مقـالـه

سلولهای بنیادی مزانشیمی انسان و کاربردهای درمانی آن

بهشاد پورنصر خاکباز .M.Sc*، ✐حسین بهاروند.Ph.D*

* گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: اردیبهشت‌ماه ۸۶ ، تاریخ پذیرش: خردادماه ۸۶

چکیده

سلولهای بنیادی از لحاظ منشاء به دو دسته عمده سلولهای بنیادی جنینی و سلولهای بنیادی بزرگسالان تقسیم می‌شوند. از مهمترین سلولهای بنیادی بزرگسالان که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است می‌توان به سلولهای بنیادی مزانشیم اشاره کرد. سلولهای بنیادی مزانشیم در ترمیم بافتهایی با منشاء مزانشیمی مثل استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی شرکت می‌کنند و البته این سلولها به عنوان سلولهای حمایت کننده برای سلولهای هماتوپویتیک در مغز استخوان نیز هستند. در دسترس‌ترین منبعی که برای استفاده از این سلولها پیشنهاد می‌شود همان مغز استخوان است اگرچه این سلولها از منابع دیگری مثل خون نوزادان، خون بند ناف و مایع آمینیوتیک نیز قابل جداسازی هستند. این سلولها ۰/۰۰۱ تا ۰/۱ درصد از جمعیت سلولهای هسته‌دار مغز استخوان انسان را تشکیل می‌دهند، اما جالب این است که توانایی ازدیاد و تکثیر در محیط آزمایشگاهی به صورت سلولهای چسبنده شبه فیبروبلاستی به کف ظروف پلاستیکی را به خوبی نشان می‌دهند.

تاکنون برای این سلولها نشانگر خاصی به دست نیامده است ولی این سلولها فاقد نشانگرهای هماتوپویتیک CD34، CD45، CD14 و همچنین فاقد نشانگرهای اندوتلیال CD34، CD31، VWF (فاکتور ون- ویلبراند) هستند و تعداد وسیعی از مولکولهای چسبنده CD44، CD29، CD90 و شاخصهای سلولهای استرومایی SH-2، SH-3، SH-4 و گیرنده‌های سایتوکاینی مثل گیرنده انترلوکین ۱ (IL1-R) و گیرنده TNF را هم بیان می‌کنند. سلولهای بنیادی مزانشیمی توانایی تبدیل شدن به سلولهایی از رده‌های مختلف را در شرایط آزمایشگاه نشان داده‌اند. جداسازی و تکثیر به نسبت راحت و اتولوگ بودن سلولهای مزانشیم آنها را کاندید مناسب برای سلول‌درمانی ساخته است. منتها به دلیل میزان پایین این سلولها در مغز استخوان و همچنین نیاز به عوامل تکمیل کننده با منشاء حیوانی برای تکثیر این سلولها (سرمهای گاوی) به تعداد زیاد، کار را برای استفاده در مطالعات بالینی مشکل کرده است، اما پژوهشها و راهکارها به سمت و سوی ایجاد شرایط بهینه برای استفاده از این سلولها با حذف سرم از محیط کشت آنها و تکثیر به میزان بالای آنها با استفاده از بیوراکتورها است.

در این مقاله سعی بر این است تا در ابتدا با زیست‌شناسی سلولهای مزانشیم آشنا شوید و در ادامه ویژگیهای ایمونولوژیک، کاربرد سلولهای مزانشیم در ترمیم و کاربردهای کلینیک آنها ارایه می‌شود و در نهایت روشهای جداسازی این سلولها ارایه شده است.

کلیدواژه‌ها: سلولهای بنیادی مزانشیم، مغز استخوان، کشت سلول، سول درمانی، پیوند

✐آدرس مکاتبه: تهران،، پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی، صندوق پستی: ٤٦٤٤-۱۹۳۹۵

E-mail: Baharvand50@yahoo.com

زیست‌شناسی سلولهای مزانشیمی

سلولهای بنیادی مزانشیم

سلولهای بنیادی از لحاظ منشاء به دو دسته عمده سلولهای بنیادی جنینی و سلولهای بنیادی بزرگسالان تقسیم می‌شوند. از مهمترین سلولهای بنیادی بزرگسالان که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است، می‌توان به سلولهای بنیادی مزانشیم اشاره کرد. سلولهای بنیادی مزانشیم در ترمیم بافتهایی با منشاء مزانشیمی مثل استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی شرکت می‌کنند و البته این سلولها به عنوان سلولهای حمایت‌کننده برای سلولهای هماتوپویتیک در مغز استخوان نیز هستند. این سلولها برای اولین بار توسط فریدن اشتاین (Friedenstein) و پتراکووا (Petrakova) از مغز استخوان رت به دست آمدند [۱]. در دسترس‌ترین منبعی که برای استفاده از این سلولها پیشنهاد می‌شود همان مغز استخوان است گرچه این سلولها از منابع دیگری مثل کبد، خون نوزادان، خون بند ناف و مایع آمینیوتیک نیز قابل جداسازی هستند. این سلولها ۰/۰۰۱ تا ۰/۱ درصد از جمعیت سلولهای هسته‌دار مغز استخوان انسان را تشکیل می‌دهند، از استخوان ایلیاک کرست[1] جدا شده و قابلیت جدا سازی از استخوانهای فمور[2] و تیبیال[3] را هم دارند و جالب اینکه توانایی ازدیاد و تکثیر در محیط آزمایشگاهی را به خوبی نشان داده‌اند.

سلولهای بنیادی مزانشیم که به عنوان سلولهای زمینه‌ای مغز استخوان و یا سلولهای پیش‌ساز مزانشیم هم شناخته شده‌اند، سلولهایی با قابلیت تکثیر و پرتوان هستند که قابلیت تمایز به انواع مختلفی از سلولهای رده مزانشیمی را دارند و از آنها به عنوان سلولهای بنیادی بزرگسال نام برده می‌شود. در مطالعات مختلف این سلولها را با نامهای متفاوت به کار برده‌اند که در حقیقت همگی همان سلولهای بنیادی مزانشیم هستند (جدول ۱) [۲].

جدول ۱. مثالهایی از نامهای مختلفی که در مطالعات مختلف به این سلولها داده شده است

نام	تعریف
Precursor of non-hematopoetic tissue	سلولهای چسبنده مغز استخوان: شامل سلولهای شبه فیبروبلاست، سلولهای اندوتلیال و مونوسیت/ماکروفاژها است
Colony forming unit –fibroblast (CFU)	کلونیهای سلولهای فیبروبلاستی با حضور معمول سلولهای مونوسیت و ماکروفاژ
Mesenchymal Stem Cells (MSCs)	سلولهایی که با خاصیت چسبندگیشان به سطوح جامد شناخته می‌شوند
Marrow Stromal Cells	سلولهای چسبنده مغز استخوان که شامل سلولهای شبه فیبروبلاست، سلولهای اندوتلیال و کلونیهای مونوسیت/ماکروفاژ است
Bone marrow stromal (Stem) cells (BMSSCs) and/or Stromal progenitor cells (SPCs)	سلولهای غیر هماتوپویتیکی با منشاء مزانشیمی، که از نظر ریخت‌شناسی شبیه سلولهای فیبروبلاست هستند
mMSCs (RS: Recycling stem cell)(m:mature)،RS-2،RS-1	RS-1: سلولهای دوکی شکل نازک RS-2: سلولهای دوکی شکل تقریبا نازک mMSCs : سلولهای دوکی شکل پهن‌تر
Multipotent adult progenitor cells (MAPCs)	سلولهای پیش‌ساز مشتق از مغز استخوان کشت داده شده

اولین جداسازی موفقیت‌آمیز این سلولها حدود ٤ دهه پیش در سال ۱۹٦٦ توسط فریدن اشتاین و همکارانش انجام گرفته

1- Iliac Crest
2- Femur
3- Tibial

است. آنها توانستند سلولهای پیش‌ساز غضروف و استخوان را که شبیه سلولهای فیبروبلاست بودند از مغز استخوان رت جدا و در محیط آزمایشگاه رشد دهند [۱]، این جداسازی بر اساس خاصیت چسبندگی سلولهای مزانشیمی به ظروف کشت، برخلاف عدم چسبندگی سلولهای هماتوپوئتیک، صورت پذیرفت که در حقیقت این روش جداسازی تا به امروز به عنوان روش استاندارد برای جدا کردن سلولهای بنیادی مزانشیم از مغز استخوان شناخته شده و استفاده می‌شود [۳]. جداسازی و تعیین هویت و بررسی ویژگیهای این سلولها در تعدادی از مهره‌داران مثل انسان [٤-٦]، موش [۷-۹]، سگ [۱۰]، خرگوش [۱۱]، گوسفند [۱۲]، مرغ [۱۳]، خوک [١٤]، اسب [۱۵] و گاو [١٦] به خوبی صورت گرفته است. کلونیهای سلولهای مزانشیم که به این روش به دست می‌آیند کلونیهای غیریکنواختی خواهند بود که احتمالا حاوی سلولهای استئوبلاست و سلولهای پیش‌ساز استخوان، سلولهای چربی، فیبروبلاست‌ها، سلولهای رتیکولار، ماکروفاژها، سلولهای اندوتلیال و حتی جزئی از سلولهای خونی و سلولهای بنیادی هماتوپوئتیک نیز هستند. بنابراین در حقیقت این سلولهای چسبیده به ظرف، اگر توانایی تمایز به سلولهای استخوانی و غضروفی را در محیط آزمایشگاه نشان دهند ، به عنوان سلولهای مزانشیم شناخته خواهند شد [۱۷].

سلولهای بنیادی مزانشیم انسانی در حقیقت سلولهایی هستند که بر اساس تعریف انجمن بین‌المللی سلول درمانی (ISCT: International Society for Cellular Therapy) دارای سه ویژگی زیر باشند:

۱- در شرایط کشت معمولی در ظروف کشت پلاستیکی به کف ظرف بچسبند؛

۲- شاخصهای سطحی CD105، CD73 و CD90 را بیان کنند و نسبت به بیان شاخصهای هماتوپوئتیک بالاخص CD45، CD34 و سایر شاخصها از قبیل CD14، CD11b، CD79، CD19 و HLA-DR منفی باشند؛

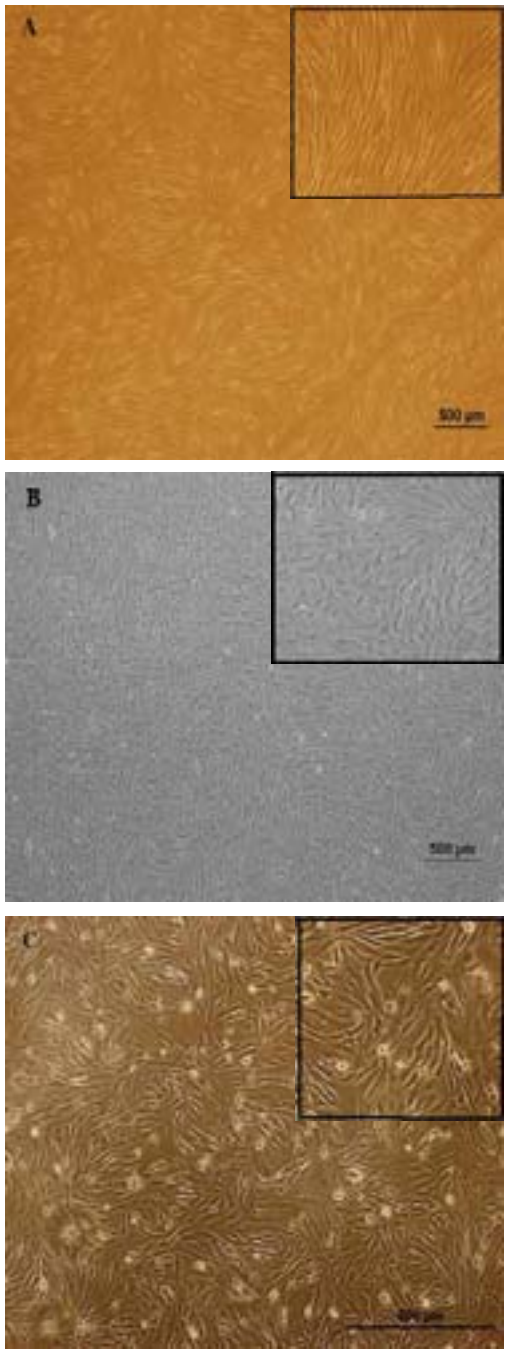
۳- می‌بایست توانایی تمایز به سلولهای چربی، غضروف و استخوان را در شرایط آزمایشگاهی داشته باشند [۱۸].

