مقاله پژوهشی



اثر سلولهای بنیادی خونساز انسانی بر تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به سلولهای استئوبلاست

راضیه فدائی'، ناصر امیریزاده'، مهین نیکوگفتار ظریف'، مهریار حبیبی رودکنار

چکیدہ

سابقه و هدف

ارتباط سلولهای بنیادی خونساز(HSCs) با سلولهای موجود در ریز محیط مغز استخوان(نیچ) به ویـژه سلولهای استئوبلاست، جهت حفظ فعالیتهای آنها بسیار ضروری می باشد. البته مـدارکی کـه بـه صـورت مستقیـم HSC ها را در توسعه نیچ دخیل کنند، اندک هستند ولی در صورت اثبات، روشن میشـود کـه چـرا نقصهای هماتوپوئتیک بسیاری با تغییر در ساختار استخوانی همراه بوده و لذا اهداف درمانی هماتوپوئتیـک و اهداف درمانی جدیدی را برای تنظیم ساختار و تشکیل استخوان فراهم می آورند.

مواد و روشها

در یک مطالعه تجربی، سلولهای بنیادی مزانشیمال(MSC) مغز استخوان را در محیط Stem Span به صدت ۳ روز تحت همکشتی با HSCهای خون بند ناف قرار دادیم. سپس MSCها با استفاده از کیت استئوژنزیس به استئوبلاست تمایز داده شدند و در روزهای مختلف تمایزی مورد ارزیابی قرار گرفتند که شامل بیان ژنهای استئوپونتین و استئوکلسین در روزهای ۴ و ۶ تمایزی(RT-PCR)، بیان مارکر CD90 (فلوسیتومتری)، بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز(رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز) و مینرالیزه شدن(رنگ آمیزی آلیزارین رد) در روز دهم تمایزی بود.

يافتهها

نتایج، بیان زود هنگام ژنهای استئوپونتین و استئوکلسین را در همکشتی MSC با HSC نمایان ساخت. این یافتهها از نقشHSC ها در القای تمایز استئوبلاستی MSCها حمایت مینمایند. هم چنین کاهش بیان CD90 و افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و مینرالیزاسیون سلولی، این نتایج را تایید نمودند. *نتیجه گیری*

نتایج این تحقیق در ارتباط با سلولهای بنیادی انسانی در ex vivo ، اثبات نمود کـه HSCهـا قادرنـد سـبب افزایش تمایز MSCها به استئوبلاست شده و بدین وسیله در تشکیل نیچ خود سهیم باشند. **کلمات کلیدی:** سلولهای بنیادی خونساز، سلولهای بنیادی مزانشیمی، همکشتی، استخوانسازی، استئوبلاستها

> تاریخ دریافت : ۹۰/۵/۱۱ تاریخ پذیرش : ۹۰/۱۰/۱۷

۳۔ PhD هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

۱۔ کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی اَموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

۲_ مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی و بانک خون _ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون _ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون _ تهران _ ایران _ صندوق پستی: ۱۱۵۷–۱۴۶۶۵

۴– PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران



مقدمه

شناخت هر چه بهتر بیولوژی سلولهای بنیادی، در استفاده از اثرات درمانی این سلولها برای گسترهای از بیماریهای ارثی و اکتسابی بسیار مؤثر میباشد. استفاده بهینه از سلولهای بنیادی به موارد متعددی از جمله شناسایی منابع غنی از سلولهای بنیادی، جداسازی و دستیابی به سلولهای مفیدتر برای پیوند و مطالعه در جهت کاهش معایب و افزایش مزایای این سلولها بستگی دارد. رسیدن به این هدف مستلزم استفاده از کشت، دستکاری ژنتیکی و روشهای مختلف نگهداری در محیط آزمایشگاه، شناسایی مارکرهای سطحی و سیتوپلاسمی، واکنشهای درون سلولی و مسیرهایی که این فعالیتها را

سلولهای بنیادی خونساز(HSCs) دارای هر دو قابلیت خود نوسازی و تمایز بوده و این فعالیتها نیز اغلب در نیچهای واقع در مغز استخوان صورت میگیرند. مطالعههای مورفولوژیک و in vitro حاکی از آن است که نیچهای HSCها، از مشارکت تعدادی از سلولهای استرومایی مغز استخوان(BMSCs) با عملکردهای مشابه و محدود، حاصل میگردد(۱۱–۱).

پیشرفت های قابل ملاحظ ای در تعیین نقش مولکول های چسبندگی و سایتوکاین های مشتق از نیچ در خود نوسازی سلول های بنیادی صورت گرفت است(۱۲). این موضوع که آیا HSCها خود بقا، حفظ و توسعه نیچ را تنظیم میکنند، هنوز به اثبات نرسیده است. در عین حال عقیده بر این است که ارتباط متقابل میان HSCها و نیچ، هر یک از فعالیت هایشان را تنظیم می نماید (۱۴، ۱۳).

در حال حاضر نقش کلیدی سلولهای استئوبلاست در برقراری و تشکیل نیچ سلولهای بنیادی خونساز، امری ثابت شده است(۱۲، ۵، ۱). استئوبلاستها رسپتورهای سلول _ سلول از جمله N-کادهرین، Jagged ، مولکولهای چسببندگی سلولی و اسکولار نوع ۱ (I-VCAM)، سایتوکاینهای سلولی و محلول و فاکتورهای رشد تنظیم کننده اعمال مختلف HSC را بیان مینمایند که هر یک از این فاکتورها نیز تحت تاثیر سیگنالهای مکانیکی، هورمونی(مانند هورمون پاراتیروئید) و موضعی(مانند

پروتئین مورفوژنیک استخوانی(BMP) و آنژیوپوئتین) قرار میگیرند. لازم به ذکر است که مسیرهای سیگنالینگ متعددی از جمله ، Hedgehog ، Notch ، BMP ، wnt و FEG ، در تعدیل فعالیت نیچ سلولهای بنیادی خونساز دخیل میباشند(۱۵).

وجود هماهنگی میان هزاران سیگنال دایمی از جمله سایتوکاین ها، فاکتورهای رشد، لیگاندها، مسیرهای مختلف سیگنالینگ و ... که در نیچ موجود می باشند، به ایجاد تعادلی ظریف میان خود نوسازی و تمایز در HSC ها منتهی می گردد.

