

Mesenchymal Stem Cells: History, Isolation and biology

Baghaban Eslaminejad M., Ph.D.*

**P.O.Box: 19395-4644, Stem Cell Department, Royan Institute, Tehran, Iran*

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) as a kind of adult stem cells possess two properties of long term self-renewal ability and multilineage differentiation potential into skeletal cell lineages. MSCs were first isolated and described from bone marrow samples. Further investigations have identified several other tissues as alternative sources for these cells. In spite of the clinical importance of MSCs, some biological aspects of them including their self-renewal proliferation and differentiation potential have not yet been fully understood. Furthermore, the specific surface markers for these cells remained to be investigated. In present paper, the existing data regarding to the different aspects of mesenchymal stem cells including the history, isolation method, surface markers, in vitro culture and expansion of the cells, self-renewal proliferation and finally their differentiation potential have been reviewed.

Keywords: Stem Cells, Biology, History

سلولهای بنیادی مزانشیمی: تاریخچه، جداسازی و زیست شناسی

محمد رضا باغبان اسلامی نژاد

گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: اسفندماه ۸۵، تاریخ پذیرش: اردیبهشتماه ۸۶

چکیده

سلولهای بنیادی مزانشیمی که نوعی سلول بنیادی بزرگسال محسوب می‌شوند، با دو خاصیت توان خود تجدیدی برای مدت طولانی و پتانسیل تمایز به سلولهای بافتهای اسکلتی شناخته می‌شوند. این سلولها ابتدا از مغز استخوان جدا شدند ولی تحقیقات بعدی نشان داد که برخی بافتهای بدن نیز حاوی سلولهای بنیادی مزانشیمی است. با وجود اهمیت سلولهای بنیادی مزانشیمی در سلول درمانی هنوز برخی از جنبه‌های زیست‌شناختی، نظیر مکانیسمهای تمایز و تقسیمات خودتجدیدی به خوبی درک نشده است. همچنین، تا به حال یک مارکر ویژه برای این سلولها شناسایی نشده است. در نوشته حاضر اطلاعات موجود در ارتباط با جنبه‌های مختلف سلولهای بنیادی مزانشیمی شامل تاریخچه، روشهای جداسازی، مارکرها، کشت و تکثیر سلول در محیط آزمایشگاهی، تقسیمات خود تجدیدی و بالاخره پتانسیل تمایز آنها مرور شده است.

کلیدواژه‌ها: سلولهای بنیادی، زیست‌شناسی، تاریخچه

مقدمه

سلولهای بنیادی مزانشیمی نوعی سلول غیر خونساز ساکن در مغز استخوان و سایر بافتهای اسکلتی توصیف می‌شود. حضور این سلولها در مغز استخوان برای اولین بار توسط یک پاتولوژیست آلمانی موسوم به کنهیم در حدود ۱۴۰ سال (۱۸۶۷) پیشتر شناسایی شده بود. این محقق برای مطالعه ترمیم زخم، رنگ آنالین غیر محلول را از طریق وریدی به خرگوش تزریق می‌کرد و آنگاه در زخمی که در سمت دیستال حیوان ایجاد کرده بود به دنبال سلولهای حاوی رنگ

می‌گشت. نتایج این محقق نشان داد که اغلب سلولهای ظاهر شده در محل ترمیم زخم، حاوی رنگ آنالین هستند و در نتیجه از خون آمده اند و با توجه به منشا خون می‌توان محل اصلی این سلولها را مغز استخوان در نظر گرفت. سلولهای حاوی رنگ آنالین در اصل سلولهای التهابی و سلولهایی با مورفولوژی فیبروبلاستی که در اطراف آنها رشته‌های ظریفی قرار داشت، بودند. کار کنهیم این احتمال را که مغز استخوان ممکن است حاوی سلولهای فیبروبلاستی با توان ساخت رشته کلاژن باشد و این سلولها در زمان نیاز به محل زخم مهاجرت کرده و در ترمیم آن شرکت می‌نمایند را تقویت کرد [۱]. پس از آن، محل و منبع سلولهای فیبروبلاستی شرکت کننده در ترمیم زخم در بیش از ۴۰ مقاله مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بیانگر این بود فیبروبلاستها منشا موضعی دارند