این سلولها از نمونه‌های مغز استخوان با قابلیت چسبندگی خود به ظروف کشت جدا می‌گردند و در محیط کشت 1 DMEM دارای گلوگز اندک که با FBS ۱۰2٪ و ال-گلوتامین تکمیل شده است، بر طبق روش کار استاندارد کشت داده می‌شوند که در این حالت جمعیت آنها در زیر میکروسکوپ نوری به صورت سلولهای تک لایه شبیه سلولهای فیبروبلاست دیده می‌شوند. سلولهای مزانشیمی با روشهای مختلفی در محیطهای کشتی که حاوی سرم گاوی یا انسانی است کشت و گسترش داده می‌شوند. اما طی پاساژهای مختلف است که این سلولها به یک جمعیت یکنواخت از لحاظ چسبندگی به ظرف و از لحاظ ریخت‌شناختی (سلولهای دوکی شکل) می‌رسند (شکل ۱). از آنجایی که میزان این سلولها در مغز استخوان بسیار پایین است و تاکنون شاخص خاصی برای جداسازی این سلولها ارایه نشده است بنابراین جداسازی آنها تنها منحصر به جداسازیشان از طریق کشت شده است [۱۷].

با وجود این تفاوتها در شرایط کشت، پتانسیل غیریکنواخت بودن سلولهای بنیادی و بیان نشانگرهایی مثل HLA-DR، گروهی بنام پروکاپ (Prockop) مطالعات و مشاهدات جالبی از زیست شناختی این سلولها گزارش کرده‌اند. آنها نشان داده‌اند که مهار مسیر پیام رسانی به سلول از طریق پروتئین Wnt ۳ با به کار بردن مولکول آنتاگونیست آن Dkk-1 ٤ منجر به ورود این سلولها به چرخه سلولی و مهار مسیر تمایزی به

1- Dulbeco's Modified Eagle's Medium
2- Fetal Bovine Serum
3- Wingless
4- Dickkopf-1

سمت سلولهای استخوانی می‌شود و اخیرا نشان داده‌اند که استفاده از کلرید لیتیوم و آنتاگونیست‌های پپتیدی مولکول فوق (Dkk-1) در تنظیم تکثیر و تمایز این سلولها در درمان شکستگیها بسیار مناسب و مفید است [۱۹و۲۰].



شکل ۱. سلولهای مزانشیم مشتق از مغز استخوان A: سلولهای انسانی (پورنصر و بهاروند) B: سلولهای میمونی (نعمتی و بهاروند) و : سلولهای موشی (هاشمی و بهاروند)

کنام[1] سلولهای مزانشیم

کنام یک سلول در حقیقت مجموعه‌ای از عوامل فیزیکی و شیمیایی است که سلول را احاطه می‌کنند. در حقیقت می‌توان از کنام به عنوان ابرحجم چندبعدی که سلول را احاطه کرده است نام برد. اینکه چه عواملی کنام سلولهای مزانشیم را تشکیل می‌دهند، یکی از مباحثی است که تحقیق در این زمینه را جذاب‌تر می‌کند. البته پرواضح است که کنام مشخصی در مغز استخوان وجود دارد که در حقیقت بقای سلولهای هماتوپوئتیک را از طریق رهاسازی فاکتورهای متعدد و ایجاد شرایط چسبندگی برای آنها فراهم می‌نماید. به نظر می‌رسد که این کنام در حقیقت از سلولهای پیش‌ساز استخوان تشکیل شده باشد [۲۱]. استروما و سلولهای استرومایی همچنان که یک مکان فیزیکی را برای بلوغ سلولهای خونی فراهم می‌نمایند، طیف وسیعی از ترشحات و سیگنالهایی از سلولهای مختلف را دارند که برای متعهد شدن، تمایز و بلوغ سلولهای هماتوپوئیتیک مورد نیاز است [۲۲]، به ویژه سلولهای اندوتلیال، سلولهای چربی، ماکروفاژها، سلولهای رتیکولار، فیبروبلاست‌ها، سلولهای پیش‌ساز استخوان، سلولهای هماتوپوئیتیک و سلولهای مشتق از آنها هستند که این فضای فیزیکی مغز استخوان را تشکیل می‌دهند [۲۳]. در حقیقت این فضایی است که در مغز استخوان برای سلولهای مزانشیم فرض می‌شود. سوالی که در این مورد مطرح می‌شود این است که خود این سلولهای مزانشیم از همان کنامی که خود برای سلولهای هماتوپوئتیک می‌سازند، تاثیر می‌گیرند یا از کنامی که سلولهای هماتوپوئتیک برای آنها ایجاد می‌کنند؟ البته می‌توان این گونه فرض کرد که در حقیقت این دو رده سلولی (سلولهای مزانشیم و سلولهای هماتوپویتیک) در تعامل متقابل با هم یک کنام ویژه می‌سازند که هر دوی آنها از آن و از

یکدیگر تاثیر می‌گیرند. لازم به ذکر است که سیگنال‌های درون سلولی و خارج سلولی که این دو رده سلولی در طی تکامل خود دریافت می‌کنند کاملا متفاوت است. بنابراین شناخت هر چه بهتر این کنام شرایط کشت و گسترش بهتر سلولهای مزانشیمی را در محیط آزمایشگاه برای ما فراهم می‌سازد. البته باید توجه داشت از آنجایی که سلولهای مزانشیم از منابع مختلفی غیر از مغز استخوان مثل استخوانهای ترابکولار ، بافتهای چربی، کبد، سینوویوم ، عضلات اسکلتی ، ششها و دندانهای شیری [۲٤] و حتی بافت ژل وارتون[۲] بند ناف [۲۵] هم قابل دست‌یابی هستند، کنام سلولهای مزانشیم مختص به مغز استخوان نخواهد بود و در بافتهای مختلف کنام‌های متفاوتی را تجربه می‌کنند یا شاید اینکه سلولهای مزانشیم در جاهای مختلف بدن هم کنام‌های یکسانی را تجربه نمایند [۲].

جداسازی و تعیین هویت سلولهای مزانشیم

به دنبال روش ارایه شده توسط فریدن اشتاین و همکارانش [۱] ، راهکارهای دیگری که جمعیت یکنواخت‌تری از سلولهای مزانشیم را در اختیار ما قرار می‌دهد ابداع شده‌اند. به دلیل اینکه سلولهای مزانشیم فاقد نشانگر اختصاصی هستند، اغلب راه‌کارها بر پایه انتخاب منفی عمل می‌کنند یعنی در حقیقت سلولهایی که فاقد نشانگرهای اندوتلیال و هماتوپوئتیک هستند جدا شده و در کشت اولیه به کار می‌روند تا به یک جمعیت یکنواخت از سلولهای مزانشیم دست پیدا کنیم. در مقایسه با انواع سلولهایی که معمولا دارای نشانگرهای ویژه سطحی هستند مثلا سلولهای هماتوپوئتیک که حاوی نشانگرهای سطحی CD14، CD34، CD45 هستند [٤ و ۲٦] یا سلولهای اندوتلیال که دارای نشانگر CD31 هستند [۲۷]، و این ویژگی جداسازی آنها را تا حدودی راحت‌تر می‌سازد، تشخیص فنوتیپیک سلولهای مزانشیم منحصر به فرد نیست و دارای ویژگیها و نشانگرهای مشترک با سلولهای هماتوپوئتیک، اندوتلیال، اپی‌تلیال و سلولهای ماهیچه‌ای هستند که در حقیقت تشخیص اختصاصی و قطعی آنها را غیر ممکن می‌سازد [۱۷].

تاکنون برای سلولهای مزانشیمی نشانگر خاصی به دست

جدول ۲. بیان نشانگرها در سلولهای مزانشیم مغز استخوان (برگرفته از منبع [۱۷])

ویژگیهای ریخت‌شناسی و فیزیکی
سلولهای دوکی شکل و چسبنده به ظرف
نشانگرهای سطح سلول
نشانگرهای هماتوپویتیک: CD34neg، CD45neg ، CD14neg، CD31neg
مولکلولهای چسبنده:CD29pos، CD44pos،CD54pos ، CD56pos ، CD73pos ، CD105pos ، CD106pos
اینتگرین‌ها:CD49pos ، CD61pos ، CD104pos
فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها: CD121pos، CD123pos، CD124pos، CD126pos، CD140apos، CDw119pos، CD71pos، 20pos
آنتی‌ژنهای معمول گویچه‌های خونی سفید: CD80neg،CD3neg، CD86neg، MHC Class II Antigens neg.
ویژگیهای عملکردی
پتانسیل تمایز به سلولهای استخوانی، غضروف، چربی، عصب و عضله را دارا هستند.

1- Niche
2- Warton's Jelly

نیامده است ولی فاقد نشانگرهای هماتوپویتیک CD34، CD45، CD14 و همچنین فاقد نشانگرهای اندوتلیال CD34، CD31، VWF (فاکتور ون-ویلبراند). هستند. سلولهای مزانشیمی تعداد وسیعی از مولکولهای چسبنده CD44، CD29 و CD90 و شاخصهای سلولهای استرومایی SH-2، SH-3، SH-4 و گیرنده‌های سایتوکاینی مثل گیرنده انترلوکین۱ (IL1-R) و گیرنده TNF [1] را هم بیان می‌کنند [۲۷]. در مطالعات اخیر گانگلیوزید عصبی [2] (GD-2) به عنوان مارکر اختصاصی سلولهای مزانشیم معرفی شده است [۲۸] و جالب اینکه در مطالعه دیگری نشان داده شده است که سلولهای مزانشیم مغز استخوان انسان نشانگر SSEA-4 را که در سلولهای بنیادی جنینی بیان می‌شود، به میزان ۷۱ درصد بیان می‌کنند. (جدول ۲) [۲۹].

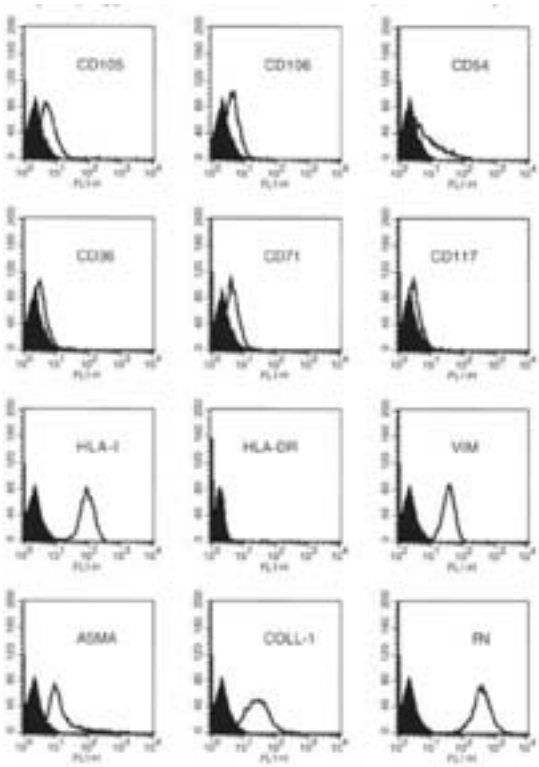
رویکردهای اولیه در کشت‌های اولیه سلولهای مزانشیم جدا شده از مغز استخوان بر پایه جداسازی سلولهای هماتوپوئتیک از سلولهای استرومایی در سیستم کشت مایع است. سلولهایی که در این سیستم کشت مایع به ظرف می‌چسبند، حاوی سلولهای مزانشیم خواهند بود چراکه سلولهای چربی، ماکروفاژها و سلولهای پلاسمایی توانایی چسبیدن به ظرف را ندارند [۱۸]. در بعضی از روشهای جداسازی از حساسیت ماکروفاژها و سلولهای هماتوپوئتیک به یون خارج سلولی ATP بهره می‌برند، چرا که ماکروفاژها و سلولهای هماتوپوئتیک در مجاورت این یون نفوذپذیر شده و به این ترتیب سبب ورود مواد کشنده به داخل سلول شده و از بین می‌روند، در حالی که سلولهای مزانشیم به این یون حساس نیستند و در مجاورت آن زنده خواهند ماند. البته سلولهای خاموش مزانشیم با استفاده از مولکول ۵-فلورواوراسیل که سلولهای فعال از لحاظ تقسیم را از بین می‌برد، نیز به راحتی قابل جداسازی هستند [۱۷]. با وجود این که تا به امروز ویژگیهای منحصر به فردی برای سلولهای مزانشیم به دست نیامده است اما مطالعات برای پیدا کردن نشانگر اختصاصی این سلولها همچنان ادامه دارد. وقتی که سلولهای مزانشیم مشتق از مغز استخوان در محیط کشت داده می‌شوند، سلولهای چسبنده، مثل سلولهای فیبروبلاست تمایل به تشکیل کلونیهایی از سلولهای دوکی شکل در محیط کشت دوبعدی دارند، بدین ترتیب از اصطلاح CFU-F [3] در مطالعات تکثیری این سلولها استفاده می‌شود. این سلولهای شبه فیبروبلاست کشت داده شده در ابتدا سلولهای آلکالین فسفاتار مثبت، کلاژن IV مثبت ، فیبرونکتین مثبت و حساس به رنگ مشکی سودان هستند در حالی که از نظر آنزیم استراز منفی هستند. به علاوه محیط احاطه کننده سلولهای مزانشیم حاوی کلاژن تیپ I و لامینین غشای پایه هستند. البته تعدادی از کلونیها فاکتور هشت را هم سنتز می‌کنند که احتمالا نشان دهنده متعهد شدن آنها به سمت اندوتلیال است [۱۷].