با وجود این، مدارکی که به صورت مستقیم HSCها را در توسعه نیچ دخیل کنند، بسیار اندک میباشند ولی در صورت اثبات این امر، روشن میشود که چرا نقصهای هماتوپوئتیک بسیاری با تغییرات در ساختار استخوانی همراه هستند و به دنبال آن، اهداف درمانی هماتوپوئتیک و نیز اهداف درمانی جدیدی را برای تنظیم ساختار و تشکیل استخوان فراهم میآورند. با توجه به قابلیت سلولهای بنیادی مزانشیمی در تمایز به سلولهای مختلف از جمله استؤوبلاست، به منظور روشن شدن این موضوع که آیا ASC ها قادر به تنظیم تشکیل نیچ خود میباشند یا خیر، می توان از کشت همزمان SHS همراه با پیش سازهای مزانشیمی بهره جست.

اطلاعات به دست آمده نشان می دهند که HSCها تحت شرایط پایه، دارای توانایی هدایت تماییز سلولهای بنیادی مزانشیمی به سمت استئوبلاستها میباشند که در این مسیر، BMP2 و BMP6 مشتق از HSCها، نقش بسیار مهمی را بر عهده دارند. مطالعه های قبلی انجام شده، همه از یک ارتباط متقابل میان استئوبلاست و HSC حکایت میکنند که به موجب آن، HSCها فعالیتهای حمایتی حمایتی خونسازی خود را از طریق استئوبلاستها القا مینمایند (۹۲). تا پیش از این ضروری بودن ارتباط متقابل میان BHSCها و استئوبلاستها القا مینمایند میلولی، در حد یک فرضیه بود تا این که یانگ هون جانگ میتوانند به طور مستقیم، تمایز سلولهای مزانشیمی را به میتوانند به طور مستقیم، تمایز سلولهای مزانشیمی را به سمت سلولهای استئوبلاست هدایت نمایند(۱۷).

با توجه به ایس که مطالعههای مذکور فقط بر روی HSC موشی در ovivo و in vitro صورت پذیرفته است، در این مطالعه بر آن شدیم تا جهت بررسی شکل گیری نیچ استئوبلاستی تحت تأثیر فعالیت HSCهای انسانی، به تحقیق بپردازیم و به این منظور از HSCهای نمونههای خون بند ناف(به دلیل مزایای بسیار این منبع نسبت به سایر منابع) استفاده کردیم تا در صورت تایید ایس تاثیر، به اهداف درمانی جدیدی در این موضوع نایل آییم.

مواد و روشها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. محیط DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium)، کیت آلکالن فسفاتاز و کیت آلیزارین رد از شرکت سیگما، کیت ساخت cDNA از شرکت بیونیر، کیت استئوژنزیس از شرکت کمیکون، کیت PCR از شرکت تاکارا بیوتکنولوژی دالیان و کیت جداسازی سلولهای ⁺CD34 از شرکت بیوتک نوریداری شد. تریپسین، سرم حیوانی(FBS) از شرکت اینویتروژن، آنتیبادیهای مورد نیاز برای فلوسیتومتری از شرکتهای داکو و بیوساینس و آنتیبیوتیکها از شرکت

جداسازی و کشت سلول های MSCs مغز استخوان:

در مطالعه حاضر ۳ نمونه مغز استخوان از افراد اهداکننده سالم(با میانگین حجمی ۱۰ میلیلیتر و با اخذ رضایتنامه از والدین اهداکنندگان مذکور که جهت اهدای مغز استخوان به بیمارستان شریعتی مراجعه کرده بودند) با ضد انعقاد هپارین تهیه گردید.

به طور خلاصه سلولهای تک هستهای با استفاده از گرادیانت غلظت جدا شدند و در فلاسک کشت ۲۵ cm² حاوی ۶ میلی لیتر محیط کشت MEM ، FBS ،۱۰٪ و آنتی بیوتیکهای استر پتومایسین و پنی سیلین کشت داده شدند. ۴۸ ساعت پس از آغاز کشت، سلولهای غیر چسبیده با تعویض محیط حذف شدند و به مدت ۱۴ روز، هر ۳ روز یک بار محیط کشت عوض شد. بعد از این مدت سلولهای مزانشیمی تکثیر یافته و ۸۰٪ کف فلاسک را پوشاندند. در این زمان، سلولها پاساژ داده شد و به فلاسکهای جدید منتقل گردیدند.

راضیه فدایی و همکاران

آناليز فلوسيتومتري:

PBS بالولهای تریپسینه شده در ۱ میلی لیت محلول PBS میکرولیت (Phosphate Buffered Saline) سوسپانسیون شدند. ۵۰ میکرولیت از سلولها با ۵ میکرولیت راز آنتی بادی های CD166 و CD165 و CD165 و CD44 و PBS کنژوگه با آنتی بادی های CD45 ، CD34 ، CD90 و CD45 کنژوگه با آنتی بادی های CD45 ، CD34 ، CD90 و CD45 کنژوگه با فلور سئین ایزو تیو سیانات (FITC) و برای کنت رل منفی با آنتی بادی های PE-IgG1 و FITC-IgG1 مخلوط شدند و به انتی گراد و تاریکی انکو به شدند. در مرحله بعد سلول ها با ۲٪ PBS-BSA شدند و در ۵۰۰ میلی لیت و RBS-BSA شدند و در ۵۰۰ میلی لیت و RG5 سوسپانسیون شدند و در ۵۰۰ میلی لیت و RG5 سوسپانسیون شدند و در ۵۰۰ میلی لیت و RG5 سوسپانسیون شدند و در آنتها به منظور فیکس شدن سلول ها، ۵۰ شدند و در آنتها به منظور فیکس شدن سلول ها، ۵۰ میکرولیت پارافرمالدئید ۱٪ به لوله ها اضافه و با دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل شدند.