✍ آدرس مکاتبه: تهران، بزرگراه رسالت، خیابان بنی‌هاشم، میدان بنی‌هاشم، کوچه حافظ

شرقی، پژوهشکده رویان، صندوق پستی ۴۶۶۴-۱۹۳۹۵

E-mail: bagesla@yahoo.com

جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمی

سلولهای بنیادی مزانشیمی معمولاً از نمونه‌های مغز استخوان جمع آوری شده از کرست ایلپاک لگن و یا استخوانهای تیبیا و فمور جدا سازی می‌شود [۱۶-۱۲]. در حیوانات بزرگتر نیز مغز استخوان معمولاً از جاهای مشابه با آنچه که برای انسان گفته شد تهیه می‌شود [۲۰-۱۷]. ولی در جوندگان، از بخش دیافیز استخوانهای تیبیا و فمور جمع آوری می‌شود [۲۲-۲۱]. سلولهای بنیادی مزانشیمی با وجودی که بخش کوچکی از سلولهای هسته دار مغز استخوان را تشکیل می‌دهد، به‌راحتی با روشهای استاندارد کشت سلول قابل استخراج و تکثیر هستند. برای این منظور، معمولاً سلولهای تک هسته‌ای نمونه‌های مغز استخوان با روش سانتیفریژ گرادیان جدا شده و با تراکم 1×10^4 یا 1.06×10^6 ، در محیط کشت پایه نظیر DMEM^۱ حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت می‌شوند. سلولهای بنیادی مزانشیمی در کشت مورفولوژی فیروبلاستی داشته و به سطح ظرف کشت متصل می‌شود. کشت اولیه معمولاً ۱۶-۱۲ روز نگهداری می‌شود و در طی این مدت سلولهای غیر چسبنده خونساز حذف می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که افزودن فاکتورهای رشد نظیر FGF-2^۲ سبب جداسازی سلولهایی با پتانسیل استئوژنیک بیشتر می‌شود [۲۳]. چنین سلولهایی تلومر طولی داشته و در نتیجه سلولهای نابالغی محسوب می‌شوند [۲۴]. عامل مهمی که بر تکثیر اپتیمال سلولهای بنیادی مزانشیمی تاثیر می‌گذارد، نوع سرم گاوی مورد استفاده است. برای این منظور باید سرم مورد استفاده طوری انتخاب شود که حداکثر تاثیرات تکثیری را داشته باشد. نکته دیگر این است که چنانچه سلول انسانی به منظور پیوند درمانی کشت می‌شود، محیط کشت مورد استفاده کاملاً تعریف شده بوده و کمترین میزان سرم گاوی را

ولی مسئله حل نشد و تا مدتها موضوع مورد مطالعه محققان بود [۶-۲].

سلولهای بنیادی مزانشیمی واقع در مغز استخوان برای اولین بار توسط فردنستین (Friedenstein) و پتراکوا (Petraikova) در سال ۱۹۶۶ شناسایی شد. این محققین در مطالعه‌ای سلولهای پیش ساز استخوان را از مغز استخوان موش صحرایی استخراج و توصیف کردند [۷]. ولی اولین شواهد قطعی توسط فردنستین در اواسط سال ۱۹۷۰ ارائه شد [۸]. این محقق نمونه‌های مغز استخوان را در یک ظرف پلاستیکی کشت داد و پس از ۴ ساعت یا بیشتر سلولهای غیر چسبنده را دور ریخت. در اصل این سلولهای دور ریخته شده سلولهای بنیادی رده خونساز بود. او گزارش کرد که بخش کوچکی از سلولهای چسبنده مغز استخوان از لحاظ ظاهر هتروژن بوده و بخشی که اتصالات محکمی با سطح دیش کشت برقرار کرده دوکی شکل بوده و تجمعات دو تا چهار سلولی ایجاد کرده است. این تجمعات به مدت ۲-۴ روز خاموش باقی ماندند و پس از آن به سرعت تکثیر یافتند. این سلولها پس از چندین بار پاساژ به صورت یکدست دوکی ظاهر شدند. مهمترین ویژگی این سلولها، داشتن توانایی ایجاد کلونهایی شبیه بافت استخوان و غضروف بود.

مشاهدات ابتدایی فردنستین، توسط چندین محقق به ویژه پیرسما (Piersma) و همکاران و اون (Owen) و همکاران در طول سال ۱۹۸۰ توسعه پیدا کرد (۹-۱۰). این مطالعات نشان داد که سلولهای جدا شده با روش فردنستین در اصل سلولهای چند توان بوده و قادرند به رده‌های استخوانی، غضروفی، چربی و حتی عضلانی متمایز شوند. نکته‌ای که جالب توجه است این است که فردنستین نشان داد که سلولهای بنیادی مزانشیمی حتی پس از ۲۰-۳۰ بار دو برابر شدن جمعیت سلولی این توانایی را دارند که چنانچه در داخل کپسولی قرار بگیرند و در صفاق رت کاشته شوند به استخوان و غضروف متمایز شوند [۱۱].

1. Dulbecco's Modified Eagle Medium

2. Fibroblast Growth factor-2

اپیدرمی ۱ و فاکتور رشد مشتق شده از پلاکتها ۲ به دست می‌آید. MAPCها توانایی تشکیل انواع سلولهای مشتق شده از اندودرم، اکتودرم و مزودرم (مانند هپاتوسیها، سلولهای اندوتلیال و نورونها) را دارا هستند. این سلولها مارکرهای ویژه سلولهای رده خونساز نظیر sca-1, C-kit یا CD45 را بیان نمی‌کنند و قادرند حتی در محیط فقیر از لحاظ مواد غذایی به طور نامحدود رشد یابند. در این سلولها طول تلومر پس از تقسیمات زیاد حفظ می‌شود و نیز این سلولها همانند سلولهای جنینی ژن oct-4 را بیان می‌کنند [۳۲].

