مقاله مروری

سلولهای بنیادی مزانشیمی: تاریخچه، جداسازی و زیست شناسی

محمدرضا 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 جدا سازی، مارکرهای سطحی، 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 انالین 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 ٤٦٤٤-١٩٣٩٥

E-mail: bagesla@yahoo.com

ولی مسئله حل نشد و تا مدتها موضوع مورد مطالعه محققـان بود [٦-٢].

سلولهای بنیادی مزانشیمی واقع در مغز استخوان بـرای اولـین بار توسط فردنـستین (Friedenstein) و پتراکـوا (Petrakova) در سال ١٩٦٦ شناسایی شد. این محققین در مطالعه‌ای سـلولهای پـیش سـاز اسـتخوان را از مغـز اسـتخوان مـوش صـحرایی استخراج و توصیف کردنـد [٧]. ولـی اولـین شـواهد قطعـی توسط فردنستین در اواسـط سـال ١٩٧٠ ارائـه شـد [٨]. ایـن محقق نمونه‌های مغز اسـتخوان را در یـک ظـرف پلاسـتیکی کشت داد و پس از ٤ ساعت یا بیشتر سلولهای غیر چسبنده را دور ریخت . در اصل این سلولهای دور ریخته شده سـلولهای بنیادی رده خونساز بود. او گزارش کرد که بخش کـوچکی از سلولهای چسبنده مغز استخوان از لحاظ ظاهر هتروژن بوده و بخشی که اتصالات محکمی با سطح دیش کشت برقرار کـرده دوکی شکل بوده و تجمعات دو تا چهار سلولی ایجـاد کـرده است. این تجمعات به مدت ٢-٤ روز خاموش باقی ماندنـد و پس از آن به سرعت تکثیر یافتند. این سلولها پـس از چنـدین بار پاساژ به صورت یکدست دوکی ظـاهر شـدند.. مهمتـرین ویژگی این سلولها، داشتن توانایی ایجاد کلونهایی شبیه بافـت استخوان و غضروف بود.

مشاهدات ابتدایی فردنستین، توسط چنـدین محقـق بـه ویـژه پیرسـما (Piersma) و همکـاران و اون (Owen) و همکـاران در طول سال ١٩٨٠ توسعه پیدا کرد(١٠-٩). این مطالعـات نـشان داد کـه سـلولهای جـدا شـده بـا روش فردنـستین در اصـل سلولهای چند تـوان بـوده و قادرنـد بـه رده‌هـای اسـتخوانی، غضروفی، چربی و حتی عضلانی متمـایز شـوند. نکتـه ای‌کـه جالب توجه اسـت ایـن اسـت کـه فردنـستین نـشان داد کـه سلولهای بنیادی مزانشیمی حتی پـس از ٢٠-٣٠ بـار دو برابـر 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 [١١].

جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمی

سلولهای بنیادی مزانشیمی معمولا از نمونه‌های مغز اسـتخوان جمع آوری شده از کرست ایلیاک لگن و یا استخوانهای تیبیـا و فمور جدا سازی می‌شود [١٦-١٢]. در حیوانات بزرگتر نیـز مغز استخوان معمولا از جاهای مشابه با آنچه که بـرای انـسان گفته شد تهیه می‌شود [٢٠-١٧] ولی در جونـدگان، از بخـش دیافیز استخوانهای تیبیا و فمور جمع آوری می‌شود [٢٢-٢١]. سلولهای بنیادی مزانشیمی با وجـودی‌کـه بخـش کـوچکی از سلولهای هسته دار مغز استخوان را تشکیل می‌دهد، به‌راحتـی با روشهای استاندارد کـشت سـلول قابـل اسـتخراج و تکثیـر هـستند.بـرای ایـن منظـور، معمـولاً سـلولهای تـک هـسته‌ای نمونه‌های مغز استخوان با روش سانتریفوژ گرادیان جدا شـده و با تراکم ١٠٤×١ یا ١٠٦ ×٠/٤، در محیط کـشت پایـه نظیـر DMEM[1] حاوی ١٠درصد سرم جنین گاوی کشت مـی‌شـوند. سلولهای بنیادی مزانشیمی در کشت مورفولوژی فیبروبلاسـتی داشته و به سطح ظرف کشت متـصل مـی‌شـود. کـشت اولیـه معمولا ١٦-١٢ روز نگهداری می‌شـود و در طـی ایـن مـدت سلولهای غیر چسبنده خونساز حذف می‌شود. مطالعات نـشان می‌دهـد کـه افـزودن فاکتورهـای رشـد نظیـر FGF-2[2] سـبب جداسازی سلولهایی با پتانـسیل اسـتئوژنیک بیـشتر مـی‌شـود [٢٣]. چنـین سـلولهایی تلـومر طـویلی داشـته و در نتیجـه سلولهای نابالغی محسوب می‌شوند [٢٤]. عامل مهمی کـه بـر تکثیر اپتیمال سلولهای بنیادی مزانشیمی تاثیر می‌گـذارد، نـوع سرم گاوی مورد استفاده است. بـرای ایـن منظـور بایـد سـرم مورد استفاده طوری انتخاب شود که حداکثر تاثیرات تکثیـری را داشته باشد. نکته دیگر این است که چنانچه سـلول انـسانی به منظور پیوند درمانی کشت مـی‌شـود، محـیط کـشت مـورد استفاده کاملا تعریف شده بوده و کمترین میزان سرم گاوی را