جداسازی سلولهای ⁺CD34 از خون بند ناف:

در این مطالعه پس از اخــذ رضـایتنامـه از والـدین، ۳ نمونیه خون بند نیاف بیا مییانگین حجمیی ۸۰ میلی لیتر بلافاصله بعد از زایمان، درست قبل از بسته شدن بند ناف و در شرایط کاملا استریل، در کیسه های مخصوص خون بند ناف حاوی ماده ضد انعقاد و نگهدارنده CPDA-1 جمع آوری شد. برای جداسازی سلول های تک هستهای از خون بند ناف، به دلیل وجود مقادیر بالای گلبول قرمـز در خون بند ناف با استفاده از روش های مناسب (از جمله افزودن هیدروکسی اتیل استارچ) گلبولهای قرمز را به حداقل رسانديم تا هم حجم نمونه جهت استفاده مناسب شده و هم کیفیت و کمیت سلول های بنیادی موجود در نمونه به حد قابل قبولی برسد. سپس سلولهای تک هستهای با استفاده از فایکول(با چگالی ۱/۰۷۷ g/mL) و روش گرادیانت شیب غلظت جداسازی گردیدند. جداسازى سلول هاى +CD34 مطابق دستور العمل MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) متعلق به شرکت میلتنی بیوتک صورت گرفت. برای انجام این کار از آنتی بادی های نشان دار شده با ذرات microbead بر علیه آنتی ژن CD34 استفاده شد و پس از آغشته شدن سلولها با آنتیبادی، از ستون مگنتیـک MACS (سـتون LS : سـایز

www.SID.ir



و ۵٪ سرم به هر چاهک افـزوده گردیـد(گـروه آزمـایش). پس از ۳ روز هم کشتی، سلولهای ⁺CD34 را از چاهکها خارج کرده و جهت تعدیل شرایط MSCها بـرای ورود بـه فاز تمایزی، محیط DMEM با غلظت کم گلوکز حاوی ۱۰٪ FBS جایگزین شد. پس از ۲۴ ساعت، محیطها را از تمام چاهک، کاملاً خارج کرده و به همه چاهک، ۱ ميلى ليتر محيط تمايزي سلول هاي مزانشيمي شامل DMEM حاوی دگزامتازون ۱ میلیمولار، اسید اسکوربیک دو فسفات ١/ مولار، گلیسرول دو فسفات ١ مولار و ١٠٪ سرم افزوده گردید. در ادامه هر دو روز یک بار محیطهای داخل چاهکها با محیط تمایزی تازه(در هر دو گروه) جایگزین شد. در روزهای ۴ و ۶ تمایزی، فرآیند استخراج RNA ، ساخت DNA و در نهايت PCR و الكتروفورز روى ژل جهـت بررسـي بيـان ژن،هـاي اســتئوپونتين و استئوكلسين انجام شد. استئوپونتين I (multidomain ، acid-rich Phosphorylated glycoprotein) توسط سلولهای مختلفی در بدن تولید می گردد ولی تولید عمده آن در نیچ اندوستيل توسط استئوبلاست ميباشد. OPN (استئوپونتين) یک مولکول خارج سلولی و غیر هماتوپوئتیک است و به صورت یک تنظیمکننده منفی بالقوه برای HSC به واسطه كاهش در أپوپتوز اين سلولها عمل ميكند، بدين ترتيب به عنوان یک جـزء کلیـدی نـیچ سـلولهـای HSC مطـرح است. استئوكلسين كه BGLAP است. استئوكلسين ك carboxyglutamate acid contaning protein) نیےز نامیدہ می شود، پروتئینی غیرکلاژنی بوده، به صورت انحصاری توسط استئوبلاست تـرشح مــىشـود و در تنظيــم متابولیک بدن، مینرالیزاسیون استخوانی و هموستاز یون كلسيم نقش داشته و ذاتاً يک ماهيت پرواستئوبلاستيک يـا استخوانسازی دارد. مارکر مهم دیگر در بررسی استئوژنزیس CD90 میباشد، این مارکر به میزان بـالایی در سطح MSCها بیان شده و میـزان بیـان آن در طـی تمـایز استئوبلاستی و در سلول استئوبلاست کاهش می یابد. در روز ۶ تمایز برای بررسی میزان کاهش بیان این مارکر، بـر روی سلولهای هر دو گروه آزمایش و کنترل فلوسیتومتری مارکر CD90 انجام شد. در روز ۱۰ تمایز نیز جهت بررسی بيان أنزيم ألكالين فسفاتاز (بيان اين أنزيم غشايي در

بزرگتر ستون متناسب با تعداد سلول) عبور داده شده و به روش Positive selection این سلولها از سایر سلوله ای تک هستهای جدا شدند و مورد شمارش سلولی و آزمایش حیاتپذیری(Viability) قرار گرفتند.

ارزیابی درجه خلوص سلولهای ⁺CD34:

در این مرحله جهت تعیین خلوص سلولهای⁺CD34 به روش فلوسیتومتری، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی(حاوی ^۶۰۲ سلول در هر میلیلیتر) با ۵ میکرولیتر از آنتیبادی منوکلونال ⁺CD34 کونژوگه با FITC (فلورسئین ایزوتیوسیانات) و برای کنترل منفی با آنتیبادی -FITC ایزوتیوسیانات) و برای کنترل منفی با آنتیبادی -ICC IgG1 مخلوط شدند و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد و تاریکی انکوبه شدند. در مرحله بعد سلولها با ۲٪ PBS-BSA شستشو داده شدند و در ۵۰۰ میلیلیتر سلولها، ۵۰ میکرولیتر پارافرمالدئید ۱٪ به لولهها اضافه و با دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل شدند.