مارکرهای سطحی سلولهای بنیادی مزانشیمی

تا به حال مطالعات زیادی در ارتباط با شناسایی مارکرهای سطحی سلولهای بنیادی مزانشیمی انسان انجام گرفته است. در این ارتباط مارکر سطحی Stro-1 به عنوان یک شناسه سطح سلولی ویژه برای سلولهای غیر خونساز مزانشیمی انسانی شناسایی شده است [۳۳]. همچنین مشخص شده است که آنتی ژن SB-10 که در سطح سلولهای بنیادی مزانشیمی وجود دارد با تمایز سلول به استخوان، ناپدید می‌شود [۳۴]. در یک مطالعه‌ای از آنتی بادی SH-2 بر علیه سلولهای بنیادی مزانشیمی استفاده و مشخص شد که این آنتی بادی با اپی توپ رسپتور TGF- β که CD105 نامیده می‌شود، واکنش نشان می‌دهد [۳۵]. از این آنتی بادی در انتخاب ایمنی - مغناطیسی سلولهای بنیادی مزانشیمی انسانی استفاده می‌شود. البته باید توجه کرد که CD105 در سلولهای اندوتلیال نیز وجود دارد [۳۶]. همچنین دو آنتی بادی SH-3 و SH-4 نیز با اپی توپ CD73 واکنش نشان می‌دهند [۳۷] و با سلولهای خونساز و استئوسیت واکنش نشان نمی‌دهند. متأسفانه همه آنتی ژنهای شناسایی شده برای سلولهای بنیادی مزانشیمی، در انواع دیگر

داشته باشد تا روش مورد استفاده قابل تکرار بوده و حداکثر سلامتی را داشته باشد [۱۳-۱۲].

زمانی که سلول بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش استاندارد (برای مثال محیط DMEM و سرم جنین گاوی) جدا سازی می‌شوند تا ۴۰ دوبله شدن جمعیت سلولی تکثیر می‌شوند و پس از آن توان تکثیری آنها به شدت کاهش می‌یابد. برای افزایش این توان روشهای مختلفی گزارش شده است. مطالعات نشان داده است چنانچه در جدا سازی سلول بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش معمول، علاوه بر سرم جنین گاوی فاکتورهای رشد ویژه‌ای استفاده شود، طول عمر سلولهای حاصل به ۷۰ دوبله شدن جمعیت سلولی افزایش می‌یابد و توان تمایزی نیز تا ۵۰ دوبله شدن جمعیت سلولی حفظ می‌شود [۲۶-۲۴]. این موضوع نشان می‌دهد که فاکتور رشد فیروبللاستی (FGF-2) زیر گروه ویژه‌ای از سلولهای بنیادی مزانشیمی با توان خود تجدیدی بالا را انتخاب می‌نماید. راه دیگر به دست آوردن سلولهای با طول عمر بیشتر این است که پیش از آغاز کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی در نمونه‌های مغز استخوان غنی سازی شود که برای این منظور چندین روش استفاده می‌شود که عبارتند از غنی سازی بر اساس اندازه سلولی، انتخاب براساس خاصیت plating و مارکرهای سطح سلولی [۲۸-۲۷]. البته باید خاطر نشان کرد که نتایج به دست آمده توسط روشهای فوق یکسان نبوده و قابل تکرار در آزمایشگاه‌های دیگر نمی‌باشد. گزارشها نشان داده است که سلولهای فیروبللاستی مشابه با سلولهای بنیادی مزانشیمی از مایعات بیولوژیکی نظیر خون محیطی افراد بزرگسال و جنین جدا شده است [۳۰-۲۹] و این نشان دهنده این است که سلولهای بنیادی مزانشیمی قادرند در محیط سوسپانسیون نیز رشد و تکثیر یابند [۳۱].

MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cells) نوعی سلول مزانشیمی نا بالغ محسوب شده و از طریق کشت مغزاستخوان در محیط حاوی فاکتورهای رشد ویژه از قبیل: فاکتور رشد

1. Epidermal growth factor

2. Platelet-derived Growth Factor

سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و چربی از لحاظ رشد، پیری و تمایز چند رده‌ای تفاوت‌های بسیار اندکی دارند. بنابراین می‌توان از سلولهای بنیادی مزانشیمی به‌دست آمده از بافت‌های مختلف در سلول درمانی استفاده کرد و اینکه چه نوعی مورد استفاده قرار گیرد بستگی به این دارد که کدام بافت قابل دسترس‌تر است [۴۱].

منشا مشترک سلولهای بنیادی مزانشیمی و خونساز

در سال ۱۹۹۵، هاس (Huss) و همکاران طی مطالعات خود دریافتند که سلولهای چسبیده - CD34 با مورفولوژی فیبروبلاستی قادرند به سلولهایی با ویژگیهای خونساز تمایز یابند. این محققین چنین استدلال کردند که در مغز استخوان سلول بنیادی مشترک خاموشی وجود دارد که فیبروبلاستی بوده و آنتی ژن CD34 را بیان نمی‌کند. این سلولها تحت شرایط ویژه قادرند آنتی ژن CD34 را بیان کنند و به سلولهای پروژنیاتور خونساز و مزانشیمی تبدیل شوند. همچنین این گروه محققین پیشنهاد کردند که طی این فرآیند ممکن است به‌طور معکوس برخی سلولهای فعال با توقف بیان CD34 به سلولهای بنیادی خاموش فیبروبلاستی تبدیل شوند [۴۶].

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که داربست مغز استخوان که جایگاه سلولهای بنیادی مزانشیمی چند توان غیر متعهد است، بافت‌های مزانشیمی در مناطق مختلف بدن را از لحاظ سلولهای پروژنیاتور مزانشیمی تغذیه می‌کند [۴۷]. برای این منظور سلولهای بنیادی مزانشیمی بایستی از مغز استخوان وارد خون محیطی شوند که تعاملهای سلول - سلول و سلول - ماتریکس بین سلولهای پروژنیاتور و عناصر استرومال این فرآیند را تسهیل می‌کند. در واقع می‌توان خون محیطی را به‌عنوان یک کمپارتمان موقتی برای سلولهای پروژنیاتور مزانشیمی و بافت‌های مزانشیمی در مناطق مختلف بدن را به‌عنوان جایگاه لانه‌گزینی، تکثیر و تمایز بیشتر در نظر گرفت [۳۸].