1. Dulbecco's Modified Eagle Medium
2. Fibroblast Growth factor-2

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

زمانی‌که سلول بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش استاندارد (برای مثال محیط DMEM و سرم جنین گاوی) جدا سازی می‌شوند تا ٤٠ 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 [٢٦-٢٤]. این موضوع نشان می‌دهد که فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF-2) زیر گروه ویژه‌ای‌از سلولهای بنیادی مزانشیمی با توان خود تجدیدی بالا را انتخاب می‌نماید. راه دیگر به‌دست 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 به‌دست آمده توسط روشهای فوق یکسان نبوده و قابل تکرار در آزمایشگاه‌های دیگر نمی‌باشد. گزارشها نشان داده است که سلولهای فیبروبلاستی 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 درمحیط حاوی فاکتورهای رشد ویژه از قبیل: فاکتور رشد اپیدرمی۱ و فاکتور رشد مشتق شده از پلاکتها۲ به‌دست 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 ویژهٔ سلولهای رده خونساز نظیر C-kit , sca-1 یا CD45 را بیان نمی‌کنندو 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 به‌حال 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 [٣٤]. 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 آنتی‌بادی در انتخاب ایمنی ـ مغناطیسی سلولهای بنیادی مزانشیمی انسانی استفاده می‌شود. البته باید توجه کرد که CD105 در سلولهای اندوتلیال نیز وجود دارد [٣٦]. 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

1. Epidermal growth factor
2. Platelate-drived Growth Factor

سلولها نیز بیان می‌شود و در نتیجه نمی‌توان از این انتی ژنها در مطالعات in vivo نیز استفاده کرد و بنابراین مطالعه مکانیسمهای تکثیر، حرکت و لانه گزینی 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 به عنوان 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، معمولا 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 ترابکولار [۴۰]، بافت چربی [۴۱]، پرده سینویال [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 سینویوم 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 سینوویوم هستند. مطالعات نشان داده است که 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