این سلولهای اولیه کشت داده شده برای تعدادی از آنتی‌ژنهای سطحی و پپتیدهایی مثل SH2 (CD105)، SH3، SH4(CD73)، SB-10، و سایر مولکولهای چسبنده و گیرنده‌های فاکتورهای رشد مثل CD166، CD54، CD102، CD121a،b، CD123، CD124، CD49 مثبت هستند. (جدول ۲) [۱۷].

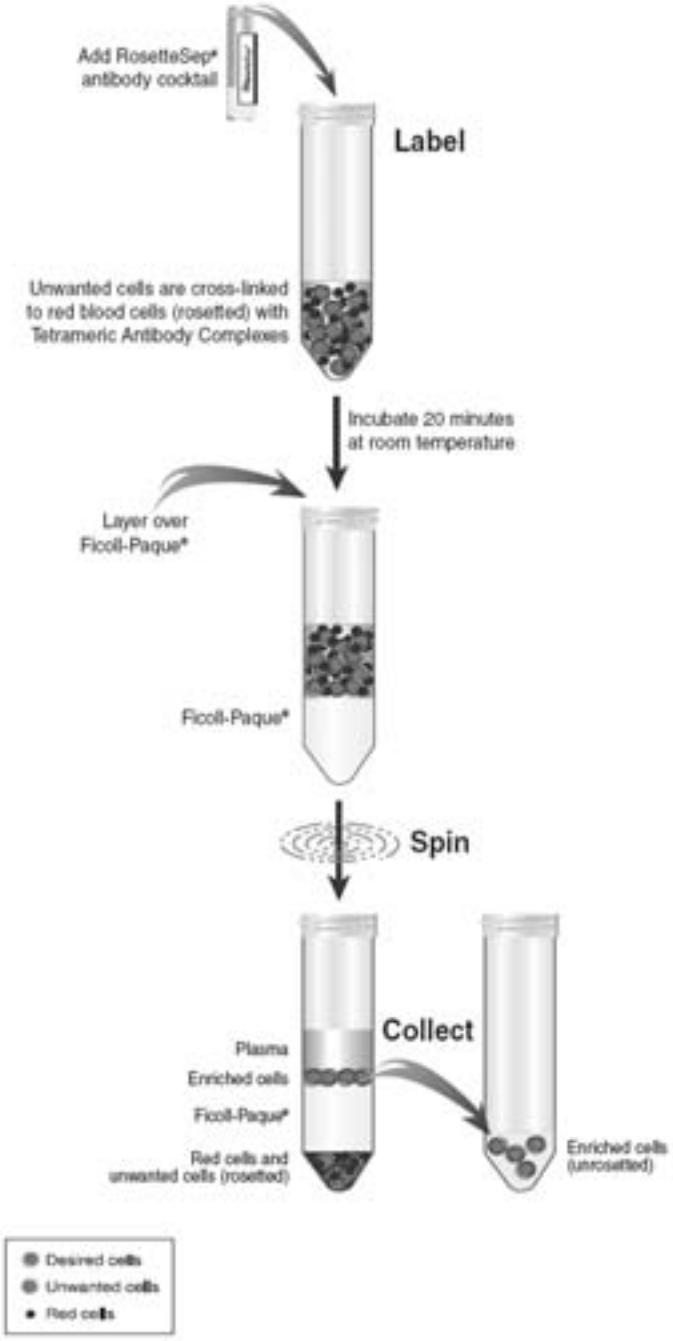
همچنین مطالعات نشان داده است که این سلولهای کشت داده شده اولیه ویژگیهای ژنی سلولهای هماتوپوئتیک و رده سلولهای استخوان‌ساز (cbfa1 [4]، آلکالین فسفاتاز، استئوکالسین و استئوپونتین) و رده سلولهای چربی‌ساز(لیپوپروتئین لیپاز) را به طور همزمان بیان می‌کنند [۳۱] که این خود نشان دهنده عدم تعهد این سلولهای مزانشیم است. در حقیقت این سلولهای مزانشیم نشانگرهای سطحی سلولهای اندوتلیال

1- Tumor Necrosis Factor Receptor
2- Neura Ganglioside-2
3- Colony forming unit –fibroblast
4- Core binding factor 1

(CD31)، مونوسیت/ماکروفاژها (CD14)، لنفوسیت‌ها (CD11a/LFA-1)، لکوسیت‌ها(CD45)، گلبول‌های قرمز (گلیکوفورین A) و سایر نشانگرهای سلولهای هماتوپوئتیک مثل CD3، CD14، CD19، CD34، CD38 و CD66b را بیان نمی‌کنند (شکل ۲). همچنین سلولهای مزانشیم تعداد زیادی از سای‌توکاینها و فاکتورهای رشد مثل فاکتور سلولهای بنیادی (لیگاند c-Kit) ،انترلوکین ۷ ، انترلوکین ۸، انترلوکین ۱۱، TGF-۱β ، Cofilin، Galectin-1، گیرنده لامینین–۱ ، سیکلوفیلین A، ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ (MMp-2)۲ را نیز بیان می‌کنند [۳۰]. RosetteSep محصولی تجاری از شرکت Stem Cell Technologies است که از همین خاصیت برای غنی‌سازی سلولهای مزانشیم مغز استخوان استفاده می‌نماید (شکل۳)



شکل ۲. بیان و عدم بیان یک سری از نشانگرها در سلولهای مزانشیم [۳۰]



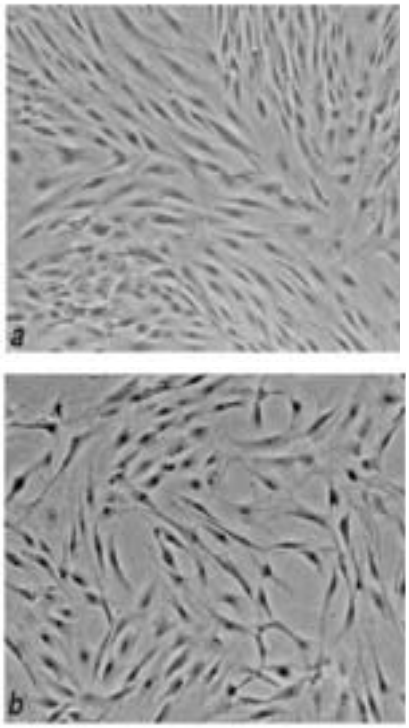
شکل۳. نحوه جداسازی سلولهای مزانشیم با استفاده از Rosettesep(cat#15128) (شرکت Stem Cell Technologies ، www.stemcell.com)

با وجود جداسازی مناسب این سلولها به روش انتخاب منفی، اولین آنتی‌بادی (Stro-1) برای انتخاب مثبت این سلولها از مغز استخوان به کار برده شد. علاوه بر این آنتی‌بادی‌های

1- Transforming Growth Factor β
2- Matrix Metallopreoteinase 2

مونوکلونال مثل anti-sca-1 [1] و (CD63) HOP-26 در غنی سازی سلولهای پیش‌ساز استخوان به‌کار رفته‌اند. در بعضی از روش‌ها سعی بر این است که جمعیت یکنواخت بیشتری از سلولهای مزانشیمی را با غنی کردن محیط کشت با فاکتورهای رشد مثل TGF-β1 [2]، bFGF [3]، فاکتور رشد اپی‌درم (EGF [4])، فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF [5]) به دست بیاوریم، برای مثال هنگامی که از bFGF برای حفظ و بقای پتانسیل تمایزی سلولهای مزانشیمی استفاده می‌شود، سایتوکاین‌هایی مثل انترلوکین ۱۱ در حفظ قدرت تمایزی این سلولها به سمت سلولهای هماتوپویتیک در کشت‌های بالا ناتوان هستند. با این حال و با وجود کوشش‌های فراوان، اغلب روشهای جداسازی ویژه و مختص گونه هستند، که منجر به ایجاد جمعیت سلولی هوموژن بر اساس ریخت‌شناسی ، شاخصهای سلولی و ویژگیهای فنوتیپیک است [۱۷] (شکل ۳).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰٤ توسط شیکر (Schieker) و همکارانش صورت گرفت یک روش فلوسایتومتریک برای ارزیابی و تایید سریع سلولهای مزانشیمی تعریف و به کار برده شد که در این روش در حقیقت ارزیابی ٤ پروتئین کلاژن I، کلاژن IV، فیبرونکتین و CD44 به طور همزمان و با استفاده از ٤ رنگ مختلف صورت می‌پذیرد که آنالیز سلولهای حاصل نشان دهنده جمعیت یکنواختی از سلولهای مزانشیم بود [۳۲]. در روش دیگری که اخیرا برای جداسازی و تعیین هویت اختصاصی سلولهای مزانشیمی توسط گو (Guo) و همکارانش طراحی شده است، از مولکولهای کاملا اختصاصی اسیدهای نوکلئیک و ایجاد ساختارهایی به‌نام آپتامر [6] استفاده می‌شود. آپتامرها در حقیقت مولکولهای گیرنده‌ای هستند که به طور اختصاصی سلولهای مزانشیم را جمع‌آوری می‌کنند. این مولکولها، DNA های تک رشته‌ای (ssDNA) و یا مولکولهای RNA با طول ۱۰۰ باز هستند که می‌توانند در فضای سه بعدی تا خورده و با مولکولهای هدف خود مثل پروتئین‌ها، پپتیدها، آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها و گیرنده‌های مختلف سطح سلولها واکنش دهند. این مولکولها نسبت به سایر مولکولهای مشابه از نظر فعالیت امتیازاتی دارند به طوریکه کاملا اختصاصی و با میل پیوندی بالا به مولکولهای هدف خود بدون هیچ گونه اثر سمی و تحریک کنندگی سیستم ایمنی اتصال می‌یابند و اینکه این مولکولها به راحتی در محیط آزمایشگاه تولید می‌گردند [۳۳].



شکل ٤. مقایسه سلولهای مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان (a) و بافت چربی (b) از لحاظ ریخت‌شناسی (برگرفته از منبع [٤۲])

همان‌طور که ذکر شد اغلب رویکردها در غنی سازی سلولهای بنیادی مزانشیم بر اساس فاکتورها و شاخصهای فنوتیپیکی آنها بوده است ، اما یک روش کشت ساده بر اساس وابستگی به اندازه سلول طراحی شده است که تا حدودی در

1- Anti Stem Cell antigen - 1
2- Transforming Growth Factor β1
3- Basic Fibroblast Frowth Factor
4- Epidermal Growth Factor
5- Platelet Derived Growth Factor
6- Aptamer

غنی سازی سلولهای مزانشیم موفق بوده است. در این روش در حقیقت آسپیراسیون مغز استخوان با استفاده از غشاهای منفذدار، غربال می‌شود که به نسبت یک جمعیت یکنواخت با قابلیت خودنوزایی و قدرت بالای تمایز را ایجاد می‌نماید. به علاوه رویکردهای پیچیده بیشتری مثل انتخاب مثبت سلولهای مزانشیم با استفاده از میکروبیدها و دستگاه FACS[1] یا با استفاده از MACS[2] روشهای مورد توجهی هستند که نه تنها در جداسازی و غنی سازی بهتر سلولهای مزانشیم کاربرد دارند بلکه در آشکارسازی توان این سلولها در حالتهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک نیز به کار می‌آید [۱۷] . در روشی که اخیرا Scherepfer و همکاران ارایه نموده‌اند با استفاده از جداسازی سلولی با روشهای MACS و به روش انتخاب منفی، ماکروفاژها را با استفاده از نشانگر CD11b از جمعیت سلولی خارج کرده و بدین ترتیب به جمعیت یکنواختی از سلول های مزانشیم دست پیدا کرده‌اند. درکشت‌های سلولی و در پاساژهای مختلف سلولی از سلولهای مزانشیم، ماکروفاژها همچنان به دلیل خاصیت چسبندگیشان در محیط وجود خواهند داشت که به این شکل از محیط حذف می‌شوند [۳٤].

