایسه با سلول‌های گروه FCS داشتند. این مساله در کشت اولیه و سه پاساژ متوالی مورد مطالعه کاملاً مشهود بود(شکل ۳). به طوری که میانگین جذب در روز شش کشت اولیه برای گروه پلاسما، ۰/۱ ± ۱/۰۲ در برابر ۰/۱۳ ± ۱/۳ برای FCS بود و این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار بود($p<0/001$). در پاساژ اول میزان جذب گروه پلاسما، ۰/۲ ± ۱/۲۶ در مقابل ۰/۱۸ ± ۱/۴۱ و پاساژ دوم ۱/۴۲ در مقابل ۰/۱۷ ± ۱/۵۳ بود و تمام این تفاوت‌ها معنی‌دار بود. نکته جالب این بود که در پاساژ سوم تفاوت میزان جذب دو گروه (پلاسما: ۱/۶۴ در مقابل FCS : ۱/۷۲) از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. این اختلاف در جذب می‌تواند به دلیل تفاوت در تعداد سلول زنده و یا به علت تفاوت در میزان عملکرد آنزیم‌های دخیل در این واکنش اتفاق بیافتد(شکل ۳).

بررسی رشد روزانه سلول‌های حاصل از کشت اولیه، پاساژ اول، دوم و سوم در طی ۷ روز، در ۱۰ نمونه نشان داد که میزان رشد سلول‌ها در گروه پلاسما، نسبت به FCS در تمام دوره کشت به طور معنی‌داری کمتر است($p<0/01$).

بر اساس منحنی رشد، سه فاز lag ، log و پلاتو در دو گروه از نظر طول و شیب مشابه بودند و نمودارها تقریباً در دو گروه به موازات یکدیگر، ولی با سرعت رشد پایین‌تر در گروه پلاسما نسبت به گروه FCS بودند(شکل ۴).

سلول‌های حاصل از پاساژ سوم از هر دو گروه که به مدت سه هفته در محیط استخوان‌ساز قرار گرفته بودند با رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد به رنگ قرمز در آمدند که ناشی از معدنی شدن ماتریکس ترشح شده از سلول‌ها بود. هم چنین بررسی‌های RT-PCR نشان داد که ژن‌های مارکر استخوان در سلول‌های تمایز یافته هر دو گروه به خوبی بیان شده که البته ژن ALP در گروه کنترل نیز مقداری بیان داشته بود(شکل ۵). هم چنین پس از سه هفته تمایز در محیط آدیپوژنیک، رنگ‌آمیزی اویل رد نشان داد که قطرات چربی در سیتوپلاسم سلول‌ها تجمع یافته و آنالیز RT-PCR حاکی از بیان ژن‌های شاخص چربی بود(شکل ۵). نکته جالب توجه این بود که در کشت گروه پلاسما، سلول‌های کنترل تمایز آدیپوژنیک، به طور خود به خود به آدیپوسیت تمایز یافته بودند، در صورتی که این نوع تمایز در سلول‌هایی که در FCS به عنوان کنترل کشت شده بودند، مشاهده نشد.

## بحث

در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی در محیط‌های حاوی پلاسمای تهیه شده از خون محیطی موش صحرایی و سرم جنینی گاو(FCS) کشت شد و رشد و تکثیر آن در چندین مرحله(کشت اولیه و سه پاساژ متوالی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ما که در نوع خود اولین گزارش می‌باشد، حاکی از آن بود که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط حاوی پلاسما دچار توقف رشد نمی‌شوند و توان زیستی خود را حفظ می‌نمایند. در مجموع این نتایج تاییدی بر این نکته است که کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون استفاده از FCS امکان‌پذیر بوده و از این روش می‌توان سلول‌های لازم برای پیوند را تکثیر نمود. نکته‌ای که در نتایج مطالعه حاضر مشهود بود این بود که اگر چه سلول‌های مزانشیمی گروه پلاسما از نظر دو برابر شدگی جمعیت سلولی و میزان جذب آزمایش MTT در کشت اولیه و پاساژ اول و دوم با تفاوت آماری معنی‌دار ضعیف‌تر از سلول‌های گروه FCS ظاهر شدند، ولی در پاساژ سوم این تفاوت‌ها به مقدار زیادی کاهش یافت، به طوری که آزمون‌های آماری حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار بین دو گروه سلولی بود. این یافته نشان می‌دهد که پلاسما اگر چه در مراحل اولیه کشت در مقایسه با سرم گاوی ضعیف عمل می‌کند ولی در مراحل بعدی تا حدودی این ضعف را می‌پوشاند. البته برای این پدیده توجیهی نداریم ولی این واقعیتی است که در مشاهدات ما وجود داشت.