کشت همزمان سلول های بنیادی خونساز و مزانشیمی:

در ایـن آزمایش از دو گروه شامل گروه آزمـایش یعنـی MSCهایی که با HSCها هم کشتی داده شده و سپس تحت تمايز استئوبلاستي قرار گرفتند و گروه کنترل يعني MSCهایی که بدون هم کشتی با HSCها تحت تمایز استئوبلاستی قرار گرفتند، استفاده شد. قابل ذکر است که سلولهای MSC در هر ۲ گروه از یک اهداکننده و از یک پاساژ سلولی برداشت شدهاند و تمام مراحل کار ۳ بار تكرار شده است. این دستورالعمل شامل ۳ بخش هم كشتي MSCها با سلول، ای HSC ، تمایز سلول، ای MSC و ارزیابیهای مورد نظر میباشد. ابتدا ۲۰۴ × ۵ سلول MSC در محیط DMEM حاوی ۱۰درصد سرم حیوانی در چاهکهای پلیت ۲۴ خانهای که با کلاژن و ویترونکتین یوشیده شده بودند، کشت داده شد. بعد از این که سلول ها به هم پوشانی ۸۰٪ تـا ۹۰٪ رسیدند، محیط DMEM از چاهکها خارج و پس از شستشوی چاهکها با PBS ، تعداد ۲۰^۴ × ۵ از سلول های ⁺CD34 تازه جدا شده به همراه ۱ میلیلیتر محیط Stem Span حاوی ۱۰ng/mL SCF

حين تمايز MSC بيه استئوبلاست، Fold ۴۷ افزايش

مي يابد و به عنوان اولين نشانه اين تمايز به روش

آنزیماتیک و رنگآمیزی اختصاصی قابل ارزیابی می باشد)،

رنگآمیزی ALP و جهت بررسی مینرالیزاسیون سلولی و

میزان رسـوب کلسـیم فسـفات در MSCهـا، رنـگآمیـزی

آلیـزارین رد بـر روی سـلولهـای هـر دو گـروه مـذکور

جدول ۲: برنامه زمانی و دماهای لازم دستورالعمل کیت Takara جهت انجام PCR

۹۵ °C

۹۴ °C

۵۸ °C

VY °C

۷۲ °C

۵ دقىقە

سکانس	دما(C°)	نام آغازگر
5'-TGA GAG CAA TGA GCA TTC CGA TG-3'	۶۸	OPNF جلوبرنده
5'-CAG GGA GTT TCC ATG AAG CCA C-3'	۶۸	OPNF معکوس
5'-AGC GAG GTA GTG AAG AGA-3'	54	OCNF جلوبرنده
5'- AGG GGA AGA GGA AAG AAG-3'	54	OCNF معكوس
5'-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG G-3'	۵۹	β-actin جلوبرنده
5'-GTG TTG AAG GTC TCA AAC ATG AT-3'	۵۹	β-actin معکوس

جدول ۱: آغازگرهای ژنهای بتااکتین، استئوپونتین و استئوکلسین

جداسازی وکشت سلولهای MSC:

۴۸ ساعت بعد از کشت سلولهای تک هستهای، سلولهای غیر چسبان حذف شدند. سلولهای دوکی شکل مزانشیمی پس از گذشت سه روز در محیط کشت به صورت سلولهای چسبنده ظاهر شدند. تعدادی سلول هماتوپوئتیک به طور آزاد یا چسبیده به سلولهای مزانشیمی هنوز در محیط دیده می شد که در روزهای بعدی با تعویض محیط این سلولها حذف شدند و تنها سلولهای مزانشیمی در محیط باقی ماندند. کشت اولیه در حدود ۱۰ تا ۱۴ روز طول کشید که در نهایت در روز چهاردهم، سلولها بیش از ۸۰٪ کف فلاسک را پوشاندند.

۱ دقیقه ۲۵ ثانیه ۲۵ ثانیه ۲۵ ثانیه ۲۵ ثانیه ۲۵ ثانیه ۲۰ تایج مربوط به مارکرهای سطحی سلولهای مزانشیمی ۲۰ شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین درصد بیان مارکرهای اختصاصی سلولهای بنادی مزانشیمی شامل

أناليز RT-PCR :

صورت گرفت.

دناتو راسيو ن مقدماتي

دناتوراسيون

آنیلینگ

اكستنشن

اكستنشن نهايي

سلولها از نظر بیان ژن استئوپونتین و استئوکلسین مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور RNA سلولهای هر دو گروه آزمایش و کنترل جداسازی شد.

سپس CDNA در واکنش رونویسی معکوس با استفاده از کیت ساخت cDNA تهیه شد. در ادامه واکنش PCR انجام شد(جداول ۱ و ۲). در پایان محصول PCR درون چاهکهای ژل ۲ درصد آگاروز ریخته شد و پس از الکتروفورز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگآمیزی و سپس ارزیابی شد.

در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین درصد بیان مارکرهای اختصاصی سلولهای بنیادی مزانشیمی شامل CD105 ، CD166 ، CD90 و CD44 در ساولهای جدا شده از مغز استخوان به ترتیب ۸/۷ ± ۸/۹۶٪، ۱۲/۱ ± ۸/۸۸٪، ۵/۹ ± ۹۳٪ و ۱۰/۲ ± ۵/۹۹٪ می باشد. در حالی که مارکرهای ویژه سلولهای هماتوپوئتیک از جمله CD45 و

CD34 در این سلولها بیان قابل توجهی (۳/۰ ± ۸/۸٪، ۴/۰ ± ۲/۸٪) را نشان ندادند (شکل ۱).

*جداسازی سلول های *CD34:* میانگین درصد خلوص سلول های *CD34 جدا شده ب





شکل ۱: نتایج فلوسیتومتری سلولهای مزانشیمی مغز استخوان. ردیف اول از چپ: جمعیت سلولهای بزرگ تک هستهای، واکنش سلولها با آنتی CD90 و آنتی CD166. ردیف دوم از چپ: واکنش سلولها با آنتی CD105، آنتی CD44 و آنتی CD45 . ردیف سوم از چپ واکنش سلولها با آنتی CD34 و ایزوتیپ کنترل.



شکل ۲: خصوصیات ایمنوفنوتیپی سلولهای ⁺CD34 جدا شده با روش MACS . از چپ: شکل اول: جمعیت سلولهای بزرگ تک هستهای. شکل دوم: واکنش سلولها با آنتیبادی ایزوتیپ. شکل سوم: واکنش سلولها با آنتی CD34 (%R1=97.9% of total cells , RN1=

استفاده از روش فلوسیتومتری ۵/۶ ± ۸۴/۲۷ درصد و میانگین درصد زنده ماندن سلولهای جدا شده حدود ۲ ± ۸۹ درصد بود(شکل۲).

يافتهها

ازمایش و کنترل، عوامل تمایز دهنده(دگزامتازون، اسید اسکوربیک، گلیسرول فسفات) افزوده شد(شکلهای ۳ و ۴).