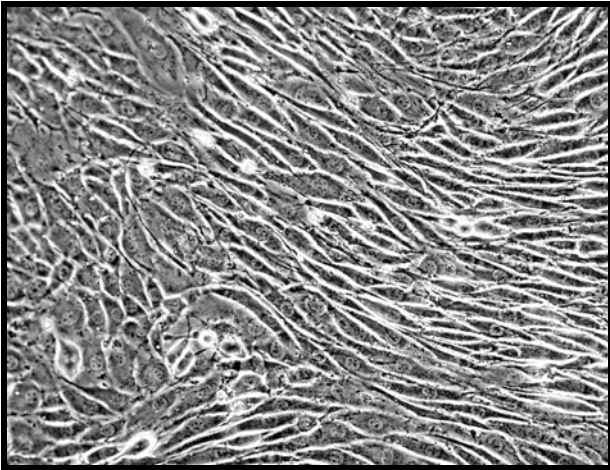
سلولها نیز بیان می‌شود و در نتیجه نمی‌توان از این آنتی ژنها در مطالعات *in vivo* نیز استفاده کرد و بنابراین مطالعه مکانیسمهای تکثیر، حرکت و لانه‌گزینی سلولها در بدن و سلولهای پیوند شده امکان‌پذیر نمی‌باشد.

البته باید توجه کرد که مارکرهای گفته شده در سلولهای بنیادی مزانشیمی انسان بیان می‌شود و برای گونه‌های حیوانی مارکری به‌عنوان مارکر منحصر به فرد گزارش نشده است. در همین ارتباط، مطالعه اخیر ما نشان داده است که در کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی موش بیان Thy 1.2 به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد [۲۱].

روی هم رفته می‌توان گفت که مطالعات انجام شده نشان دهنده این است که فنوتیپ آنتی‌ژنی سلولهای بنیادی مزانشیمی منحصر به فرد نبوده و این سلولها مخلوطی از ویژگیهای سلولهای مزانشیمی، اندوتلیالی، آپیتلیالی و عضلانی را دارا هستند. سلول بنیادی مزانشیمی، معمولاً آنتی ژنهای تیپیکال سلولهای خونساز یعنی CD45، CD34 و CD14 را بیان نمی‌کنند [۳۸].

سلولهای بنیادی مزانشیمی ویژه بافتی

علاوه بر مغز استخوان، سایر منابع حاوی سلولهای بنیادی مزانشیمی شامل بافت پریوست [۳۹]، استخوان تراپیکولار [۴۰]، بافت چربی [۴۱]، پرده سینیال [۴۲]، عضله اسکلتی [۴۳]، و دندان شیری [۴۴] است. سلولهای بنیادی مزانشیمی جدا شده از تمام موارد ذکر شده قابل تمایز به چندین رده سلولی هستند. برای مثال در سال ۲۰۰۱ باری (Bari) و همکاران نشان دادند که سلولهای بنیادی مزانشیمی جدا شده از پرده سینیوم پس از پیوند قادرند در بازسازی عضله موش *Nude* شرکت نمایند و در نتیجه پروتئین دیستروفین در غشای سلول عضلانی موش مبتلا به عضلات دیستروفیک بیان شد [۴۵]. همچنین سلولهای بنیادی جدا شده از بافت چربی نشان داده شده است که دارای توانایی مشابه با سلولهای بنیادی مزانشیمی پرده سینیوم هستند. مطالعات نشان داده است که



شکل ۱. مورفولوژی فیبروبلاستی سلولهای بنیادی مزانشیمی موشی [۲۲]

انعطاف‌پذیری (Plasticity) سلولهای بنیادی مزانشیمی

اخیراً تغییرات اساسی در مورد چگونگی بازسازی اندامها در افراد بزرگسال عنوان شده است، قبلاً عقیده بر این بود که تشکیل اندام و بازسازی آنها محدود به فعال شدن سلولهای بنیادی محدود به همان بافت یا اندام است به عنوان مثال سلولهای بنیادی خونساز مسئول سنتز سلولهای خونی بالغ و سلولهای بنیادی روده تنها به سلولهای بالغ روده تبدیل میشوند. ولی امروزه این مدل گسترش یافته و طی آزمایش‌هایی مشخص شده که مثلاً سلولهای بنیادی خونساز نه تنها قادر به ایجاد انواع سلولهای خونی بالغ هستند بلکه قادر به شرکت در ترمیم و اصلاح بافتی خون کبد یا مغز و کلیه نیز هستند. از این خصوصیت سلولهای مزانشیمی تحت عنوان انعطاف‌پذیری نام برده می‌شود. بطور خلاصه اصطلاح انعطاف‌پذیری یا plasticity به معنی توانایی سلولهای بنیادی برای عبور از سدهای دودمانی و پذیرفتن الگوهای بیان و فنوتیپهای کارکردی سلولها و بافتهای دیگر است. مکانیسمهای مختلفی برای plasticity سلولهای بنیادی ارائه شده است:

۱- سلولهای مزانشیمی بر خلاف تصور سلول پر توانی هستند و قادرند به اغلب سلولهای بدن تمایز یابند. ۲- سلول