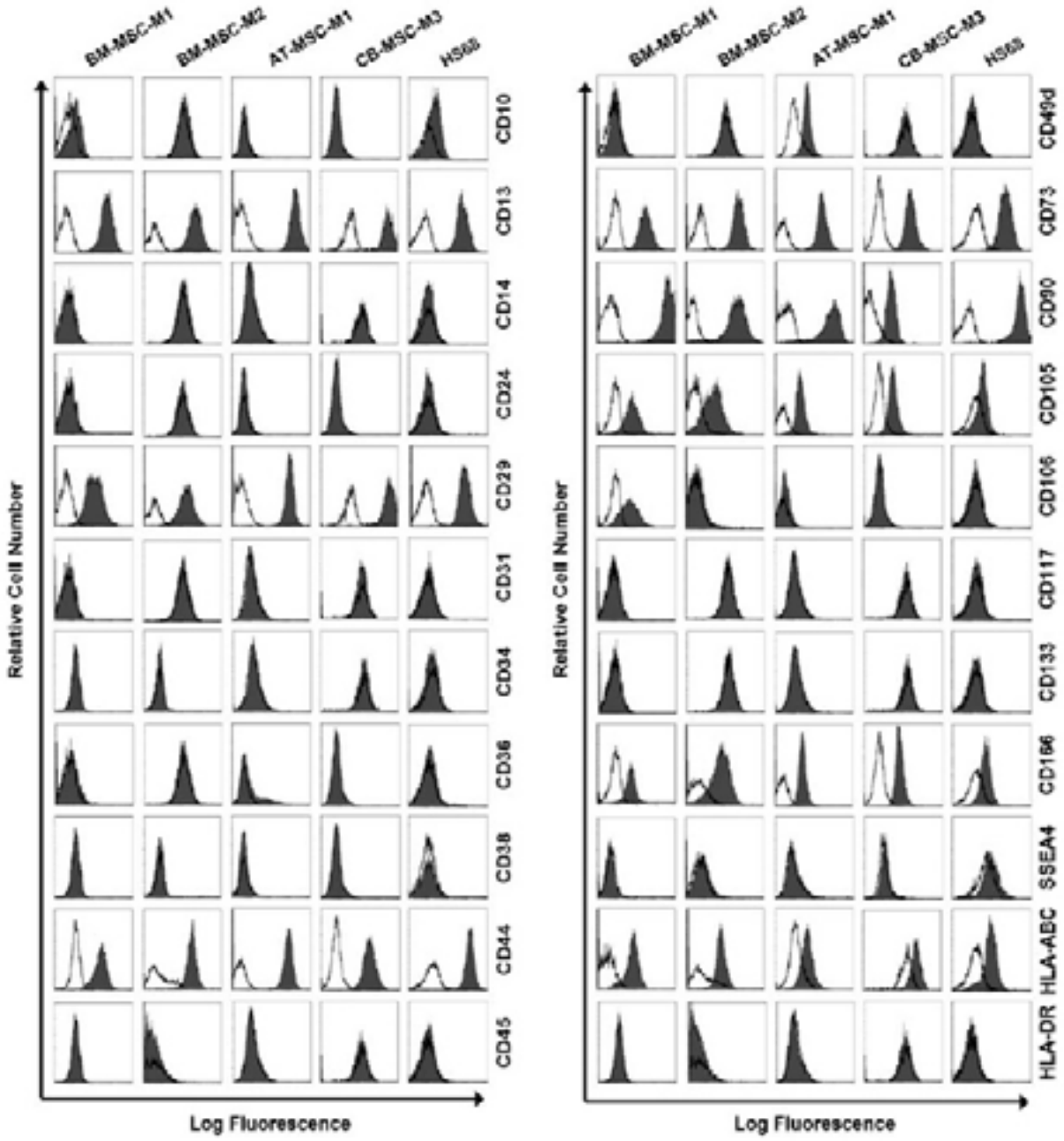
منابع مختلف دسترسی به سلولهای بنیادی مزانشیم

مهمترین منبع سلولهای بنیادی مزانشیم در سالهای اخیر مغز استخوان بوده است که سلولهای مورد نظر به راحتی از آن جدا و کشت داده می‌شوند. اما اخیرا سلولهای مزانشیم را از منابع فرعی دیگری هم مثل بافتهای چربی [۳۵] بافتهای جفت و بند ناف [۳٦-۳۸]، خون محیطی [۳۹ و ٤۰]، بافتهای پیوندی و ماهیچه‌های اسکلتی [۷] جدا کرده‌اند. در مقایسه با مغز استخوان این منابع، در دسترس‌تر هستند و جدا کردن سلولهای مزانشیم از آنها راحت‌تر است مضافا بر اینکه میزان این سلولها در آنها بیشتر است [۳۵ و ٤۱]. مطالعات نشان داده است که سلولهای مزانشیمی جدا شده از بافت چربی از نظر ریخت‌شناسی (شکل ٤) و حتی بیان نشانگرهای سطحی شبیه همان سلولهای جدا شده از مغز استخوان هستند (شکل ۵) [٤۲]. سلولهای مزانشیمی جدا شده از بافت چربی از نظر رفتار سلولی در محیط کشت و قدرت تمایزی به سلولهای استخوان، غضروف و چربی تفاوتی با سلولهای جدا شده از مغز استخوان نشان نداده‌اند [٤۳] (شکل ٦).

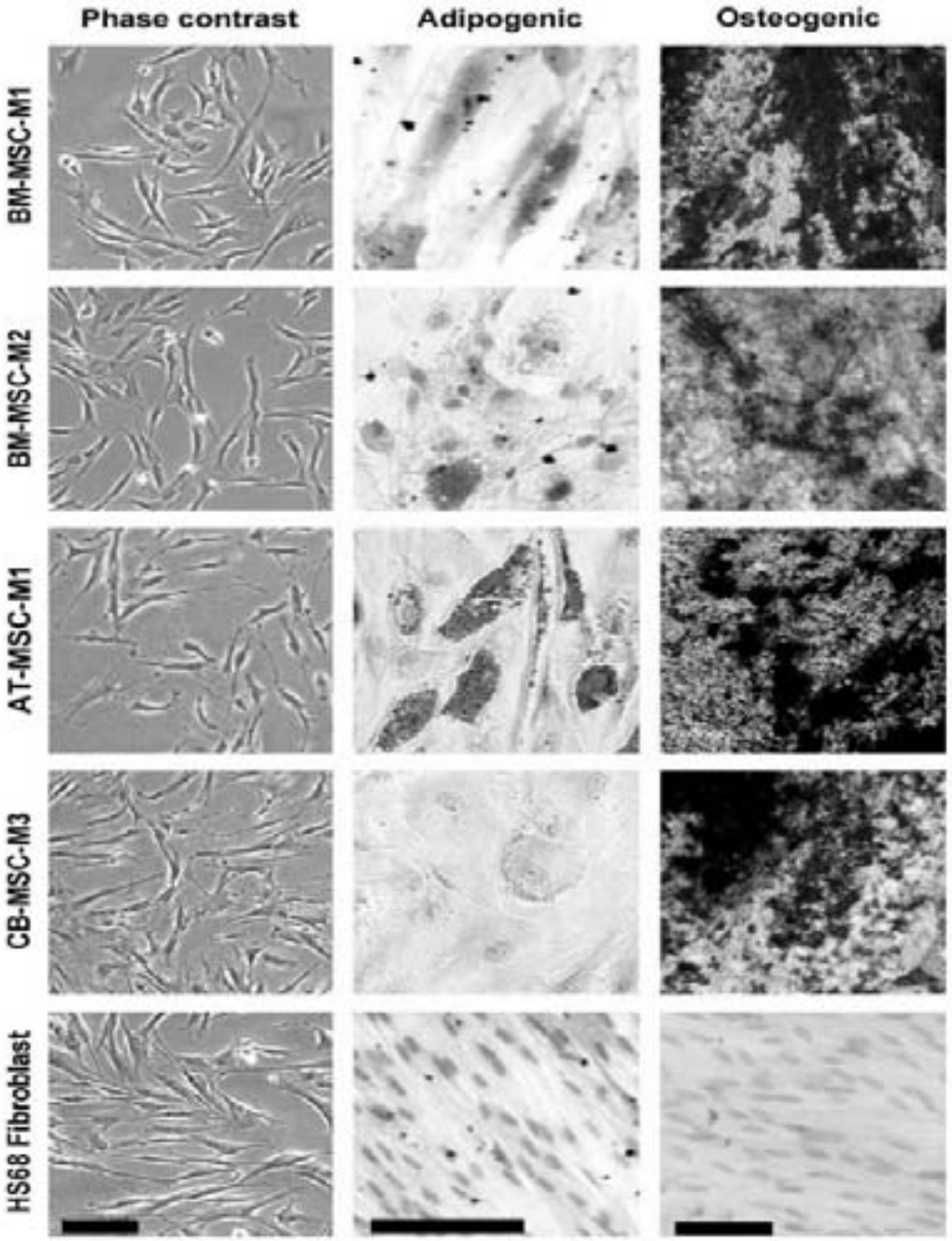
الگوی فنوتیپیکی این سلولهای بنیادی جدا شده از منابع مختلف در شکل ۵ با یکدیگر مقایسه شده است . در این شکل بروز این مولکولها در سلولهای مزانشیم مشتق از مغز استخوان در دو حالت مختلف از نظر شرایط کشت، یکی در محیط DMEM (BM-MSC-M1) و دیگری در محیط کشت مخصوص سلولهای مزانشیم که به صورت تجاری(BM-MSC-M2) وجود دارد (شرکت Cambrex)، با سلولهای مزانشیم جدا شده از بافت چربی (AT-MSC-M1) و سلولهای مزانشیم جدا شده از بند ناف (CB-MSC-M3) و با رده سلولی فیبروبلاست انسانی (HS68) مقایسه شده‌اند. در مطالعه‌ای بیان ژنهای سلولهای جدا شده از منابع مختلف بررسی و با یکدیگر مقایسه شده‌اند که نشان داده شده است سلولهای مزانشیمی از نظر بیان ژنها با یکدیگر متفاوت هستند و نسبت به نمونه فیبروبلاست حداقل دارای تعداد ۲۵ ژن فعال شده بیشتر هستند که این امر می‌تواند نشان دهنده توان تمایزی متفاوت سلولهای مزانشیمی و استفاده بهتر از آنها در درمان بیماریهای مختلف و حتی کمک به شناخت بهتر سلولهای مزانشیم و تفکیک آنها از سلولهای فیبروبلاست باشد (شکل ۷) [٤٤].

1- Flourescence Activated Cell Sorting

2- Magnetic Activated Cell Sorting



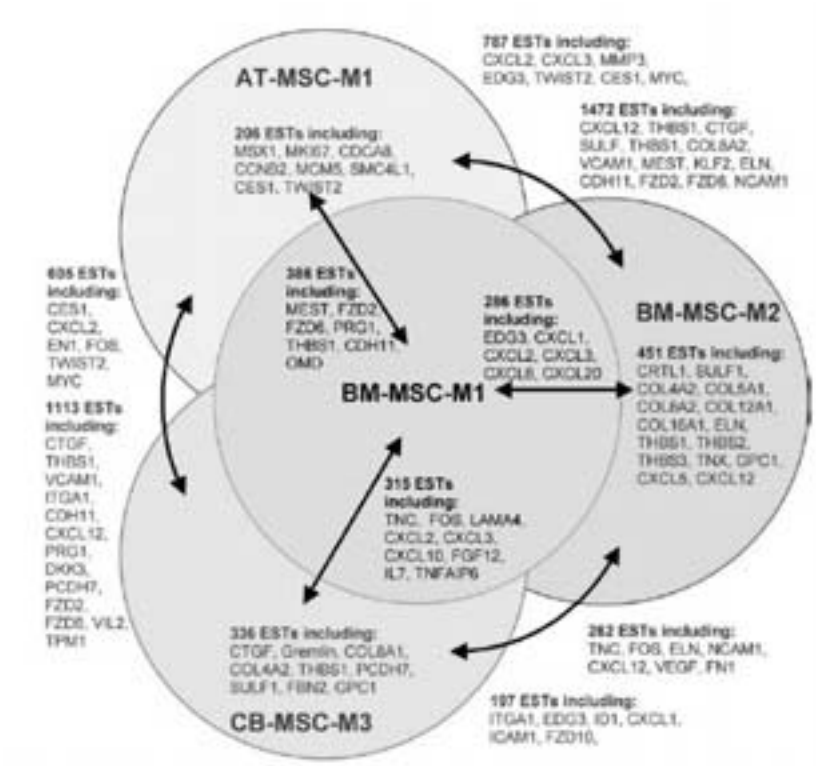
شکل ۵. مقایسه الگوی فنوتیپیک سلولهای مزانشیم جداشده از منابع مختلف.BM-MSC-M1,2 : سلولهای مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان .AT-MSC: سلولهای مزانشیمی جدا شده از بافت چربی. CB-MSC: سلولهای مزانشیم جدا شده از بند ناف (برگرفته ازمنبع [٤٤])



شکل٦. مقایسه ریخت شناسی و تمایز سلولهای مزانشیم جدا شده از منابع مختلف(برگرفته از منبع [٤٤])

در این تصویر ریخت‌شناسی سلولهای مزانشیم جدا شده از مغز استخوان در دو شرایط کشت مختلف (BM-MSC-M1 و BM-MSC-M2) ، سلولهای جداشده از بافت چربی (AT-MSC-M1) و سلولهای جدا شده از بند ناف (CB-MSC-M3) بررسی شده است. تمام سلولها با خاصیت چسبندگی به سطح و ظاهر دوکی شکل مشخص هستند. به نظر می‌رسد که اندازه سلولهای جدا شده از بافت چربی کوچکتر باشند در حالی که سلولهای جدا شده از بند ناف ریخت‌های متفاوتی را به صورت گرد، پهن یا سلولهای کشیده نشان می‌دهند. در تمامی جمعیت سلولی مورد مطالعه تمایز به سمت سلولهای چربی و استخوانی

نشان داده شده است . تمایز به سلولهای چربی در سلولهای جدا شده از بند ناف ضعیف‌تر بوده است. لازم به ذکر است تمایز به سلولهای چربی و استخوانی در سلولهای فیبروبلاست انسانی (HS68) تحت شرایط مشابه ایجاد نشده است.