Archive of SID
www.SID.ir

چندین گزارش نشان داده است که استفاده از پلاسمای غنی از پلاکت(PRP: Platlate-rich plasma) و پلاکت‌های لیز شده، رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در مقایسه با FCS به طور معنی‌داری بهبود می‌بخشد(۲۸-۲۶). این نکته بیانگر نقش اساسی پلاکت‌ها و فاکتورهای آزاد شده توسط آن‌ها بر رشد MSCs است. تاثیرات مثبت پلاسما در مطالعه حاضر را نیز می‌توان تا حد زیادی به محتویات پلاکتی آن نسبت داد و این که چرا پلاسما در مقایسه با FCS ضعیف‌تر عمل کرده شاید به این دلیل است که تاثیر پلاکت در پلاسما کم رنگ‌تر از سرم است. به عبارت دیگر بر خلاف پلاسما، در طی انعقاد خون در فرآیند تهیه سرم، فاکتورهای رشد پلاکتی از پلاکت‌ها به داخل سرم رها می‌شود و این فاکتور تاثیرات میتوژنی قوی دارد. یکی از محدودیت‌های طرح حاضر، تهیه پلاسمای اتولوگ به میزان کافی برای انجام کشت تا پاساژ سوم بود، با توجه به میزان کم خونی محیطی موش صحرایی، میزان پلاسمای تهیه شده برای انجام کشت سلول تا سه پاساژ متوالی کافی نبود. بنابراین برای عملی کردن مطالعه حاضر، پلاسماهای تهیه شده از خون محیطی چندین موش صحرایی با هم مخلوط شد(پلاسمای آلولوگ) و به عنوان مکمل محیط کشت استفاده گردید و چون سلول‌ها در پلاسمای آلولوگ قابلیت رشد و تکثیر داشتند پس می‌توان انتظار داشت که پلاسمای اتولوگ نیز بتواند شاخص‌های تکثیر سلول بنیادی مزانشیمی را بهبود بخشد.

با توجه به این که برای سلول بنیادی مزانشیمی شاخص منحصر به فرد شناخته نشده، استاندارد طلایی برای اثبات آن‌ها، نشان دادن پتانسیل تمایزی آن‌ها به رده‌های اسکلتی است(۹-۱). این موضوع در مقاله انجمن بین‌المللی سلول درمانی تصریح شده است(۳۰، ۲۹). در تحقیق حاضر نیز از روش تمایز برای ارزیابی ماهیت بنیادی ـ مزانشیمی سلول‌های مورد بررسی استفاده شد. وقوع تمایز در سلول‌های گروه پلاسما موید نکته دیگری نیز است و آن این که سلول‌های بنیادی مزانشیمی تکثیر یافته در محیط حاوی پلاسما، توان تمایزی خود را نیز حفظ می‌نمایند.

بر اساس نتایج ما، سلول‌های حاصل از پاساژ ۳ رشد یافته در پلاسما، در محیط تکثیری(بدون عوامل القای تمایز) و به طور خود به خود به سلول‌های رده آدیپوسیت تمایز یافتند. این پدیده در کشت سلول‌های گروه FCS اتفاق نیفتاد. وقوع تمایز خودبخودی در کشت سلول‌های گروه پلاسما نیاز به توجیه منطقی دارد. البته یک توجیه این است که می‌توان تصور کرد این امر شاید به دلیل وجود فاکتورهایی آدیپوژنیکی که در پلاسما وجود دارد ولی سرم فاقد آن‌ها است، اتفاق افتاده باشد.

یافته‌های ما حاکی از مورفولوژی بهتر سلول‌های گروه پلاسما بود. در کشت سلول‌های گروه FCS ، علاوه بر سلول‌های دوکی، تعدادی سلول با مورفولوژی پهن و چند ضلعی نیز مشاهده شد، در حالی که کشت سلول در گروه پلاسما، از این نظر هموژن‌تر بوده و اغلب سلول‌ها دوکی و کشیده‌تر بودند. باید توجه کرد که یکی از مشخصه‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مورفولوژی دوکی شکل آن‌ها است و تفاوت مورفولوژیکی بین دو گروه مورد مطالعه ما چنین القا می‌کند که کشت سلولی در گروه پلاسما، از لحاظ حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی خالص‌تر از گروه FCS بود.