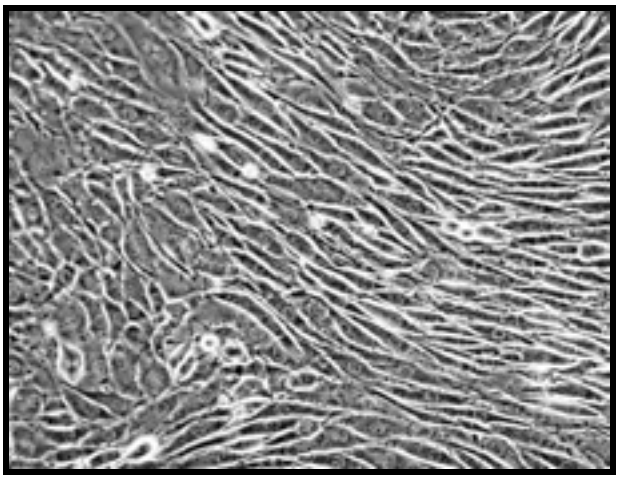
در سال ۱۹۹۵، هاس(Huss) و همکاران طی مطالعات خود دریافتند که سلولهای چسبنده – CD34 با مورفولوژی فیبروبلاستی قادرند به سلولهایی با ویژگیهای خونساز تمایز یابند. این محققین چنین استدلال کردند که در مغز استخوان سلول بنیادی مشترک خاموشی وجود دارد که فیبروبلاستی بوده و آنتی ژن CD34 را بیان نمی‌کند. این سلولها تحت شرایط ویژه قادرند آنتی ژن CD34 را بیان کنند و به سلولهای پروژنیتور 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 پروژنیتور مزانشیمی تغذیه می‌کند [۴۷]. برای این منظور سلولهای بنیادی مزانشیمی بایستی از مغز استخوان وارد خون محیطی شوند که تعاملهای سلول ـ سلول و سلول ـ ماتریکس بین سلولهای پروژنیتور و عناصر استرومال این فرآیند را تسهیل می‌کند. در واقع می‌توان خون محیطی را به‌عنوان یک کمپارتمان موقتی برای سلولهای پروژنیتور مزانشیمی و بافتهای مزانشیمی در مناطق مختلف بدن را به عنوان جایگاه لانه گزینی، تکثیر و تمایز بیشتر در نظر گرفت [۳۸].

سلولهای بنیادی مزانشیمی در محیط کشت

با مشاهده کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی توسط میکروسکوپ نوری و فاز کنتراست به‌راحتی می‌توان دریافت که این سلولها شبه فیبروبلاستی(شکل ۱) هستند [۲۲،۴۸و۴۹]. 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 ٤ دوبله شدن جمعیتی از لحاظ تکثیر متوقف می‌شوند [۱۲، ۵۱و۵۲]. البته این تضاد در نتایج به‌دلیل چندین عامل می‌باشد که شاید مهمترین آنها روشهای مختلف جداسازی سلول در مطالعات مختلف است [۱۲و۵۳-۵۱]. 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 [٥٤و٥٥]. مطالعات نشان داده است که علیرغم پتانسیل بالای تکثیری، این سلولها کاریو 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 احتمالا ایمونوژن نیست [٥٦و٥٧].



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، قبلا 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 مثال‌سلولهای بنیادی خونساز مسئول سنتز سلولهای خونی بالغ و سلولهای بنیادی روده تنها به سلولهای بالغ روده‌تبدیل میشوند. ولی امروزه این مدل گسترش یافته و طی آزمایش‌هایی مشخص شده که مثلا سلولهای بنیادی خونساز نه‌تنها 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 انعطاف پذیری نام برده می‌شود. بطور خلاصه اصطلاح انعطاف پذیری 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 ارایه شده است :

۱- سلولهای مزانشیمی بر خلاف تصور سلول پر توانی هستند و قادر ند به اغلب سلولهای بدن تمایز یابد.۲- سلول

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 وسلول هیبرید با فنوتیپ دوگانه ایجاد می‌شود. هتروکاریون حاصل دارای یک هسته بزرگ که حاوی چندین هستک و یک دسته کروموزوم تتراپلوئیدی است می‌باشد. بدین‌وسیله 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 پروژنیتور تقسیم می‌شود. سلول بنیادی حاصل از تقسیم، جمعیت سلولهای بنیادی را حفظ کرده و سلول پروژنیتور، با فراهم شدن شرایط تمایز، متمایز می‌شود [۶۱]. بنابراین هیچ تغییری در تعداد کل 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 مغزاستخوان 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 ازسلولهای 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