شکل ۷. مقایسه ژنها و ESTs بین سلولهای مزانشیمی مشتق از بافتهای مختلف که میزان تفاوت و تشابه را نشان می‌دهد.
(برگرفته از منبع [٤٤])

یکی دیگر از منابعی که سلولهای بنیادی مزانشیم را از آن جدا کرده و کشت داده‌اند، پرده و مایع آمنیوتیک جنین است که بعد از جدا کردن آن از کوریون به صورت مکانیکی و خارج نمودن سلولهای اپیتلیالی آن با استفاده از تیمار کردن با تریپسین، سلولهای مزانشیم آن را با تیمار کلاژناز و DNase به دست آورده و در محیط کشت غنی شده با فاکتورهای رشد و سرم کشت داده‌اند. مطالعات نشان داده که سلولهای مزانشیمی جدا شده از آمنیوتیک دارای یک سری از ویژگیهای سلولهای کاردیومیوسیت هستند بدین معنی که توان تبدیل شدن آنها به سلولهای قلبی در محیط آزمایشگاه و در درون بدن بالا است که می‌توانند کاندیدهای مناسبی برای تحقیقات بیشتر و در آینده سلول‌درمانی بیماریهای قلبی باشند [٤٥-٤٧]. در مطالعه‌ای جالب پتانسیل تمایز سلولهای مزانشیم جدا شده از مغز استخوان و مایع آمنیوتیک را که با پروتین GFP[1] نشاندار شده بودند، در رت مورد بررسی قرار دادند[٤٧] و مشاهده کردند که ۳۰ روز بعد از پیوند تعداد کمی از این سلولها به سلولهای ماهیچه‌ای صاف رگی و روده‌ای تبدیل شده بودند در حالی که اکثر سلولهای مزانشیم بدون تمایز باقی مانده بودند. در مطالعات آزمایشگاهی که این سلولهای مزانشیمی را با سلولهای ماهیچه‌ای صاف کشت داده بودند

1- Expressed Sequence Tags
2- Green Fluorescence Protein

مشاهده کردند که پدیده همجوشی سلولی[۲] سبب تبدیل این سلولها به سلولهای ماهیچه‌ای صاف می‌شود [٤٧]. جالب اینکه سلولهای مزانشیمی را از آپاندیس طبیعی افراد بین ۱ تا ۱۸ سال نیز جدا و کشت داده‌اند [٤٨].

از منابع دیگری که امروزه توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است بافت اطراف رگهای بند ناف است که ژل وارتون[۲] نامیده می‌شود. این بافت غنی از سلولهای مزانشیم پرتوانی است که توان تمایزی آنها همانند سلولهای مشتق از مغز استخوان است و دارای همان ویژگیها است که به دلیل در دسترس بودن این بافت و عدم وجود مشکلات اخلاقی، استفاده از آن را برای جداسازی سلولهای مزانشیم کاندید کرده است، علاوه برآن، برای استفاده از آن در پیوند به بیماران نیاز به یکسان سازی کامل مولکولهای HLA نیست. بنابراین ایجاد بانکی از سلولهای مشتق از ژل وارتون بند ناف و یا به طور کلی سلولهای مشتق از بند ناف می‌تواند منبع مناسبی برای رویکردهای درمانی با استفاده از سلولهای بنیادی در آینده باشد. [٤٩] جالب اینکه سلولهای مزانشیمی از خود رگهای بند ناف[۳] هم با همان خصوصیات سلولهای مزانشیم مغز استخوان جدا و کشت داده شده‌اند، این سلولهای جدا شده از رگهای بند ناف همان توان تمایزی را دارا هستند و حتی در مطالعه‌ای تمایز این سلولها به سلولهای شبه کاردیومیوسیت گزارش شده است [٥٠].

پتانسیل تمایزی سلولهای بنیادی مزانشیم

تا امروز در انواع پستانداران تمایز این سلولها به سلولهای مختلفی از قبیل استخوان، غضروف، چربی، تاندون و بافتهای عضلانی نشان داده شده است. این سلولها علاوه بر قدرت تمایز به سلولهای رده خود توانایی تمایز به سایر رده‌های سلولی مثل سلولهای کبدی، کلیوی، قلبی و حتی سلولهای عصبی را دارا هستند. بنابراین اصطلاح پرتوان و چندتوان به طور متقابل برای این سلولها به کار برده می‌شود.

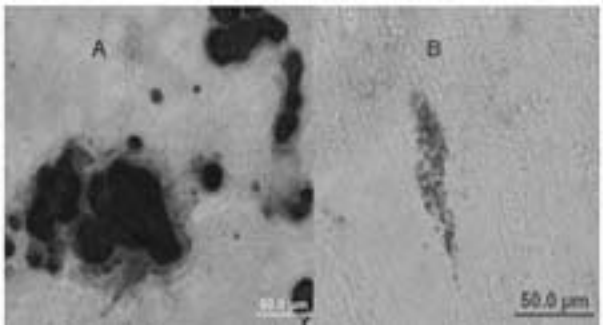
پتناسیل تمایزی[٤] در حقیقت فرایندی است که در آن یک سلول بنیادی توانایی تبدیل شدن به سایر رده‌های سلولی را نشان می‌دهد. اگر چه این فرایند به خوبی در دوزیستان مشاهده و تایید شده است اما اینکه آیا در سلولهای پستانداران هم این فرایند وجود داشته باشد نامعلوم است. تحقیقات اخیر در پیوندهای سلولی نشان داده است که سلولهای بنیادی مزانشیم همچنان که توانایی تبدیل شدن به سلولهای مشتق از رده مزودرمی را دارا هستند به سلولهایی با ویژگیهای سلولهای اکتودرم و اندوردم نیز در محیط آزمایشگاه تبدیل می‌شوند، که این خود بیانگر وجود پدیده تبدیل و تمایز در رده سلولهای پستانداران است. اگر چه عده‌ای معتقدند که نتایج این تحقیقات می‌تواند ناشی از حضور سلولهای پیش‌ساز یا حتی پدیده الحاق سلولی باشد. اما مطالعات نشان داده که همین سلولهای مزانشیمی که در حقیقت برای ایجاد یک سری و یک رده خاص سلولی متعهد شده‌اند در شرایط آزمایشگاه و با ایجاد تحریکات و پیام‌های مصنوعی توانایی تبدیل شدن به سایر رده‌های سلولی را دارا هستند [٥١].

همانطور که قبلا هم اشاره شد یکی از ویژگیهای سلوهای مزانشیم و در حقیقت یکی از راههای شناخت سلولهای مزانشیمی بررسی توان تبدیل شدن آنها به سلولهای استخوانی، غضروفی و چربی در محیط آزمایشگاه است (شکل۸). اما در یک مطالعه جالب توان تمایز سلولهای استخوانی نشات گرفته از سلولهای مزانشیم مغز استخوان انسان به سلولهای چربی و غضروفی بررسی شده است. به این ترتیب که مشاهده شد سلولهای مزانشیمی که تحت شرایط تبدیل به سلولهای استخوانی کشت داده می‌شوند

3- Cell Fusion
2- Warton’s Jelly
3- Umbilical vein cord Blood.

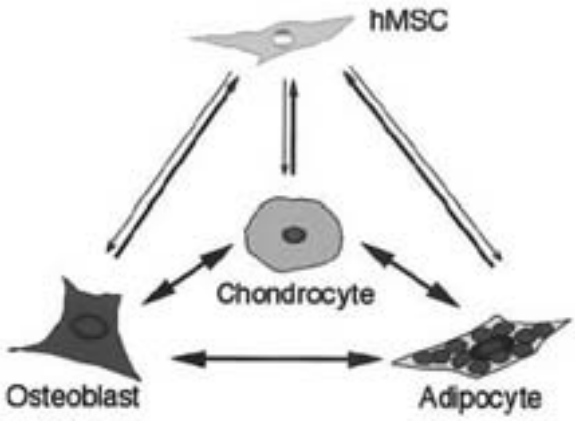
4- ransdifferentiation

حداکثر تا ۳۰ روز توانایی تبدیل به سلولهای چربی و استخوانی را حفظ می‌نمایند.



شکل ۸ تمایز سلولهای مزانشیم به سلولهای استخوانی (A) و سلولهای چربی (B). (خدادادی و بهاروند)

حتی سلولهای کاملا تمایز یافته به سلولهای استخوانی (بعد از ۳۰ روز) نیز همچنان توانایی تبدیل شدن به سلولهای غضروف و چربی را حفظ کرده بودند. جالب‌تر اینکه سلولهای تمایز یافته غضروف و چربی از سلولهای مزانشیم مغز استخوان نیز توانایی تبدیل شدن به سایر سلولهای رده مزانشیمی را در خود حفظ کرده بودند. (شکل ۹) شناخت هرچه بیشتر عواملی که در فرایندهای تمایزی سلولهای بنیادی دخالت دارند ما را در فهم بهتر تکامل سلولهای انسانی و استفاده از این دانش در روش نوین سلول- درمانی هدایت می‌نماید [۵۱].



شکل ۹. مدل توان تمایزی سلولهای نشات گرفته از سلولهای مزانشینی

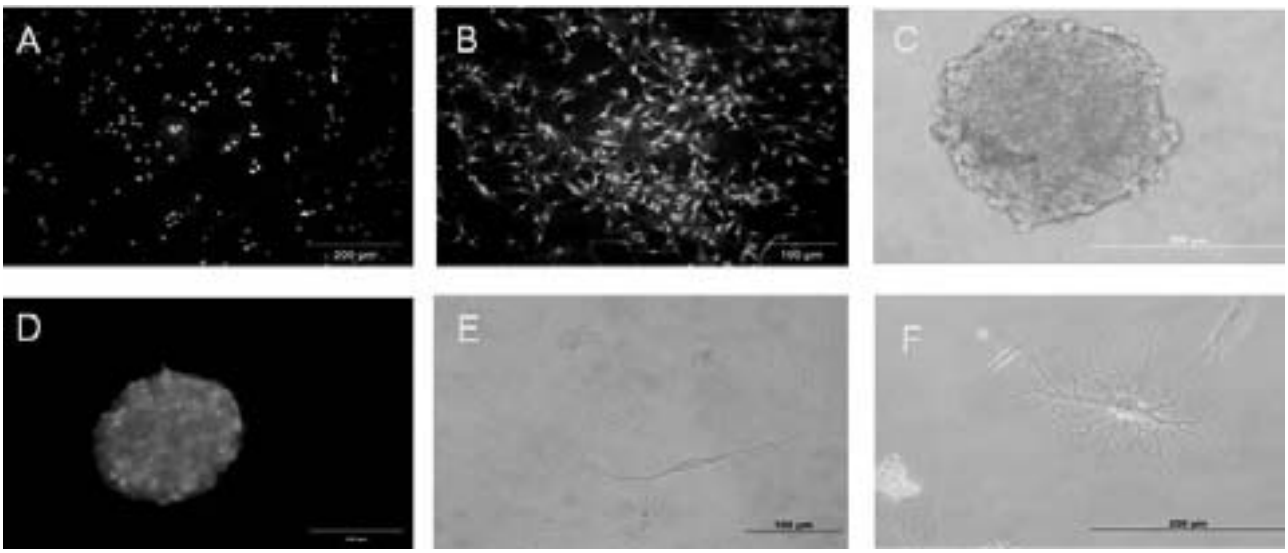
مغز استخوان انسان برگرفته از منبع [۵۲]

سلولهای مزانشیم انسانی توانایی تمایز به سایر رده‌های سلولی را هم نشان داده‌اند. در سال ۲۰۰۰ سانچز (Sanchez) و همکاران تمایز سلولهای مزانشیمی به سلولهای عصبی را در محیط آزمایشگاه نشان دادند [۵۳]، که این پتانسل تمایزی توسط ژیانگ (Xiang) و همکاران با کشت در آزمایشگاه سلولهای مزانشیمی و با روشهای مولکولی و آزمایشهای وسترن بلات بیان نشانگرهای عصبی در این سلولها را تایید کردند [٥٤]. مطالعات نشان داده که سلولهای مزانشیمی توانایی تمایز به نورونهای عصبی و آستروسیت‌ها را نیز در شرایط آزمایشگاه دارا هستند [۵۵]. در پژوهشی که در پژوهشکده رویان روی سلولهای مزانشیم جدا شده از مغز استخوان موش صورت گرفته است، سلولهای مزانشیمی در محیط آزمایشگاه تحت تیمارهای مختلف در ابتدا به سلولهای بنیادی عصبی[1] که توانایی تشکیل نوروسفر[2] را دارا بودند و از لحاظ بیان نشانگر نستین نیز مثبت بودند، تبدیل شدند. که بعد از این سلولهای بنیادی ایجاد شده توانایی تکشیل سلولهای عصبی را در محیط آزمایشگاه نشان دادند (شکل ۱۰).