سلولهای بنیادی مزانشیمی در محیط کشت

با مشاهده کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی توسط میکروسکوپ نوری و فاز کنتراست به راحتی می‌توان دریافت که این سلولها شبه فیبروبلاستی (شکل ۱) هستند [۴۸، ۲۲ و ۴۹]. مطالعات سیکل سلولی نشان داده است که بخش کوچکی (در حدود ۱۰٪) از جمعیت سلولی در محیط کشت در حال تکثیر بوده و در نتیجه در فاز S+G2+M هستند و قسمت اعظم سلولها در فاز G0/G1 به حالت خاموش هستند [۵۰]. سلولهای بنیادی مزانشیمی، پس از پاساژ از لحاظ تکثیری پتانسیلهای متغییری دارند. در بعضی مطالعات گزارش شده است که سلولهای بنیادی مزانشیمی تا ۱۵ دوبله شدن جمعیت تکثیر می‌شوند و در برخی دیگر اذعان شده که این سلولها پس از ۴ دوبله شدن جمعیتی از لحاظ تکثیر متوقف می‌شوند [۱۲، ۵۱ و ۵۲]. البته این تضاد در نتایج به دلیل چندین عامل می‌باشد که شاید مهمترین آنها روشهای مختلف جداسازی سلول در مطالعات مختلف است [۱۲ و ۵۳-۵۱]. از دیگر علل این تناقض گویی‌ها می‌توان به تفاوت در سن و شرایط فرد دهنده مغز استخوان و پایین بودن تعداد سلولهای بنیادی در نمونه‌های مغز استخوان اشاره کرد [۵۴ و ۵۵]. مطالعات نشان داده است که علیرغم پتانسیل بالای تکثیری، این سلولها کاربو تایپ نرمال و فعالیت تلومرازی طبیعی را از دست نمی‌دهند [۱۳] ولی با انجام پاساژهای متعدد سلولها دچار پدیده پیری می‌شوند [۱۲].

برخی گزارشها بیانگر آن است که سلول مزانشیمی و سلولهایی که از آنها در محیط کشت تمایز می‌یابند، آنتی ژن HLA-class II را بیان نمی‌کنند. این سلولها تنها میزان کمی مولکولهای Co-stimulatory را بیان می‌کنند. همچنین سلول مزانشیمی در محیط کشت، پاسخ تکثیری لنفوسیت را ایجاد نمی‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سلول مزانشیمی انسان احتمالاً ایمونوزن نیست [۵۶ و ۵۷].

سلولهای بنیادی حاصل نمی‌شود.

مطالعات نشان داده است که علاوه بر دو مدل مذکور، خود تجدیدی سلولهای بنیادی بافتی تحت تاثیر عوامل محیطی نیز است. در واقع دخالت محیط اطراف به عنوان عامل تعیین کننده تقسیم سلول بنیادی در نظر گرفته می‌شود. بر این اساس، در وضعیتهای محیطی خاص از قبیل آسیب یا صدمه، یک سلول بنیادی ممکن است دو سلول دختری ایجاد کند که تحت شرایط محیطی، یا به صورت سلولهای بنیادی باقی می‌مانند یا متمایز می‌شوند [۶۲].

تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی

از دهه ۱۹۶۰ میلادی ویژگی تمایزی سلولهای بنیادی مزانشیمی به چندین دودمان سلولی با مطالعه روی گونه‌های مختلف مورد ارزیابی و تحقیق قرار گرفته است. تحقیقات صورت گرفته نشان داده است که سلولهای مزانشیمی از منشاء مغز استخوان گونه‌های انسانی، سگ، خرگوش، رت و موش توانایی تبدیل به سلولهایی با نهایت تمایز یافتگی از قبیل استخوان [۵۱]، غضروف [۶۳]، تاندون [۶۴]، ماهیچه [۶۵]، بافت چربی [۶۶] و استرومای حمایت کننده سلولهای بنیادی خونساز [۶۶] را هم در شرایط *in vivo* و هم *in vitro* دارند. مطالعات نشان داده است که کولونیهای حاضر در کشت اولیه سلولهای مغز استخوان از لحاظ پتانسیل تمایز هتروژن هستند. به عنوان مثال پیتنگر Pittenger و همکارانش [۱۳] گزارش کردند که تنها یک سوم از کلنی‌های مشتق شده از سلولهای مغز استخوان به صورت پر توان بوده و توانایی تمایز به استخوان، غضروف و چربی را دارا هستند و مابقی کلونی‌ها از لحاظ تمایز دو ظرفیتی (استخوان و غضروف) و یک ظرفیتی (استخوان) هستند. روی هم رفته از نتایج تحقیقات صورت گرفته این طور برمی‌آید که سلولهای MSCs با منشاء کلونی، هتروژن می‌باشند [۶۷].