با توجه به این که یکی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی توان کلون‌زایی آن‌هاست، در تحقیق حاضر، از سنجش کلونی استفاده شد و کلون‌زایی سلول‌ها در دو گروه بررسی گردید، ولی واقعیت امر این است که روش کلون‌زایی، سنجش قابل اعتماد و دقیقی برای بررسی رشد سلول مزانشیمی نیست زیرا در این روش سایز کلون‌ها که مستقیماً با تکثیر سلول در ارتباط است، مدنظر قرار نمی‌گیرد. بنابراین در این مطالعه، کلون‌های تولید شده توسط سلول‌های دو گروه از نظر سایز نیز مقایسه شد و بر اساس نتایج حاصل، با وجودی که تعداد کلون‌ها در گروه پلاسما بیش از گروه FCS بود، اندازه آن ها(به عبارتی تعداد سلول آن‌ها) در گروه سرم بیش از گروه پلاسما بود.

## نتیجه‌گیری

روی هم رفته، آزمایش‌های ما نشان داد که جایگزینی



Archive of SID
www.SID.ir

FCS به وسیله پلاسما در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی می‌تواند باعث حفظ پتانسیل تکثیری و تمایزی سلول‌ها شود، اگر چه پلاسما به اندازه سرم گاوی از رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی حمایت نکرد ولی به دلیل سالم‌تر بودن پلاسما، این مدل کشت می‌تواند به عنوان یک روش ایمن جهت تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی تلقی شود.

## References :


1- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1991; 9:644-50.
2- Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reiholz GG, Conover CA, *et al*. Combined effects of insulin-like growth factor 1 and transforming growth factor-beta 1 on periosteal mesenchymal stem cells during chondrogenesis in vitro. Osteoart Cart 2003; 11: 55-64.
3- Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation of human trabecular bone-derived cells. J Ortho Res 2002; 20: 1060-9.
4- Dragoo JL, Samini B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, *et al*. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. J Bone Joint Sur 2003; 85:740-7.
5- Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from infrapatellar fat pad of knee. Clin Ortho 2003;196-212.
6- Jankowsk RJ, Deasy BM, Huard J. Muscle-derived stem cells. Gene Therapy 2002; 9:642-7.
7- Miura M, Grothos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robery PG, *et al*. Stem cells from human exfoliated decidusus teeth. Proceed Nation Acad Sci USA 2003; 100:5807-12.
8- Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, *et al*. Mesenchyamal precursor cells in the blood of normal individuals. Artheritis Res 2000; 2:477-88.
9- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in difusion chamber. Cell Tissue Kinet 1987;20:263-72.
10- Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res 1988; 254:317-30.
11- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, *et al*. Muscle regenaration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 1998; 279:1528-30.
12- Eslaminejad MB, Nadri S, Hosseini RH. Expression of thy 1.2 surface antigen increases significantly during the murine mesenchymal stem cells cultivation period. Dev Growth Differ 2007; 49: 351-364
13- Spess JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, *et al*. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. Mol Ther 2004; 95: 747-56.
14- Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro Expansion of human mesenchymal stem cells: Chioce of serum is a Determinant of cell proliferation, gene experssion, and transcriptome stability. Stem Cells 2005;23;1357-66.
15- Angoulvant D, Clere A, Benchalal S, Galamburn C, Farre A, Bertrand Y, *et al*. Human mesenchymal stem cells suppress induction cytooxic response to allo antigens. Biorheology 2004; 41:469-76.
16- Deine SM, Cobbs C, Jennings M, Barthlomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissue following systemic infusion into nonhuman primates. Blood 2003; 101:2999-3001.
17- Mackensen A, Drager R, Schleser M, Mertelsmann R, Lindemann A. presence of IgE antibodies to bovine serum alomin in a patient developing anaphylacxis after vaccination with human pepticle-pulsed dendritic cells. Cancer Immunol Immunother 2000; 49:152-6.
18- Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf with arthus-like reaction in immunodeficiency virus-infected patients given syngenieic lymphocyte infusion. Blood 1997;89:776-9.
19- Tuschong L, Soenen SL, Blaese RM, Candotti F, Muul LM. Immuno response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. Hum Gene Ther 2002; 13:1605-10.
20- Hankey DP, Mccape RE, Doherty MJ, Nolan PC, Mc Alinden MG, Nelson J, *et al*. Enhancement of human osteoblast proliferation and phenotypic expression when cultured in human serum. Acta Orthop 2001; 72:395-403.
21- Koller MR, Maher RJ, Manchel I, Oxender M, Smith AK. Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum free medium. J Hematother 1998; 7:413-23.
22- Kunetsove SA, Mankani MH, Robey PG. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. Transplantation 2000; 70:1780-7.
23- Yamamoto N, Isobe M, Negishi A, Yoshimasu H, Shimokawa H, Ohya K, *et al*. Effect of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells. J Med Dent Sci 2003; 50:63-9.
24- Stute N, Holtz K, Bubenhein M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. Experimental Hematology 2004;32:1212-25.
25- Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, *et al*. Human bone marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical α-MEM medium. Eur J Hematol 2006;76:309-16.
26- Kocaoemer A, Kern S, Klter H. human AB serum and thrombin –activated platelet-richlasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of