سلولهای مزانشیمی توانایی تمایز به سلولهای اندودرمی را نیز دارا هستند. مطالعات مختلفی در مورد تمایز سلولهای بنیادی مغز استخوان موش و موش صحرایی به هپاتوسیت در محیط کشت انجام شده است. اما برای تفسیر و تایید بیشتر همواره نیاز به بررسی تمایز و فعالیت سلولها در بدن موجود زنده است. فاکتورهای رشد و تمایز مختلفی در مطالعات گوناگون برای تمایز سلولهای بنیادی مغز استخوان به سلولهای بیان

1- Neural Stem Cell
2- Neursphere

کننده ژن و پروتین آلبومین و سلولهای شبه هپاتوسیت استفاده شده است که فاکتور رشد هپاتوسیت، فاکتور رشد فیبروبلاست و فاکتور رشد اپی‌درم از آن جمله‌اند. نشان داده شده که فاکتور رشد هپاتوسیت می‌تواند باعث تمایز سلولهای بنیادی مغز استخوان موش به سلولهای شبه هپاتوسیت که بیان‌کننده آلبومین هستند شوند [٥٦ و ٥٧]. در مطالعات مختلف تمایز سلولهای بنیادی مغز استخوان انسان در شرایط مختلف با استفاده از فاکتورهای رشد [٥٨ و ٥٩] یا هم‌کشتی [٦٠] و همچنین سلولهای مزانشیم مشتق از بافت چربی انسان [٦١] هم به سمت سلولهای کبدی نشان داده شده است.



شکل ۱۰. رنگ‌آمیزی ایمونوسیوشیمی A: رنگ PI که هسته‌های سلول را رنگ کرده است. B: سلولها با نشانگر بتا توبولین ۳ نشانگر اختصاصی سلولهای عصبی رنگ‌آمیز ی شده‌اند. C: نوروسفرهای ایجاد شده از سلولهای مزانشیم موش در آزمایشگاه، D: رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی نروسفرها. EوF سلولهای عصبی مشتق از سلوهای مزانشیمی (هاشمی و بهاروند).

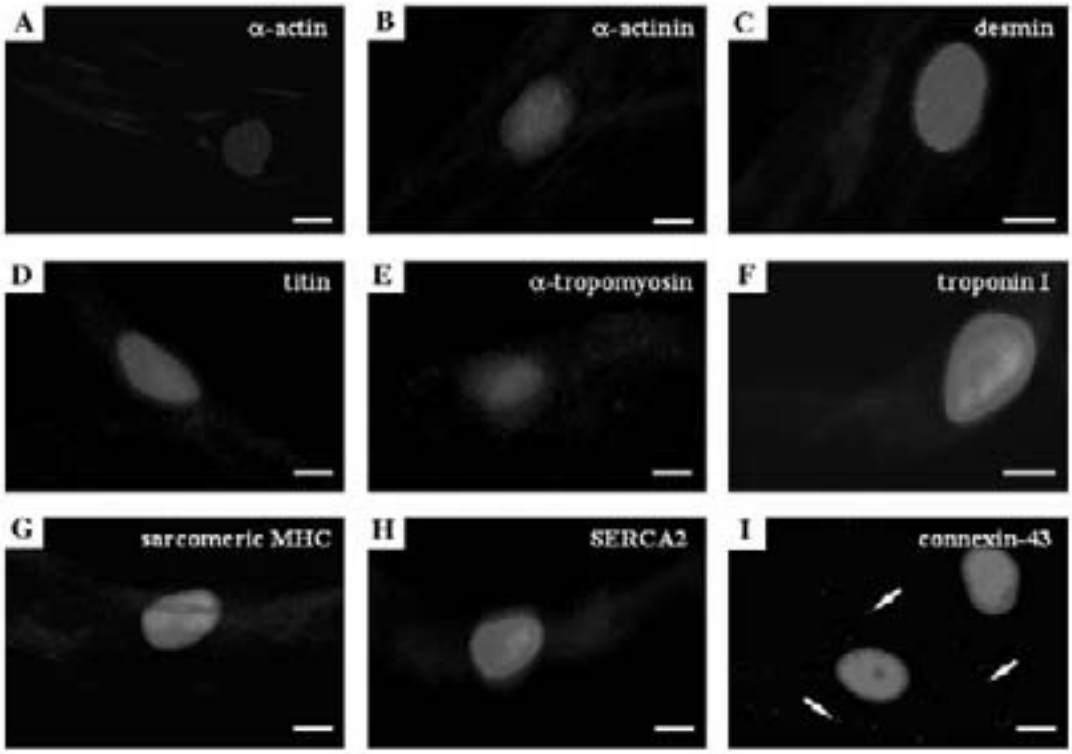
سلولهای مزانشیمی توانایی تمایز به سلولهای مزودرمی را نیز در شرایط کشت آزمایشگاهی نشان داده‌اند به طوریکه اولین بار ماکینو (Makino) و همکاران تمایز سلولهای مزانشیمی به سمت سلولهای کاردیومیوسیت را در محیط آزمایشگاه و تحت تاثیر ماده 5-Azacytidine نشان دادند و از سلولهای مزانشیمی موش رده سلولهای کاردیومیوژنیک را ایجاد نمودند [٦٣]. مطالعات دیگر توانایی تمایز سلولهای مزانشیمی در شرایط هم‌کشتی با سلولهای کاردیومیوسیت رت را نشان دادند [٦٤ و ٦٥] (جدول ۳).

در حالیکه در مطالعه‌ای متفاوت با توجه به اینکه استفاده از ماده 5-Azacytidine نمی‌تواند گزینه مناسبی در رویکردهای بعدی استفاده از این پتانسیل تمایزی در کاربردهای کلینیک باشد تمایز سلولهای مزانشیمی انسان به سلولهای کاردیومیوسیت در شرایطی متفاوت و در مجاورت مخلوطی از فاکتورهای رشد و هورمون‌ها بررسی و مطالعه شد [٦٢] (شکل ۱۱). مطالعات آزمایشگاهی روی توان تمایزی سلولهای مزانشیم انسانی به سمت سلولهای کاردیومیوسیت شامل مطالعاتی است که تنها تاثیر ماده 5-Azacytidine را روی سلولهای مزانشیمی بررسی کرده است [٦٣] و یا تاثیر مخلوطی از فاکتورهای مختلف را گزارش کرده‌اند[٦٢، ٦٦] یا مطالعاتی که تاثیر هم‌کشتی کاردیومیوسیت‌های نوزادان [٧٤] یا حتی رده‌های سلولی کاردیومیوسیت [٦٥ و ٧٥] یا هم

کشتی با سلولهای کاردیومیوسیت بالغ را گزارش کرده‌اند [۷۳، ۷۶ و ۷۷].

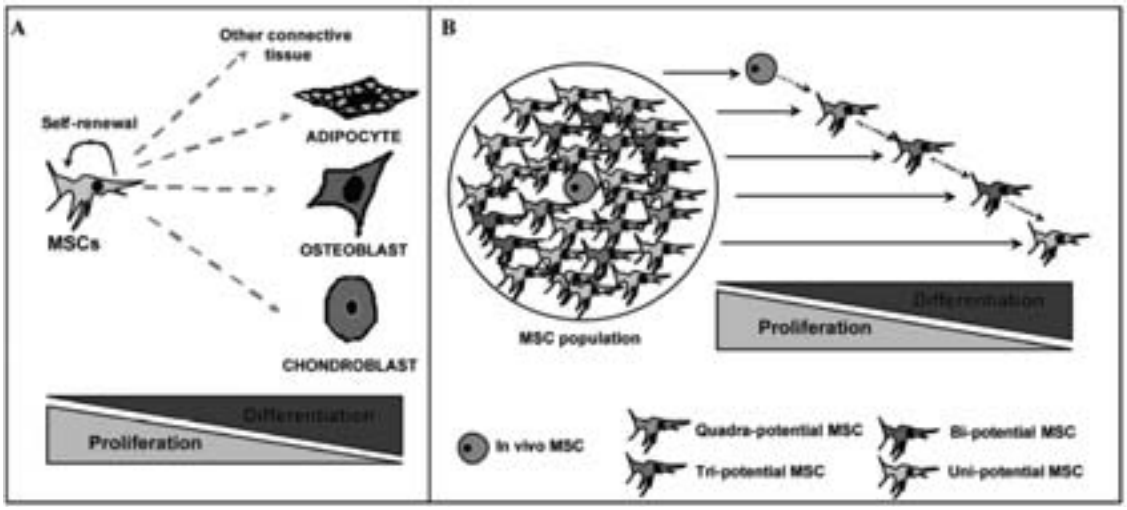
جدول ۳. تمایز سلولهای مزانشیم به سلولهای کاردیومیوسیت

	Induction	Type of Cells	References
In Vitro Assays	5-Azacytidine	Rat MSCs	Wakitani et al[67]
	5-Azacytidine	Murine MSCs	Makino et al[63]
	5-Azacytidine	Rat MSCs	Tomita et al. [68]
	5-Azacytidine	Rabbit fatty tissue MSCs	Rangappa et al.[65]
	5-Azacytidine	Rabbit MSCs	Lin et al.[69]
	Co-culturing with rat neonatal cardiomyocytes	Rat MSCs	Fukuhara et al.[70]
	5-Aza treatment and co-culturing with rodent cardiomyocytes	Human BM MSCs	[62],Shim et al
	5-Azacytidine	Human BM MSCs	Zhang et al. [71],Xu
	Co-culturing with rat neonatal cardiomyocytes	MurineMSCs	Meifeng Xu et al[72]
	Co-culturing with adult rat cardiomyocytes	Rat MSCs	[73],Wang et al



شکل ۱۱. بررسی بیان نشانگرهای مختلف سلولهای قلبی به روش ایمونوسیتوشیمی در سلولهای تمایز یافته به کاردیومیوسیت. A: پروتئین آلفا–اکتین سارکومری، B: آلفا– اکتینین سارکومری، C: دسمین، D: تیتین ویژه سلولهای قلبی / ماهیچه‌ای، E: آلفا–تروپومیوزین سارکومری، F: تروپونین I قلبی، G:

زینجیره سنگین میوزین سارکومری، H: Serca2 ATPase[1] I) کانکسین-۴۳ (فلشها نشان دهنده اتصالات سلولی است[2]) برگرفته از منبع [۶۲]



شکل ۱۲. مدل تئوریک پتانسیل تمایزی سلولهای مزانشیم(برگرفته از منبع [۲])

1. sarcomeric and endoplasmic reticulum calcium 2 ATPase
2. Gap junction

بسیاری از مطالعات حیوانی نشان داده است که سلولهای مزانشیمی بعد از کشت و پیوند توانایی تمایز به بافتهایی مثل استخوان[۱۰ و ۷۸-۸۱]، غضروف [۱۰، ۷۹ و ۸۲]، تاندون [۸۳ و ۸٤]، عضله[۸۵ و ۸٦] و عصب[۸٦] را دارا هستند. مثالهای فوق فقط از آن جهت اهمیت دارند که توان بالای تمایزی سلولهای مزانشیمی را بهتر درک کنیم. باید در نظر داشت که کلیه مطالعاتی که تمایز سلولهای مزانشیمی را بررسی نموده‌اند اطلاعات مناسبی از لحاظ شرایط کشت، محرکهای مناسب و روشهای مناسب برای تشخیص تمایز نهایی سلولهای مزانشیمی در اختیار ما می‌گذارند. اگرچه مکانیسم‌های مولکولی و سلولی تمایز سلولهای مزانشیمی به درستی شناخته نشده است اما به نظر می‌رسد که متعهد شدن سلولهای مزانشیمی به سلولهای استخوانی و غضروفی یا سلولهای چربی به ترتیب به بیان مولکولهای Cbfa-1 و PPARγ2[1] نیاز دارند و در تمایز نهایی به سمت سلولهای استخوانی بیان آلکالین فسفاتاز، استئوپونتین[2]، استئوکلسین[3] و کلاژن تیپ I افزایش می‌یابد در حالی که میزان افزایش در مولکلول‌های کلاژن تیپ II و IX تمایز به سلولهای غضروفی را سبب می‌شود و در تمایز سلولهای مزانشیمی به سمت سلولهای چربی میزان بیان مولکولهای aP2، آدیپسین٤ ، لپتین و لیپوپرتئین لیپاز افزایش می‌یابد [۸۷]. در مطالعه اخیر که توسط شیوتا (Shiota) و همکاران انجام شده است سلولهای مزانشیم را بعد از جدا کردن از مغز استخوان و تفکیک کردن از سلولهای هماتوپویتیک در آزمایشگاه کشت داده و بعد از اولین کشت در حالت چسبنده سلولهای مزانشیمی آنها را در شرایط غیر چسبنده کشت داده تا ساختارهایی کره مانند به نام Sphere را تشکیل دهند که در این حالت نشانگر نستین را به‌خوبی بیان می‌کنند و در نهایت این Sphere ها را خرد کرده و سلولهای منفرد را ایجاد می‌نماییم و در شرایط چسبنده کشت داده‌اند و مشاهده کرده‌اند که تحت این شرایط سلولهای مزانشیمی نشانگرهای سلولهای عصبی، سلولهای عضلانی و سلولهای تپنده قلبی را نشان می‌دهند [۸۸].