یک سؤال کلیدی در ارتباط با تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی این است که در چه زمانی سلول تصمیم به توقف

مزانشیمی قادر است تحت شرایط خاصی دچار تمایز زدایی شود و به عقب باز گردد و پس از آن به انواعی از سلولها تبدیل شود. ۳- این خاصیت سلول مزانشیمی که قادر است به انواعی از سلولهای بافتهای غیر مزانشیمی تمایز یابد در اثر ادغام سلولی اتفاق می‌افتد. بدین معنی که در زمان پیوند سلول مزانشیمی با یک سلول در محل پیوند ترکیب شده و سلول هیبرید با فنوتیپ دوگانه ایجاد می‌شود. هتروکاریون حاصل دارای یک هسته بزرگ که حاوی چندین هستک و یک دسته کروموزوم تتراپلوئیدی است می‌باشد. بدین وسیله الگوی بیان ژنی سلول بنیادی مزانشیمی تغییر می‌یابد. برای مثال: در محیط *in vitro* ادغام سلول فیبروبلاست با میوبلاست منجر به بیان mRNA ویژه ماهیچه‌ای توسط هسته‌های فیبروبلاستیده شده است [۵۹-۵۸].

خودتجدیدی سلولهای بنیادی مزانشیمی

از خصوصیات اصلی سلولهای بنیادی مزانشیمی خاصیت خودتجدیدی آنهاست. تکثیر یا خودتجدیدی، در واقع، توانایی سلولها در تولید کپی‌های یکسان از خود از طریق تقسیم میتوز در یک دوره زمانی مشخص (تمام دوره زندگی یک موجود زنده) است به صورتی که خصوصیات ژنتیکی و کاریوتایپی در سلولهای دختری عینا شبیه سلولهای مادری باقی می‌ماند.

خود تجدیدی سلولهای بنیادی از دو راه امکان پذیر است.

الف) تقسیم متقارن: بر طبق این مدل، حاصل تقسیم سلولهای بنیادی، دو سلول دختری مشابه با سلول مادری است سلولهای دختری با فراهم شدن شرایط مناسب، وارد مرحله تمایز می‌شوند [۶۰].

ب) تقسیم نامتقارن: در این نوع تقسیم هر سلول بنیادی به یک سلول بنیادی و یک سلول پروژنیاتور تقسیم می‌شود. سلول بنیادی حاصل از تقسیم، جمعیت سلولهای بنیادی را حفظ کرده و سلول پروژنیاتور، با فراهم شدن شرایط تمایز، متمایز می‌شود [۶۱]. بنابراین هیچ تغییری در تعداد کل

رسوب می‌کند [۵۱]. این ترکیبات با وجود اینکه در *In vitro* باعث تحریک و القاء تمایز به استخوان می‌گردند اما مانع از تمایز در شرایط *In vivo* می‌گردند [۷۰-۶۹]. این عامل باعث محدودیت در استفاده از این ترکیبات در ترمیم استخوان می‌شود. سلولهای بنیادی مزانشیمی در حضور ایزوبوتیل متیل گراتین به سلولهای چربی تبدیل می‌شوند که از واکنشهای مملو از قطرات چربی قابل مشاهده است.

ب) اتصال سلول به ماتریکس خارج سلولی

ماتریکس خارجی نقش مهمی در فعال کردن فاکتورهای رشد دارد. این ماتریکس از مواد آلی و غیرآلی از قبیل کلاژن نوع I و نمکهای کلسیم به فرم هیدروکسی آپاتیت، نمکهای منیزیم فلورید، فسفات و سترات تشکیل یافته است [۷۱] به‌عنوان مثال در *In vitro*، وقتی سلولهای بنیادی مزانشیمی روی ماتریکس حاوی کلاژن I کشت داده شود به سمت استخوان متمایز می‌شوند. این فرآیند مستلزم اتصال اینتگرین $\alpha 2\beta 1$ به کلاژن I است [۷۴-۷۳].

ج) هم‌کشتی با سلولهای دیگر

از عوامل دیگر در القای تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی، هم‌کشتی این سلولها با یک جمعیت متفاوت سلولی دیگر می‌باشد. به‌عنوان مثال کندروسیتها بر تمایز سلولهای مزانشیمی به سمت استخوان تأثیر مثبت دارد. محققین علت را در تولید سیگنالهای القا کننده تشکیل استخوان توسط کندروسیتها می‌دانند [۷۴].

سلول و ژن درمانی با استفاده از سلول بنیادی

مزانشیمی

در این ارتباط سه استراتژی مهم وجود دارد. استراتژی اول تزریق سلول مزانشیمی مستقیماً به محل آسیب دیده است. از این روش برای ضایعات استخوان و غضروف استفاده شده است. البته در مورد استخوان استفاده از سرامیک و سلول

تکثیر و ورود به مرحله تمایز می‌گیرد. در پاسخ به این سؤال اساسی، مدلی برای توضیح تنظیم تمایز سلول بنیادی بزرگسالان پیشنهاد شده است [۶۸]. در این مدل دو بخش مجزا برای سلول بنیادی مزانشیمی در نظر گرفته می‌شود. در کمپارتمنت اول که که کمپارتمنت سلول بنیادی نامیده می‌شود، سلولها خاموش بوده و رشد تا زمانی که که تحریک مناسبی (مثلاً فاکتور رشد) ایجاد نشده است، در مرحله G0/G1 باقی می‌ماند. با تحریک، سلولها دچار تقسیم غیر قرینه شده و سلولهای دختری حاصل، یکی کاملاً شبیه سلول مادری بوده و دیگری سلول پیش‌ساز (Precursor) با توان تمایز محدودتر می‌شود. سلولهای پیش‌ساز به صورت غیر قرینه تقسیم شده و سلولهای سه و دو ظرفیتی با مورفولوژی مشابه با سلولهای چند ظرفیتی حاصل می‌شوند. این سلولها هنوز متعلق به کمپارتمنت سلول بنیادی هستند. خروج از کمپارتمنت سلول بنیادی و متعهد شدن سلول زمانی اتفاق می‌افتد که سلولهای پیش‌ساز به صورت قرینه تقسیم می‌شوند و سلولهای تک ظرفیتی را می‌سازند. در واقع کمپارتمنت سلولهای متعهد شامل سلولهایی با توان تمایز به یک رده سلولی است.