Archive of SID
www.SID.ir

mesenchymal stem cells from adipose tissue. Stem Cells 2007; 25:1270-1280.
27- Doucet CH, Ermu I, Zhang Y,Llense JR, Begot L, Holy X, *et al*. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy application. J Cellul Physiol 2005;205:228-36.
28- Vogel JP, Szalay K, Geiger F, Kramer M, Richter W, Kasten P, *et al*. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells andretains differentiation capacity and vivo bone formation in calcium phosphate ceramic. Platelets 2006;17:462-9.
29- Schecroun N, Dellaye Ch. In vitro growth and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells supported by autologous plasma. Bone 2004; 35:517-524.
30- Dominci M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy 2006; 4: 315-7.

Archive of SID



www.SID.ir

# Culture of rat mesenchymal stem cell using peripheral blood-derived plasma as the culture medium supplement

***Baghaban Eslaminejad M.[1] (PhD), Rouhi L.[2](MS), Arab Najafi S.M.[2](PhD), Baharvand H.[1](PhD)***

*[1]Stem Cell Department, Royan Institute, Tehran, Iran*
*[2]Tehran University, Tehran, Iran*

## Abstract

***Background and Objectives***

In current protocol for isolation and expansion of mesenchymal stem cells (MSCs), the use of fetal calf serum (FCS) as a medium supplement is inevitable. FCS is immunogenic for human subjects and may transfer infection in the case of transplantation. In the search for an appropriate substitute for FCS, in the present study the effect of plasma prepared from peripheral blood on the growth of MSCs has been examined.

***Materials and Methods***

Marrow cells obtained from rat long bones were cultivated both in the mediums containing FCS and in those with plasma prepared from rat peripheral blood for the primary culture and the three consequent passages. The cells present in all four passages were evaluated at each culture stage for population doubling number, viability, and the rate of proliferation by cell count, MTT assay, and plotting growth curve, respectively. The cells from primary culture were also examined with respect to their clonogenic activity. All experiments were replicated 10 times and the average values for each group were statistically compared. Furthermore, passage 3 cells from each group were examined in terms of bone and adipogenic differentiation by specific staining as well as RT-PCR.

***Results***

The cultures from plasma group appeared morphologically more homogenous than those from FCS group. In general, the cells from FCS groups had a better status in terms of total population doubling number and MTT test but these differences were not significant in passage 3. Moreover, growth curve plotted for each group indicated that the proliferation of cells in the plasma group is somewhat slower than those in FCS groups. The culture of plasma groups showed more colon cells compared to FCS groups but the colons in the latter appeared larger than the former. The cells from both groups were readily differentiated into osteoblastic and adipogenic cells lineages; this was confirmed by alizarin red and oil red staining, the bone expression of osteopontin and osteocalcin, and the expression of PPAR-alfa, PPAR-gamma, and C/EBP-alpha for adipose cells.

***Conclusions***

Taken together, plasma as a substitute for FCS can support proliferation of MSCs and maintains their viability in vitro. Although this support was somehow less strong than FCS, plasma could still be considered a safe substitute for FCS.

***Key words:*** Mesenchymal stem cells, Plasma, Cell proliferation, Fetal bovine serum, Differentiation
*SJIBTO 2008; 5(1): 25-37*
*Received: 22 Aug 2007*
*Accepted:19 Apr 2008*

*Correspondence:* Baghaban Eslaminejad M.,PhD of Anatomy. Assistant professor of Royan Institute. P.O.Box:4644-19395, Tehran, Iran. Tel: (+9821)22307963; Fax : (+9821)22310406
E-mail: *bagesla@yahoo.com*



Archive of SID
www.SID.ir