مدل تئوریکال تمایزی سلولهای مزانشیم

در این مدل تئوریکال سلولهای مزانشیم توانایی تمایز به اکثر سلولهای رده بافتهای پیوندی مثل استخوان، غضروف، تاندون، عضله، چربی و درم دارا هستند ، به علاوه سلولهای مزانشیمی توان خود نوسازی و تکثیر فراوان و تبدیل و تمایز به سایر سلولها را در شرایط مختلف نشان می‌دهند. اما عقیده بر این است که در مدل فرعی و In Vivo سلولهای بنیادی مزانشیم جمعیتی از سلولهای مزانشیم هستند که دارای توان تمایزی متعدد و متفاوتی بوده که در محیط آزمایشگاه در حقیقت همه یا قسمتی از این جمعیت کشت داده می‌شود و در نتیجه توان تمایزی آن کاهش پیدا می‌کند (شکل ۱۲) [۲] .

ویژگیهای ایمونولوژیک سلولهای بنیادی مزانشیم

اکثر مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که سلولهای مزانشیمی توانایی گریز از سیستم ایمنی را دارند و پاسخ ایمنی را مهار می‌کنند که هر دوی این ویژگی‌ها از نکات مهم در پیوند و سلول درمانی هستند. برای مطالعه بیشتر در این زمینه به مقاله مروری [۸۹] مراجعه نمایید.

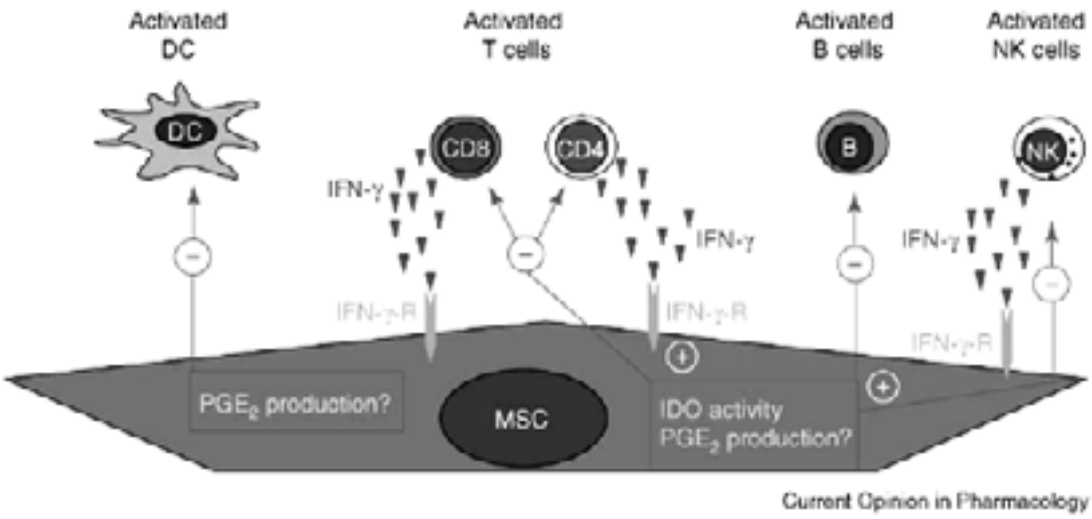
ایمنی گریزی سلولهای بنیادی مزانشیم

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که سلولهای مزانشیم پاسخ ایمنی قابل توجهی را در لنفوسیت‌های آلوژن ایجاد نمی‌کنند.

1- Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
2- Osteopontin
3- Osteocalcin
4- Adipsin

مکانیسم چگونگی رخ دادن این پدیده به طور کامل شناخته نشده است گرچه به میزان حضور HLA نوع دو و مولکولهای کمکی در سطح سلولهای مزانشیمی و البته مهار پاسخ ایمنی توسط این سلولها ربط داده می‌شود [۹۰]. اینکه سلولهای مزانشیمی فاقد MHC کلاس دو و بیان کننده MHC کلاس یک هستند به خوبی شناخته شده و تایید شده است، البته لی‌بلانگ (Le Blanc) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که این سلولها مولکول MHC کلاس دو را به صورت داخل سلولی بیان می‌کنند و در صورت القا با سایتوکاین اینترفرون گاما آن را در سطح خود بروز خواهد داد. جالب اینکه همین سلولهایی که با انترفرون گاما مواجه شده‌اند هم مانند سایر سلولهای MHC کلاس یک مثبت و کلاس دو منفی پاسخ ایمنی در لنفوسیت‌های آلوژن ایجاد نمی‌نمایند که این امر نقش مهم و اساسی انترفرون گاما را در مهار پاسخ ایمنی با واسطه سلولهای مزانشیم نشان می‌دهد [۹۱]. مطالعات سازگار با این یافته نشان داده‌اند که اضافه کردن آنتی‌بادی علیه گیرنده انترفرون گاما به محیط کشت از مهار پاسخ ایمنی به وسیله سلولهای مزانشیم روی سلولهای T، CD4+ و CD8+ و حتی سلولهای کشنده طبیعی ممانعت می‌کند [۹۲] (شکل ۱۳). و حتی در مطالعه دیگری نشان داده شده است که سلولهای بیان کننده MHC کلاس دو قادر به تحریک سیستم ایمنی نیستند. کشت همزمان سلولهای T با مزانشیم‌ها اگر چه با ترشح اینترفرون گاما بیان مولکولهای MHC کلاس دو را در سطح این سلولها افزایش می‌دهد اما به دلیل فقدان مولکولهای کمکی در سطح این سلولها همچنان قادر به ایجاد پاسخ ایمنی نخواهند بود. که این داده‌ها نشان دهنده این است که دور از دسترس بودن سلولهای مزانشیمی و عدم شناختشان توسط سلولهای ایمنی به فاکتوری غیر از MHC بستگی دارد. عدم بروز پاسخ ایمنی توسط سلولهای T بر علیه سلولهای مزانشیمی به بیان مولکولهای کمکی CD80 (B7-1) و CD86 (B7-2) در سطح سلولهای مزانشیم هم بستگی ندارد چرا که انتقال این مولکولها به سلولهای مزانشیم تاثیری در القای پاسخ ایمنی نداشته است. این داده‌ها می‌تواند در مورد اینکه عدم حضور مولکولهای کمکی در سطح مزانشیم‌ها را عامل گریز از سیستم ایمنی بدانیم، بحث برانگیز باشد گرچه هنوز مطالعات کاملی روی سایر مولکولهای کمکی مثل CD40 و لیگاند مربوطه آن که مطالعات، عدم حضورشان در سلولهای مزانشیم را نشان داده است، صورت نگرفته است [۱۸و ۹۳].

بنابراین این خصوصیت عدم تحریک پذیری سیستم ایمنی آلوژن توسط سلولهای مزانشیمی استفاده از آنها در مقایسه با سلولهای اتولوگ که به دست آوردنشان به زمان بیشتری نیاز دارد را در سلول درمانی توسعه داده است. البته الیپولوس (Eliopolous) و همکاران مقاله‌ای بحث برانگیز در مورد استفاده از سلولهای مزانشیمی در پیوندهای آلوگرافت ارایه داده‌اند. جالب اینکه وقتی سلولهای مزانشیم با لنفوسیت‌ها در حضور آنتی‌بادی تحریک کننده CD28 کشت داده می‌شوند، تکثیر سلولهای T دیده نمی‌شود. و این مساله به خوبی در پیوند اتولوگ سلولهای مزانشیم در بابون‌ها اثبات شده است که سبب ایجاد تحمل ایمونولوژیک می‌شوند. حتی اینکه سلولهای مزانشیمی توسط سلولهای کشنده طبیعی هم از بین نمی‌روند که نشان دهنده گریز سلولهای مزانشیم از شناسایی توسط این سلولهای کشنده است [۹٤].



شکل ۱۳. نقش انتفرون گاما در سرکوب ایمنی. سلولهای T فعال شده انترفرون گاما را ترشح می‌کنند که از طرفی با اتصال به گیرنده خود در سطح سلولهای مزانشیمی فعالیت بازدارنده خود را اعمال می‌کند. سلول های B فعال شده که به طور معمول از سلولهای مزانشیمی تاثیر نمی‌گیرند به این ترتیب و تحت تاثیر انترفرون گامای آزاد شده از سلول های T فعال تحت مکانیسم بازدارندگی سلولهای مزانشیم قرار می‌گیرند. سلولهای کشنده طبیعی این مسیر را با استفاده از تولید خود به خودی انترفورن گاما فعال می‌نمایند در حالی که سلولهای دندریتیک فعال با استفاده از مسیر پروستاگلندین E2 و شاید مسیرهای ناشناخته‌ی دیگری تحت تاثیر بازدارندگی مزانشیم قرار می‌گیرند.(برگرفته از منبع [۹۲])

موشهایی که با سلولهای مزانشیمی بینان کننده هورمون اریتروپویتین و ناسازگار از نظر MHC ، القا شده‌اند هیچ افزایش تقویت شده‌ای را در هماتوکریت نشان نداده‌اند. میزان سلولهای فعال ایمنی از قبیل سلولهای کشنده طبیعی، سلولهای CD8+ T و سلولهای T سایتوتوکسیک در نمونه‌های دریافت‌کننده سلولهای مزانشیمی در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشته است [۹٤]. در مقایسه در مطالعه‌ای که سلولهای مزانشیمی تمایز یافته به سلولهای استخوانی را به یک خرگوش متفاوت از نظر مولکول MHC پیوند زدند و نشان دادند که این سلولهای تمایز یافته سیستم ایمنی را با وجود حضور مولکول MHC کلاس دو تحریک نمی‌کنند که خود نشان دهنده این است که سلولهای T واکنشگر علیه سلول آلوژن یا حتی سلولهای T خاطره ایجاد نشده‌اند که این داده‌ها با مطالعات آزمایشگاهی که عدم ایمونوژنیسیتی سلولهای مزانشیم را ثابت کرده‌اند سازگار است.

میزان بیان آنتی‌ژن های MHC در سلولهای مزانشیم می‌تواند تحملی را در برابر پاسخ ایمنی به سلولهای بنیادی مزانشیم ایجاد نماید. به نظر می‌رسد حتی سلولهای مزانشیمی که فاقد آنتی‌ژن MHC کلاس یک هستند نیز قادر به تحریک سیستم ایمنی نیستند و بنابراین ایمونوژن نیستند. واکنش‌های محتمل سلولهای کشنده طبیعی با سلولهای مزانشیمی اگرچه پایداری سلولهای دهنده اتولوگ یا آلوژن را تحت تاثیر قرار می‌دهد اما خیلی زیاد وابسته به بیان HLA-I در سطح سلولهای زمینه‌ای است. فعالیت سلولهای کشنده طبیعی از طریق سیگنال‌ها و گیرنده‌های تحریکی و بازدارنده تنظیم می‌شود. به عنوان مثال می‌توان به گیرنده‌های تحریکی و یا فعال کننده‌ای مثل NKp30، NKp44، NKp46 که لیگاندهای آنها نامشخص است و حتی گیرنده‌های شبه لکتین از نوع C (NKG2D) و DNAM-1 اشاره نمود. گیرنده‌های شبه ایمونوگلوبولین کشنده (KIRs: Killer Immunoglobulin-like receptors) رسپتورهای مهاری اصلی در سطح سلولهای کشنده هستند که با آنتی‌ژن HLA آلوتایپ واکنش می‌دهند. وجود مولکولهای کلاس یک

در سطح سلولهای خودی منجر به اشغال جایگاه‌های گیرنده‌های KIRs شده و بنابراین فعالیت سلولهای کشنده طبیعی را مهار می‌کند. در حالیکه سلولهای سرطانی و سلولهای آلوده شده با ویروس به دلیل کاهش بیان مولکولهای MHC کلاس یک قادر به فعال کردن گیرنده‌های KIRs نبوده و در نتیجه در برابر فعالیت سایتوتکسیک سلولهای کشنده طبیعی نمی‌توانند مقابله نمایند [۱۷و ۹۳].