با توجه به این که در طی تمایز محتویات کلسیم در سلولها افزایش مییابند، از رنگآمیزی اختصاصی آلیزارین رد رسوبات کلسیم (به رنگ قرمز) در سلول های تمایز یافته در هر دو گروه آزمایش و کنترل بهره جسته شد. هم چنین در سلولهای استئوبلاست، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز افزایش یافته و شاخصی برای تمایز سلولها



شکل۳: سلولهای مزانشیمی نمایز داده شده به سمت استئوبلاست بدون هم کشتی با HSC (کروه کنترل) در A) روز چهارم تمایزی. B) روز ششم تمایزی. C) روز دهم تمایزی(بزرگ نمایی ۴۰x).



شکل۴ : سلولهای مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست که قبلاً با HSCها همکشتی داشتهاند(گروه آزمایش). A) روز چهارم تمایز. B) روز ششم تمایز. C) روز دهم تمایز(بزرگ نمایی ۴۰x).

محسوب می گردد، لذا سلول های تمایز یافته در هر دو گروه آزمایش و کنترل با انجام این رنگ آمیزی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. در سلول های مزانشیمی تمایز یافته، میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافته که بیانگر تمایز این سلول ها به سلول های رده استئوبلاستیک میباشد. در تمایز سلول های MSC به استئوبلاست به روش استاندارد (گروه کنترل)، دو رنگ آمیزی مذکور از روز ۱۴ تمایز مثبت شدند. در این مطالعه انتظار می رفت به دلیل هم کشتی این شداند. در این مطالعه انتظار می رفت به دلیل هم کشتی این سلول ها با SCها و تأثیر آن ها بر تمایز SMها به استئوبلاست ها، سلول های بنیادی مزانشیمی زودتر وارد فاز تمایزی گردند.

در بررسی این امر در گروه آزمایش، به دنبال تکرارهای متوالی و رنگآمیزیهای فوق در روزهای مختلف بعد از هم کشتی، مشخص شد که از روز ۱۰ تمایز به بعد، رنگآمیزیها مثبت میگردند. این مطلب حاکی از آن است که سلولهای بنیادی خونساز باعث افزایش سرعت تمایز

سلولهای بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست می شوند در حالی که در گروه کنترل، زودتر از روز ۱۴ رنگ آمیری مثبتی مشاهده نگردید. هم چنین چند ناحیه در رنگ آمیزی سلولهای گروه آزمایش نمایان شد که به صورت کانونی رنگ گرفته بودند. احتمال می رود در این مناطق HSCها در اتصال و تماس مستقیم با MSCها بوده و بر همکنش های میان این دو سلول، یکی از عوامل دخیل در اثر مذکور باشند.

در همین رابطه مشخص شد در مناطق فوق، با افزایش روزهای تمایز (تا روز ۱۰)، سلولهای HSC نه تنها کاهش نیافته بلکه تکثیر پیدا میکنند. این امر نیز دلیل دیگری بر تماس مستقیم MSC و HSC میباشد که در واقع تا روز دهم سلولها به استئوبلاست تمایز مییابند. استئوبلاستها دارای نقش در خود نوسازی HSCها بوده لذا تاثیرات متقابل این دو سلول در نواحی مذکور قابل مشاهده است(شکل ۵).

خون

دوره ۹، شماره ۳ مکرر، پاییز ۹۱، ویژهنامه سلولهای بنیادی



شکل ۵: رنگ آمیزی آلیزارین رد در سلولهای مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست در روز دهم تمایزی در گروه کنترل منفی (A) و در گروه آزمایش مثبت بود (B) و نیز در نواحی از سلوله ای تمایـز یافتـه گـروه آزمایش ایـن رنگ آمیزی به صورت کانونی مثبت بود (C) (بزرگنمایی ۴۰x)، رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز در سلولهای مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست در روز دهم تمایزی در گروه کنترل منفی (D) و در گروه آزمایش مثبت بود (E)(بزرگ نمایی ۴۰۸.

> *انجام فلوسیتومتری جهت تایید کاهش بیان مارکر *CD90:* همان طور که در مطالعههای مختلف اشاره شده است،

> همان طور که در مطاعه های محلل اساره سده است، در تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان، میزان بیان مارکر ⁺CD90 کاهش می یابد. در این مطالعه از این امر جهت مقایسه سرعت تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی بین دو گروه آزمایش و کنترل استفاده مودیم. برای انجام این کار جمعیت سلولهای بنیادی مرزانشیمی ⁺CD90 ، مارکری که در سلولهای SMS بداسازی گردیدند. جهت مقایسه میزان بیان ⁺OP00 در به میزان بالایی بیان می شود، جهت بررسی فلوسیتومتری مطح سلولهای دو گروه آزمایش و کنترل در روز ۶ جداسازی آن جا که آنتیبادیهای مونوکلونال به مولکولهای فلورسنت متصل موده و در واکنش اختصاصی شدت رنگ فلورسنت بازتابی نمایانگر مقدار حضور به مولکولهای ⁺OP00 متصل می شوند و به همین دلیل مارکر مذکور در سطح سلولها می باشد . لذا در بررسی فلوسیتومتری ضمن تعیین درصد سلولهایی که بیان

پروتئین را نشان میدهند، میانگین شدت رنگ فلورسنت، بیانگر میانگین میزان بیان مارکر CD90 در سلولهای تحت بررسی می باشد.

به همین دلیل میانگین فلورسنت بازتابی سلولها(میزان مارکرهای هدف که به آنتیبادی منوکلونال متصل شدهاند (MFI = Mean Fluorescent Intensity)، به عنوان میزان بیان مارکر مورد نظر در سلولهای دو گروه آزمایش و کنترل بررسی گردید. نتایج نشان دادند که با توجه به میزان بیان مارکر ⁺CD90 در سلولهای مزانشیمی پیش از تمایز، میزان بیان آن در سلولهای مزانشیمی در روز ششم تمایزی، در سلولهای گروه کنترل بسیار بیشتر کاهش یافته است(شکل۶).