تکثیر و ورود به مرحله تمایز می‌گیرد. در پاسخ به این سئوال 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 کمپاتمنت اول که که کمپارتمنت سلول بنیادی نامیده می‌شود، سلولها خاموش بوده و رشد تا زمانی‌که که تحریک مناسبی (مثلا فاکتور رشد) ایجاد نشده است، در مرحله G0/G1 باقی می‌ماند. با تحریک، سلولها دچار تقسیم غیر قرینه شده و سلولهای دختری حاصل، یکی کاملا شبیه سلول مادری بوده و دیگری سلول پیش‌ساز (Precursor) با توان تمایز محدودتر می‌شود. سلولهای پیش ساز به صورت غیر قرینه تقسیم شده و سلولهای سه و دو ظرفیتی با مورفولوژی مشابه با سلولهای چند ظرفیتی حاصل می‌شود.این سلولها هنوز متعلق به کمپارتمنت سلول بنیادی هستند. خروج از کمپارتمنت سلول بنیادی و متعهد شدن سلول زمانی اتفاق می‌افتد که سلولهای پیش ساز 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، TGFB3 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 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 گزانتین به سلولهای چربی تبدیل می‌شوند که از واکوئلهای 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 سیترات 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 α2β1 به کلاژن I است [۷۴-۷۳].

ج) هم کشتی با سلولهای دیگر

از عوامل دیگر در القای تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی، هم کشتی 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 مستقیما 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

مزانشیمی بصورت توام نتایج بهتری داشته است [۷۶-۷۵]. 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 به‌داخل 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 به‌داخل گردش خون است. به‌طوری‌که 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 ۳۰درصد 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) به‌دلیل 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 شدیدا 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.

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: engrafment 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 condisions 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,. Mesenchyamal precursor cells in the blood of normal individuals. Artheritis 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.** Idetification 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 , rasied 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, Gimble 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 decidusus 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 engrafment 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. Repoduc 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.**

Expnession of the wild-type P53 antioncogene induces guanine nucleotide-dependent stem cell division kinetics .Proc Natl Acad sci USA 1995; 2: 136-40.

62. **Fuchs E, Segne JA.** stem cells: a new Lease on life. Cell 2000; 100: 143-55.
63. **Kadiyala S, Young RG. Thiede MA, Bruder SP.** Culture expanded canine mesenchymalstem cells possess osteochon drogenic potential in vivo and in vitro. Cell Transplant 1997; 6:125-34.
64. **Young RG, Butler DL,Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ.** Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. J Orthop Res 1998; 16:406-13.
65. **Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P.** Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. Blood 1993; 1; 82: 66-76.
66. **Prockop DJ.** Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 1997; 276:71-4.
67. **Muraglia A , Cancedda R , Auarto R.** Clonal Mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model . Journal Cell Sci 2003; 113: 1161-6.
68. **Baksh D, Song L, Tuan RS.** Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med 2004; 3: 301-6.
69. **Cheng SL, Lai CF, Fausto A, Chellaiah M, Feng X, McHugh KP, et al.** Regulation of alphaVbeta3 and alphaVbeta5 integrins by dexamethasone in normal human osteoblastic cells. J Cell Biochem 2000; 77: 265-76.
70. **Ng PC, Lam CW, Wong GW, Lee CH, Cheng PS, Fok TF, et al.** Changes in markers of bone metabolism during dexamethasone treatment for chronic lung disease in preterm infants. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2002; 86: F49-F54.
71. **Hellimch C, Ulm FJ.** Average hydroxyapatite concentration is uniform in the extracollagenous ultra structure of mineralized tissues : Evidence at 1-10-microm scale. Biomech Model Mechanobiol 2003; 2: 21-36.
72. **Mizuno M, Kuboki Y.** Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. J Biochem 2001; 129: 133-8.
73. **Xiao G, Wang D, Benson MD, Karsenty G, Franceschi RT.** Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor.J Biol Chem. 1998; 273: 32988-94.
74. **Gerstenfeld LC, Barnes GL, Shea CM, Einhorn TA.** Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment. Connect Tissue Res 2003; 44: 85-91.
75. **Caplan AI.** Stem cell delivery vehicle. Biomaterials 1990; 4: 44-6.
76. **Caplan AI.** Biological resurfacing: an alternative to total joint arthroplasty. Orthopedics 1994; 17: 819-21.
77. **Guinn B, Wang X-H, Laraya A, Keating A.** Human marrow sromal cells electrotransfected with human FIX cDNA engraft in SCID mice and transcribe human factor IX. Exp Hematol 1996; 88: 3921(Abstract)
78. **Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, et al.** Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice Proc NATL Acad Sci USA 1996; 92: 4857-61.