عوامل مؤثر بر تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی

در شرایط آزمایشگاهی

الف) محرکهای شیمیایی

در درجه نخست، تمایز نیا‌های مزانشیمی به دودمانهای استخوان، غضروف و چربی تحت تأثیر محرکهای شیمیایی (از قبیل دگزامتازون، TGF β 3 و انسولین) است که با تغییراتی در مورفولوژی، تکثیر، بیان ژن و سیگنالهای مولکولی سلول همراه می‌شود. به‌عنوان مثال، وقتی سلولهای MSCs در حضور اسکوربیک اسید - ۲ - فسفات، B- گلیسروفسفات و دگزامتازون کشت می‌شوند، سلولها فنوتیپ استخوانی به خود گرفته و ماتریکس خارج سلولی از خود ترشح می‌کنند که در آن فسفات کلسیم به صورت کریستالهای هیدروکسی آپاتیت

به دلیل دارا بودن خاصیت خود تجدیدی و توان تمایز به بافتهای اسکلتی، منبع مناسبی برای استفاده در برخی استراتژیهای سلول و ژن درمانی محسوب می‌شوند. کارآیی این سلولها در درمان برخی از بیماریها به خوبی نشان داده شده است. همچنین تحقیقات پیشین انعطاف و شکل‌پذیری (plasticity) این سلولها را در تمایز به سلولهای عصبی، پوششی پوست، ریه، کبد، روده، کلیه و طحال به اثبات رسانده است. با وجود اهمیت سلولهای مزانشیمی در سلول درمانی هنوز شرایط لازم برای استفاده بالینی فراهم نشده است. مانع عمده در این زمینه به شرایط تکثیر آزمایشگاهی این سلولها بر می‌گردد. کم بودن تعداد سلولهای بنیادی مزانشیمی در نمونه‌های اخذ شده و نیاز سلول درمانی به تعداد زیاد سلول، کشت و تکثیر سلول مزانشیمی در محیط آزمایشگاه را اجتناب ناپذیر کرده است. متأسفانه در سیستمهای فعلی کشت، تکثیر سلول مزانشیمی شدیداً به سرم گاوی وابسته بوده و این امر سبب شده استفاده از این سلولها برای درمان بیماریهای انسان با خطر انتقال پاتوژنهای گاوی همراه باشد.

مزانشیمی بصورت توأم نتایج بهتری داشته است [۷۵-۷۶]. استراتژی دوم وارد کردن ژن پروتیین خاص در سلول مزانشیمی و تزریق آن به سیستم گردش خون است. این سلولها در مغز استخوان مستقر شده و پروتیین مورد نظر را ترشح می‌کنند. محققین با وارد کردن ژن فاکتور IX به داخل سلول مزانشیمی و تزریق آن به موش SCID، به مدت ۸ هفته ترشح آن فاکتور را مشاهده کردند [۷۷]. بالاخره استراتژی سوم تزریق سلول مزانشیمی به داخل گردش خون است. به طوری که سلولهای فوق در بافتهایی نظیر استخوان و غضروف و مغز و ریه مستقر شوند. در این ارتباط برخی محققین، سلول مزانشیمی موش طبیعی را به موشی که ژن کلاژن جهش یافته داشت، تزریق کردند و نتایج آنها نشان داد که سلولهای طبیعی جایگزین بیش از ۳۰ درصد سلولهای جهش یافته استخوانی شده است [۷۸]. امید می‌رود در آینده بتوان با این روش، بیماری استخوان سازی ناقص (Osteogenesis Imperfecta) را که نوعی بیماری ژنتیکی استخوان محسوب می‌شود درمان کرد.

سلولهای بنیادی مزانشیمی (MSC: Mesenchymal Stem Cell)

References

1. **Prockop DJ.** Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997; 276: 71-4.
2. **Ross R, Everett NB, Tyler R.** Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis *J Cell Biol* 1970; 44:645-54
3. **Moen JK.** The development of pure cultures of fibroblasts from single mononuclear cells. *J Exp Med* 1935; 61: 247-70
4. **Petrakis NL, Davis M, Lucia SP.** The in vivo differentiation of human leukocytes into histiocytes, fibroblasts and fat cells in subcutaneous diffusion chambers. *Blood* 1961; 17: 109-18
5. **Rangan SR.** Origin of the fibroblastic growths in chicken buffy coat macrophage cultures. *Exp Cell Res* 1967; 46: 477-87
6. **Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan N, Cerami. A** Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994; 1:71-81
7. **Friedenstein AJ, Petrakova KV.** Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J embryol Exp Morph.* 1966; 16: 381-90
8. **Friedenstein AJ Chailakhjan RK, Lalykina KS.** The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and

- spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
9. **Piersma, AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, Van Vliet E, Brakel-van Peer KM, Visser PJ.** Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol* 1985; 13: 237-43.
 10. **Owen M.** Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci* 1988; 3: 63-76
 11. **Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS.** The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
 12. **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 greatest potential to propagate and differentiate. *Brit J Haematol.* 1999; 107: 275-81.
 13. **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 248: 143-7
 14. **Murphy JM, Dixon K, Beck S, fabin D, Feldman A, Barry F.** Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arth Rheumat* 2002; 46: 704-13.
 15. **Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT.** Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clin Sci* 1998; 94: 549-55.
 16. **Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Piriea A.** The structure of human mesenchymal stem cells differentiated into cartilage in micro mass culture system. *Yakhteh* 2006; 8:162-71.
 17. **Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP.** Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997; 6:125-34.
 18. **Murphy M, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP.** Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arth Rheum* 2003; 48: 3464-74
 19. **Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, Bartel J, Smolian H, et al.** Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 2002; 307:321-7.
 20. **Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, et al.** Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Sur* 2002; 73: 1919-25.
 21. **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: 351-64.
 22. **Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M.** Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system: *Dev Growth Differ* 2006; 48, 361-70.
 23. **Martin I, Muraglia A, Campanile G, Cancedda R, Quarto R.** Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology* 1997; 138: 4456-62.
 24. **Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, et al.** Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res.* 2003; 287: 98-105.
 25. **Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM.** Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol.* 2002; 30:896-904.
 26. **Gronthose S, Simmons PJ.** The growth factor

- requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-derived conditions in vitro. *Blood* 1995; 85: 929-40.
27. **Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ.** Rapid Expansion of recycling stem cells in cultures of plastic –adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3213-8.
 28. **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.* 1991; 20: 530-41.
 29. **Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al.** Maini RN,. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2:477-88.
 30. **Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM.** Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first trimester fetal blood, liver , and bone marrow. *Blood* 2001; 98: 2396-402.
 31. **Baksh D, Davis JE, Zandstra PW.** Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol.* 2003; 31:723-32.
 32. **Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Dirk Keene C, Ortiz-Gonzalez XR, et al.** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-9.
 33. **Simmons PJ, Torok-Storb B.** Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78: 55-62.
 34. **Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE.** Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 1997; 21: 225-35.
 35. **Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J.** The monoclonal antibody SH-2 , raised against human mesenchymal stem cells , recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Bipch Biophys Res* 1999; 265: 134-9.
 36. **Cheifetz S, Bellon T, Cals C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, et al.** Endoglin is a component of the transforming growth factor –beta receptor system in human epithelial cells. *J Bio Chem* 1992; 267: 19027-30.
 37. **Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI.** Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992; 13:69-80.
 38. **Minguell JJ, Erices A, Conget P.** Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001; 226: 507-20.
 39. **Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reiholz GG, Conover CA, et al.** Combined effects of insulin-like growth factor1- and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal stem cells during chondrogenesis in vitro . *Osteoart Cart* 2003; 11: 55-64.
 40. **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.
 41. **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.
 42. **Wickham MQ, Erickson GR, Gimple JM, Vail TP, Guilak F.** Multipotent stromal cells derived from infrapatellar fat pad of knee. *Clin Ortho* 2003; 196-212.
 43. **Jankowsk RJ, Deasy BM, Huard J.** Muscle-derived stem cells. *Gene therapy* 2002; 9:642-7.

44. **Miura M, Grothos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robery PG, et al.** Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceed nation acad Sci USA*. 2003; 100: 5807-12.
45. **De bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP.** Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *J cell Biol* 2001; 44: 1928-42.
46. **Huss R, Hong DS, McSweeney PA, Hoy CA, Deeg HJ.** Differentiation of canine bone marrow cells with hematopoietic characteristic from an adherent stromal cell precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 748-52.
47. **Caplan AI.** The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994; 21: 429-35.
48. **Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kappor N, Meyers P, Chiareri D, et al.** Characterization of human bone marrow fibroblast colony forming cells (CFC-F) and their progeny. *Blood* 1980; 56: 289-301.
49. **Friedenstein ZJ, Gorskaja JF, Kulagina NN.** Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4: 267-74.
50. **Conget PA, Miguell JJ.** Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999; 181: 67-73.
51. **Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE.** Growth kinetics, Self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64: 278-94.
52. **Phinny DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Termain N, Prockop DJ.** Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 1999; 75: 424-36.
53. **Blazesk I, Delmas Marsalet B, Legras S, Marion S, Machover D, Misset JL.** Large scale recovery and characterization of stromal cell- associated primitive hematopoietic progenitor cells from filter-retained human bone marrow. *Bone marrow transplant* 1999; 23: 647-57.
54. **Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R, et al.** Bone marrow derived mesenchymal stem cells remained host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogenic transplantation in patient with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol* 1999; 27: 1675-81.
55. **Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Bacigalupo A, et al.** Stromal damages as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipient. *Exp Hematol* 1999; 27: 1460-6.
56. **Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, et al.** Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2003; 10: 228-41.
57. **Tse WT, Tang J, Jin O, Korsgren C, John KM, Kung AL, et al.** A new spectin-beta IV has a major truncated isoform that associate with promyelocytic leukemia protein nuclear bodies and nuclear matrix. *J Biol Chem* 2001; 276: 23974-85.
58. **Zech NH.** Adult stem cell Manipulation and possible clinical perspectives. *Reproduc Med Endocrinol* 2004; 2: 91-9.
59. **Orlic D, Hill JM, Arai AE.** Stem cells for myocardial regeneration. *Circulation Res* 2002; 91: 1092-102.
60. **Potten CS, Loffler M.** Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990; 110: 1001-20.
61. **Sherley JL, Stadler PB, Johnson DR.**