بررسی بیان ژن استئوپونتین و استئوکلسین: تمایز سلولی با استفاده از بیان ژن استئوپونتین و استئوکلسین مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق آن چه که در مطالعههای مختلف گزارش گردیده، بیان ژن استئوپونتین از



شکل ۶: نتایج فلوسیتومتری بررسی مقایسه میزان بیان مارکر CD90 که به صورت میانگین فلورسنت بازتابی ارایه شده است. از چپ: پراکندگی سلولـی در جمعیت مورد مطالعه و بیان مارکر CD90 سلولهـای گروه آزمایش در روز ۶ تمایز، بیان مارکر CD90 سلولهای گروه کنترل در روز ۶ تمایز و بیان مارکر CD90 در سلول های MSC پیش از تمایز.



شکل ۷: شکل بالا: بیان ژنهای استئوپونتین(OPN) و بتا اکتین -β) (actin در سلول های مزانشیمی تمایز یافته به استئوبلاست. (۱) نشانگر شاخص وزن مولکولی (DNA Size Marker 100bp) است. (۲) بیان ژن بتا اکتین(۳) کنترل منفی (۴) بیان OPN در روز ۶ تمایزی سلولهای مزانشیمی کنترل (۵) بیان OPN در روز ۶ تمایزی سلولهای مزانشیمی آزمایش (۶) بیان OPN در روز ۴ تمایزی سلولهای مزانشیمی آزمایش (۷) بیان OPN در روز ۴ تمایزی سلولهای مزانشیمی کنترل را نشان میدهد.

(۱) روز۴ تمایزی گروه اَزمایش، (۲) روز ۴ تمایزی گروه کنترل، (۳) روز ۶ تمایزی گروه آزمایش و (۴) روز ۶ تمایزی گروه کنترل.

روز سوم شروع و در روز هفتم تمایز به حداکثر میرسد و بعد از آن به تدریج کـاهش مـییابـد و متعاقـب كاهش أن، بيان ژن استئوكلسين از روز هفتم افزايش می یابد. این در حالی است که در سلول های بنیادی

شکل ۸ : شکل بالا: بیان ژنهای استئوکلسین(OCN) و بتا اکتین -β) (actin در سلول های مزانشیمی تمایز یافته به استئوبلاست. (۱) نشانگر شاخص وزن مولکولی (DNA Size Marker 100bp) است. (۲) بیان ژن بتا اکتین (۳) کنترل منفی (۴) بیان OCN در روز ۴ تمایزی سلولهای مزانشیمی آزمایش(۵) بیان OCN در روز ۴ تمایزی سلول های مزانشیمی کنترل (۶) بیان OCN در روز ۶ تمایزی سلولهای مزانشیمی آزمایش(۷) بیان OCN در روز ۶ تمایزی سلولهای مزانشیمی کنترل را نشان میدهد.

شکل پایین: شکل سمت چپ بیان ژن بتا اکتین به ترتیب درسلولهای شکل پایین: بیان ژن بتا اکتین به ترتیب در سلولهای(۱) روز ۴ تمایزی گروه آزمایش، (۲) روز ۴ تمایزی گروه کنترل، (۳) روز ۶ تمایزی گروه آزمایش و (۴) روز ۶ تمایزی گروه کنترل.

مزانشیمی پیش از تمایز، ژن استئوکلسین بیان نمی گردد. در این مطالعه انتظار میرفت که هم کشتی سلولهای HSC با سلولهای MSC باعث شود این سلولها زودتر از زمان ذکر شده وارد فاز تمایزی گردند و به عبارتی بیان این دو



ژن در سلولهای تمایز یافته زودتر تحقق یابد. نتایج حاصله این مدعا را اثبات نمودند و در سلولهای تمایز یافته گروه آزمایش، بیان ژن استئوپونتین در روز چهارم تمایز کاهش و در روز ششم تمایز عدم بیان این ژن مشاهده گردید(شکل). بیان ژن استئوکلسین نیز در این سلولها از روز ششم تمایز شروع شد در حالی که در ملولهای گروه کنترل، بیان این ژن مشاهده نگردید(شکل N). این نتایج همگی تایید مینمایند که سلولهای مزانشیمی به استوبلاست میشوند.

بحث

در مطالعه های انجام شده توسط محققین متعددی از جمله تایچمن و همکاران وی در سال ۱۹۹۷، ارتباط تنگاتنگی میان سلول،ای بنیادی خونساز و سلول،ای استئوبلاست مشاهده گردید که به موجب آن، HSCها بیان فعالیت، ای حمایتی خونسازی را از طریق سلول،ای استئوبلاست القا مینمایند، لـذا ایـن فرضیه مطرح می شود که ارتباط متقابل میان این دو سلول، جهت توسعه و نمو هر دو جمعیت سلولی، امری ضروری میباشد(۱۸). در این مطالعه نشان داده شد که در فرآیند تمایز سلول،های بنیادی مزانشیمی، سلول،هایی که پیش از تمایز تحت هم کشتی با سلولهای بنیادی خونساز ⁺CD34 قرار گرفتهاند نسبت به آن، ایی که بدون هم کشتی با سلول، ای مذکور تمایز داده شدهاند، زودتر وارد فاز تمایزی به سمت استئوبلاست می گردند و این امر با بررسی بیان دو ژن استئوپونتین و استئوکلسین در روزهای مختلف تمایز، رنگآمیزی سیتوشیمیایی آلکالین فسفاتاز و آلیـزارین رد و نیـز بررسـی بیـان مـارکر CD90 در ایـن سلولها، تحقق پذيرفت. با استناد به نتايج حاصله اثبات گردید که سلولهای HSC انسانی ⁺CD34 جداشده از خون بند ناف قادرند سبب افزایش تمایز سلول های MSC انسانی به دست آمده از مغز استخوان به سلول های استئوبلاست شوند و به عبارت دیگر می توانند نیچ خود را تنظیم نموده و سبب گسترش نیچ استئوبلاستیک گردند. جهت بررسی توانایی تمایز MSCها به رده استئوبلاستی، این سلولها در

محيط تمايزي استئوژنيک شامل DMEM-LG ، FBS ، DMEM-LG آسکوربات، β- گلیسرول فسفات و دگزامتازون کشت داده شدند. نظر به این که میـزان بیـان ALP و نیــز رسوبـات كلسيم در طي فرآينـد تمـايز استئوبلاستي در اين سلولهـا افزایش می یابد، از رنگ آمیزی سیتوشیمی ALP و آلیـزارین رد به عنوان شاخص تمایز استئوبلاستیک استفاده گردیـد. نتایج به دست آمده با نتایج مطالعه های صورت گرفته توسط محققینی از جمله مولمن و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ مطابقت داشت(۱۹). بررسی شاخص های دیگر تمايز استئوبلاستيک شامل استئوپونتين و استئوکلسين نیز به روش مولکولی (RT-PCR) انجام شد که نتایج حاصله در گروه کنتـرل مطابق با نتایج هایلاک و همکـاران وی در سال ۲۰۰۳ و نیز E پوچاز و همکارانش در سال ۲۰۰۷ می باشد (۲۰، ۱۵). مشاهده گردید که بیان ژن OPN در روز ۷ تمایز به حداکثر رسیده و سپس به تدریج کاهش مییابد. بیان ژن OCN نیز وابسته به زمان بوده و از روز ۷ تمایز افزایش مییابد. در این مطالعه مشاهده شد که در سلولهای گروه آزمایش، بیان ژن OPN در روز ۴ تمایز بالاتر از بیان ژن OPN در سلولهای گروه کنتـرل بـوده و بیان آن در روز ۶ تمایزی در گروه آزمایش، با روش -RT PCR قابل ردیابی نمی باشد در حالی که در گروه کنترل هم چنان بیان ژن مذکور در روز ۶ تمایز قابل مشاهده میباشد. بیان OCN نیز از روز ۶ تمایز قابل ردیابی است. بـ دلیـل این که تاکنون مطالعه مشابهی بر روی HSC و MSCهای انسانی صورت نگرفته است لذا نتایج فوق قابل مقایسه با نتایج مطالعه های دیگر نمی باشد. هم چنین در ایـن مطالعـه جهت مقايسه روند تمايز بين دو گروه آزمايش و كنترل، بررسی بیان مارکر CD90 به روش فلوسیتومتری قبل و بعد از تمایز در هر دو گروه صورت پذیرفت و نتایج به دست آمده مبنی بر کاهش بیان این مارکر در طی تمایز استئوبلاستی MSCها، با نتایج مطالعه صورت گرفته توسط وایسمن و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ مطابقت دارد. البته در مطالعه مـذكور از روش ايمونوفلورسـانس جهت بررسی بیان CD90 استفاده گردیده است(۲۱). هم چنین مشخص گردید کاهش بیان این مارکر در سلولهای گروه آزمایش، به میزان قابل توجهی بیشتر از سلولهای

گروه کنترل میباشد که این امر نیز گواه دیگری بـر تـاثیر سلولهـای HSC بـر افزایـش سرعـت تمـایـز MSCها بـه سلولهای استئوبلاست میباشد.

نتایج به دست آمده از مطالعه دیگیرولامو و همکاران وی در سال ۱۹۹۹ و نیز سکیا و همکارانش در سال ۲۰۰۲ همگی نشان میدهند که با افزایش سن اهدا کننده، خاصیت تمایز استئوبلاستی MSCها کاهش مییابد. با توجه به این که در مطالعه های قبلی صورت گرفته در آزمایشگاه نیز این امر مشاهده گردید لذا در این مطالعه از نمونه های مغز استخوان کودکان استفاده شد(۲۳، ۲۲). در این مطالعه، با توجه به این که هدف از هم کشتی HSC و معالمه، با توجه به این که هدف از هم کشتی HSC و بررسی های متعدد بهترین محیط آزمایش MSCها و خود نوساز بررسی های متعدد بهترین محیط آزمایش میاشد، لذا پس از ماندن آن ها به کار برده شد و نیز بی تاثیری آن بر تمایز ماندن آن ها به کار برده شد و نیز بی تاثیری آن بر تمایز ماندن آن ها به کار برده شد و نیز بی تاثیری آن بر مایز ماندن آن ها به کار برده شد و نیز بی تاثیری آن بر تمایز ماندن آن ها به کار برده شد و نیز بی تاثیری آن بر مایز ماندن آن ها به کار برده شد و نیز بی تاثیری آن بر مایز ماندن آن ها به کار برده شد و نیز بی تاثیری آن بر مایز ماندن آن ها به کار برده شد و نیز بی تاثیری آن بر مایز ماندن آن ها به کار برده شد و نیز بی تاثیری آن بر مایز ماندن آن ها به کار برده شد و نیز بی تاثیر میاشد. به عادوه نمایان گشت که محیط متام میاشد. به عادو رشد و تمایز کاتها ندارد.

نکته دیگر این بود که در گروه آزمایش، پس از اتمام هم کشتی سلولها، حتی با وجود شستشوهای صورت گرفته، هم چنان تعدادی از HSCها به MSCهای در حال تمایز متصل باقی ماندند و نه تنها حذف نشدند بلکه در محیط تمایزی، تکثیر نیز یافتند. مشاهده گردید که این مناطق در رنگ آمیزی آلیزارین رد، به صورت کانونی رنگ میگیرند. با توجه به شواهد موجود احتمال می رود در این مناطق، MSCها در اتصال و تماس مستقیم با MSCها بوده و برهمکنشهای میان این دو سلول، یکی از عوامل دخیل در اثر مذکور باشند. لازم به ذکر است که به دلیل عدم وجود مطالعه مشابه بر روی سلولهای انسانی مذکور، این نتایج قابل مقایسه با نتایج دیگر نمی باشد.

البته در سال ۲۰۰۸، مطالعه نسبتاً مشابهی توسط یانگ هون جانگ و همکاران وی بر روی سلولهای مذکور موشی در in vitro و in vitro صورت پذیرفته است ولی در آن مطالعه جهت هم کشتی از پلیتهای Transwell استفاده شده که در آن دو سلول SCH و MSC با هم تماس سلول – سلول نداشته و صرفاً فاکتورهای مترشحه از HSCها یا

به عبارتی condition media وارد محیط تمایزی MSC میشود. فاکتورهای مورد نظر در ایـن مطالعـه نیـز شـامل بررسی مقادیر BMP2 ، OCN ، SCF ، IL6 و BMP6 در هم کشتی مذکور میباشد و عنوان گردیده است که احتمالاً افزایش بیان BMP₂ و BMP₆ تولید شده توسط HSCها، مسؤول تمايز MSC به استئوبلاست بوده و نقشى برای اتصال سلول - سلول در این امر مطرح نشده است(۱۷). در حالی که با توجه به نتایجی که در این مطالعه حاصل گشت، تصور می شود که بر همکنش های سلول – سلول نيز علاوه بر افزايش بيان BMP2 و BMP6، نقش به سزایی را در این پدیده ایفا مینمایند. در نهایت در این مطالعه اثبات گردید که HSCهای انسانی جـدا شـده از خـون بنـد نـاف، قادرنـد سـبب افـزايش سـرعت تمـايز MSCهای انسانی جدا شده از مغز استخوان به استئوبلاست گردند و به عبارتی گسترش نیچ استئوبلاستیک را صورت دهند. اما جزئیات، برهمکنش ها و عوامل دخیل در این امر هنوز مشخص نمیباشد و نیاز به بررسیهای سلولی و مولکولی دقیق در این رابطه است. امید است که با نیـل بـه این هدف، گامی مؤثر در دستیابی به اهداف درمانی جدیـد در حوزه هماتويوئتيک برداشته شود.

نتيجهگيري

نتایج ما بیان زود هنگام ژنهای استئوپونتین و استئوکلسین را در همکشتی MSC باSCH نمایان ساخت. این یافتهها از نقشHSCها در القای تمایز استئوبلاستی MSCها حمایت مینمایند. هم چنین کاهش بیان CD90 و افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و مینرالیزاسیون سلولی این نتایج را تایید نمودند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایاننامه کارشناسی ارشد مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون وابسته به سازمان انتقال خون ابران میباشد. بدین وسیله از کلیه همکاران مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران که در انجام این پایاننامه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی مینماییم.



References :

- 1- Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. J Exp Med 1994; 179(5): 1677-82.
- 2- Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, *et al.* Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. Nature 2006; 439(7076): 599-603.
- 3- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, *et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell 2004; 118(2): 149-61.
- 4- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature 2003; 425(6960): 841-6.
- 5- Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, *et al.* Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. Blood 2005; 106(4): 1232-9.
- 6- Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. Clin Orthop Relat Res 1989; 240: 270-80.
- 7- Dorheim MA, Sullivan M, Dandapani V, Wu X, Hudson J, Segarini PR, *et al.* Osteoblastic gene expression during adiposegenesis in hematopoietic supporting murine bone marrow stromal cells. J Cell Physiol 1993; 154(2): 317-28.
- 8- Gordon MY, Clarke D, Atkinson J, Greaves MF. Hemopoietic progenitor cell binding to the stromal microenvironment *in vitro*. Exp Hematol 1990; 18(7): 837-42.
- 9- Quesenberry PJ. Stromal cells in long-term bone marrow cultures. In: Tavassoli M, editor. Handbook of the Hematopoietic Microenvironment. Clifton, NJ: Humana Press; 1989. p. 253-85.
- 10- Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang YC, Mooney DJ. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. FASEB J 2005; 19(6): 665-7.
- 11- Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satourma K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. Transplantation 1997; 63(8): 1059–69.

- 12- Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. Blood 2005; 105(7): 2631-9.
- 13- Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. Trends Biochem Sci 2006; 31(10): 589-95.
- Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoieticstem-cell niches. Nat Rev Immunol 2006; 6(2): 93-106.
- 15- Haylock DN, Nilsson SK. Osteopontin: a bridge between bone and blood. Br J Haematol 2006; 134(5): 467-74.
- 16- Murrell W, Féron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, *et al.* Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. Dev Dyn 2005; 223(2): 496-515.
- 17- Jung Y, Song J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Z, Williams B, *et al.* Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. Stem Cells 2008; 26(8): 2042-51.
- Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. Human osteoblasts support human progenitor cells *in vitro* bone marrow cultures. Blood 1996; 87(2): 518-24.
- 19- Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Massy M, Libertalis M, Bron D, et al. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. Eur J Haematol 2006; 76(14): 309-16.
- 20- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, *et al*. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. Cell 2007; 130(3): 456-69.
- 21- Wiesmann A, Bühring HJ, Mentrup C, Wiesmann HP. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. Head Face Med 2006; 2: 8.
- 22- Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. Stem Cells 2002; 20(6): 530-41.
- 23- Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol 1999; 107(2): 275-81.

Original Article

Effect of human hematopoietic stem cells on differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblast cells

Fadaei R.¹, Amirizadeh N.¹, Nikougoftar M.¹, Habibi Roudkenar M.¹

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

The correlation between hematopoietic stem cells (HSCs) and the cells comprising the niche especially osteoblast cells is critical for maintaining stem cell activities. Yet little evidence supports the concept that HSCs regulate development of the niche. If true, it may explain why many hematopoietic defects are accompanied by changes in the osseous architecture and provide new therapeutic targets for regulating bone formation.

Materials and Methods

In this exprimental study, we cocultured bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) with umbilical cord blood HSCs in stem span media for 3 days. Then MSCs were differentiated to osteoblast cells by using osteogenesis kit. Evaluation of osteogenic differentiation of MSCs in different days came out to be: expression of osteopontin and osteocalsin (RT-PCR on days 4 and 6), expression of CD90 (flow cytometry on day 6), expression of alkaline phosphatase enzyme (alkaline phosphatase staining) and mineralization of MSCs (alizarin red staining on day 10).

Results

Our results showed early expression of osteopontin and osteocalsin in HSCs coculture with MSCs. These findings support the role of HSCs in induction of osteoblastic differentiation of MSCs. Decrease in the expression of CD90, higher activation in cell alkaline phosphatase enzyme, and mineralization confirmed the results.

Conclusions

In the field of human stem cells, our *ex vivo* findings demonstrated that HSCs can enhance differentiation of MSCs toward osteoblast cells thereby participating in formation of their niche.

Key words: Hematopoietic Stem Cells, Mesenchymal Stem Cell, Coculture, Osteogenesis, Osteoblasts

Received: 2 Aug 2011 Accepted: 6 Feb 2012

Correspondence: Amirizadeh N., PhD of Hematology and Blood Bank. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine. P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599; Fax : (+9821)88601599 E-mail: *n.amirizadeh@ibto.ir*