اسپاژیاری (Spaggiari) و همکاران نشان دادند که لیز با واسطه سلولهای کشنده طبیعی در پیوندهای آلوژن و اتولوگ این سلولها دیده می‌شود. آنها نشان دادند که سلولهای مزانشیمی لیگاندهایی مثل ULBP3، Nectin-2 و PVR که هرکدام با گیرنده‌های تحریکی متفاوت توسط سلولهای کشنده طبیعی شناخته می‌شوند ، را بیان می‌کنند. به علاوه مسدود کردن گیرنده‌ها با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال درگیر بودن گیرنده‌هایی مثل NKp30، NKG2D و DNAM-1 را نشان می‌دهد در حالی که NKp44 در این مورد درگیر نیست. شگفت انگیز اینکه مهار آنتی‌ژنهای HLA کلاس یک فعالیت لیتیک را افزایش نمی‌دهد که این خود ناشی از حضور کم و متوسط این مولکولها در سطح سلولهای مزانشیمی است [۹۵].

سلولهای مزانشیمی و ترمیم بافت

سلولهای مزانشیمی در مطالعات پری کلینیکال متعددی در ترمیم بافت استفاده شده‌اند. برای مثال ترمیم زخم با استفاده از سلولهای مزانشیمی توسط دانتزر (Dantzer) گزارش شده است [۹٦]. در مطالعاتی استفاده از سلولهای بنیادی مزانشیم انسانی و موشی در مدلهای موشی مبتلا به Bleomycin lung [۹۷] و صدمات نخاعی [۹۸] که بهبود را نشان داده‌اند گزارش شده است. که البته بیشترین مطالعه روی ترمیم بافت صدمه دیده قلب صورت گرفته است. (جدول ٤) سلول مزانشیمی تغییر ژنتیکی یافته که قابلیت بیان پروتئین Akt[1] را به دست آورده است بهبود عملکرد قلب را در مدل موشی نشان داده است. در مطالعه دیگری گرچه ترمیم سلولهای قلبی توسط تزریق سلولهای مزانشیمی گزارش نشده است اما درجاتی از بهبودی در عملکرد قلب دیده شده است. نچی(Gnecchi) و همکارانش نشان دادند که بهبود عملکرد قلب با تزریق سلولهای مزانشیمی تغییر یافته از نظر پروتئین Akt بعد از ۷۲ ساعت مشاهده می‌شود که البته به نظر می‌رسد به دلیل آثار پاراکراین مانند فاکتور رشد اندوتلیال رگی، فاکتور رشد فیبروبلاستی- ۲، فاکتور رشد هپاتوسیت، فاکتور رشد شبه انسولین-۱ و تیموزین بتا ٤ بویژه در شرایط کمبود اکسیژن باشد [۱۸].

1- Protein Kinase B

جدول ٤. مطالعات پاراکلینیک روی ترمیم بافت قلب

	Type of injection	Type of Cells	Number of Cells	Type of Animal	References
In Vivo assays	Direct injection	5-Aza treated MSCs	10^{6}	Rat	et al.[68]،Tomita
	Direct injection	BrdU labeled،5-Aza treated MSCs	100×10^{6}	Pig	et al [101]،Tomita
	Direct injection	Allogenic labeld MSCs	2×10^{6}	Rat	et al [102]،Dai
	Intracronary	Autologous labeled MSCs	----	Rat	et al [103]،Wang
	Direct injection	Autologous labeled MSCs	6×10^{7}	Pig	et al [104]،Shake
	Intramyocardial injection	Allogenic Labeled MSCs	100×10^{6}	Dog	et al [105]،Silva
	Endoventricular injection	Allogenic labeled	2×10^{8}	Pig	et al [106]،Amado
	Direct injection	، IGF، Pretreated with bFGF،Autologous BMP-2	$147 \pm 96 \times 10^{6}$	Dog	et al ،Bartunek [107]
	Direct injection	BM-derived cells c-kit+/lin-	0.24×10^{6} - 0.1×10^{6} cells	Mice	Orlic et al [108]
	Myocardial injection	Genetic engineered MSc (for Akt-1 Protein)	5×10^{6}	Rat	et al [109]،Mangi
	Intra coronary	Autologous MSCs	0.5×10^{6} / kg	Healthy Dog	et al [110], Vulliet
	Intramyocardial injection	Autologous BM-Derived	7×10^{5}	Rat	et al [111]،Yoon
	Direct injection	BM-MNCs	100×10^{6}	Rat	et al. ،Kamihata [112]
	Direct injection	Labeled Human MSCs	$0.5\text{-}1 \times 10^{6}$	Mice	et al. [113]،Toma c
	Direct injection	Transfected MSCs	----	Rats	et al. [114]،Bittira
	Direct injection to Scar tissue	hMSCs & Fetal cardiomyocyte	7×10^{6} cells hMSCs plus hFCs (1:1)	Pigs	et al. [115]،Min
	Direct injection	BMCs	20×10^{6}	Dog	Li et al. ،Hamano [116]
	Intracoronary	BMCs	100×10^{6}	Rabbits	et al. ،Thompson [117]
	Intravenous	MSCs	5×10^{6}	Lewis Rat	et al. [118]،Nagaya
	Intracoronary	MSCs	0.5×10^{6}	Dog	et al. [110]،Vulliet
	Intravenous	Labeled BM-MNCs	100×10^{6}	Rabbit	et al. [119]،Misao
	Intravenous	labeled allogeneic MSCs	$320 \pm 40 \times 10^{6}$	Pigs	Price et al. [120]
	Direct injection	MSCs	2×10^{6}	Rat	Hu et al. [121]
	Intravenus	Autologus MSCs	1×10^{6}	Porcine	Krause et al.[122]

آمادو (Amado) و همکاران نشان دادند که پیوند سلولهای مزانشیمی به بافت آسیب دیده قلب در آنها با استفاده از کاتتر نه تنها رد نشده است بلکه میزانی از بهبودی هم مشاهده شده است مطالعات بالینی در مورد استفاده از سلولهای مزانشیم آلوژن در حال انجام است [۹۹]. در مطالعه‌ی دیگری در رت استفاده از سلولهای مزانشیمی کشت داده شده و تزریق آنها به بافت اسکار قلب عملکرد قلب را در مقایسه با تزریق سلولهای فیبروبلاست نشان داده است. یکی از عوامل مهم موفقیت در درمان بیماریهای قلبی توانایی عبور سلولهای مزانشیم پیوند زده شده از سد اندوتلیال است. این امر مستلزم ارتباطات سلولی قوی بین سلولهای مزانشیم پیوند زده شده و سلولهای اندوتلیالی است که البته سلولهای مزانشیم توان عبور از این سد را دارا هستند [۱۰۰]. در حقیقت فرایند عبور سلولها از سد اندوتلیالی را می‌توان به ٤ مرحله تقسیم کرد: ۱) مجاور شدن با سلولهای اندوتلیال ۲) برقراری ارتباطات سلولی با سلولهای اندوتلیال از طریق پروتئین‌های سطحی ۳) توانایی داخل شدن در بین سلولهای اندوتلیال و ٤) عبور از این سلولها که مطالعات نشان داده‌اند سلولهای مزانشیم انسانی به دلیل ارتباط خوب سلولی که با سد اندوتلیال برقرار می‌کنند.

می‌توانند از این سد عبور کرده که این امر سلولهای مزانشیمی را یکی از کاندیداهای مناسب برای درمان بیماریهای قلبی عروقی کرده است [۱۰۰]. یکی از موارد مهم در نتیجه گرفتن از سلولهای مزانشیمی در درمان بیماریهای قلبی زمان استفاده و تزریق این سلولها بعد از سکته قلبی است که این امر در مطالعه‌ای که روی مدل حیوانی سکته قلبی (رت) صورت گرفته تفاوت تاثیر زمانی را به خوبی نشان داده است [۱۲۱].

تاکنون چهار مطالعه سلولهای مزانشیم را برای ترمیم بافت قلب انسان پیوند زده‌اند. در مطالعه اول که توسط چن (Chen) وهمکاران در سال ۲۰۰٤ به انجام رسید ٦۹ بیمار AMI و کاندید PCI به دو گروه ۳٤ و ۳۵ نفری تقسیم شدند. به یک گروه سلولهای مزانشیم به میزان $۸-۱۰\times۱۰^{۸}$ سلول پیوند زده شد و عملکرد قلب با گروه کنترل مقایسه و بهبود عملکرد قلب مشاهده شد [۱۲۳]. در مطالعه دوم که توسط کاتریتیس (Katritsis) و همکارانش در یونان صورت گرفته است ۲۲ بیمار با سابقه سکته اخیر قلبی وارد مطالعه شدند که ۱۱ نفر آنها در گروه درمانی و بقیه در گروه کنترل قرار داده شدند. بیماران گروه کنترل به روش ترانس کرونری ، سلولهای مورد نظر را دریافت کردند. لازم به ذکر است که در این تحقیق ۱۵ میلی لیتر از مغز استخوان بیماران را در ظروف کشت ریخته و بعد از سه روز محلول رویی آن که حاوی سلولهای غیر چسبنده بود را جدا کردند و کشت سلولها را تا یک هفته ادامه دادند و در نهایت بعد از یک هفته به میزان ۲ الی ٤ میلیون سلول چسبنده که مخلوطی از سلولهای مزانشیم و سلولهای پیش‌ساز رگ۱ بود را به بیماران پیوند زدند. پی‌گیری این بیماران کاهش WMSI ۲را در مقایسه با گروه کنترل و بهبود عملکرد قلب در ۵ بیمار از ۱۱ بیمار را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد [۱۲٤]. در مطالعه دیگری که توسط کاتریتیس و همکارانش انجام گرفته است نتایج تاثیر پیوند درون‌کرونری سلولهای مشتق از مغز استخوان و سلولهای مزانشیم و سلولهای پیش‌ساز رگ تکثیر داده شده در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفته است و در نهایت عدم ایجاد آریتمی در ۳ بیمار از بیماران پیوند زده شده گزارش شده است [۱۲۵]. در مطالعه سوم که نتایج آن توسط دکتر جوشاهیر (Jushahare) در کنگره American College of Cardiology's Innovation in Intervention: i2 Summit in New Orlean در ماه مارچ سال ۲۰۰۷ در آمریکا ارایه شد ایمنی و کارآیی نسبی کاربرد سلولهای بنیادی

1- Endothelial Progeitor Cells
2- Wall Motion Score Index

مزانشیم در بیماران قلبی دچار سکته اخیر قلبی در مقایسه با گروه کنترل گزارش شد. در این مطالعه دوسوکور تصادفی که در ۱۰ مرکز مختلف قلب در آمریکا انجام گرفت ، سلولهای مزانشیم اتولوگ در کل به ۵۳ بیمار که در ۳ گروه تقسیم شده بودند پیوند زده شد و هر گروه به ترتیب به تعداد ۰/۵، ۱/٦ و ۵ میلیون سلول مزانشیم به ازای هر کیلوگرم بدن حداکثر ۱۰ روز بعد از سکته قلبی و طی درمان مداخله‌گر[1] دریافت کردند و وضعیت این بیماران طی ٦ ماه با اکوکاردیوگرافی بررسی گردید. لازم به ذکر است که طی ٦ ماه هیچ عارضه‌ای در این بیماران مشاهده نشد و عملکرد قلب ایشان طی ٦ ماه پیگیری بهبود را نشان داد .

پیوند سلولهای بنیادی مزانشیم با هدف درمان

یکی از کاربردهای مهم سلولهای بنیادی مزانشیم استفاده از آنها در درمان بیماریها است و البته یکی از مشکلات استفاده از سلولهای مزانشیمی میزان نسبتا پایین و خیلی کم این سلولها در منابعی همچون مغز استخوان است بنابراین کشت و گسترش آنها در محیط آزمایشگاه و بالا بردن تعدادشان یکی از دغدغه‌های کارشناسان کشت سلول در مورد سلولهای مزانشیمی است. اخیرا استفاده از بیوراکتورها که در حقیقت کشت سلولها در میزان بالا را فراهم می‌آورند برای گسترش سلولهای مزانشیمی در محیط آزمایشگاه پیشنهاد شده است که به این ترتیب توانسته‌اند میزان این سلولها را در فاصله زمانی ۸ روز تا ۲۹ برابر میزان اولیه رشد دهند از آنجایی که در اکثر موارد کلینیک به میزان بالایی از این سلولها نیاز است بنابراین استفاده از بیوراکتورها می‌تواند یکی از بهترین راهکارها برای گسترش آنها باشد [۱۲٦].

1. Intervention

گرچه بیشتر توجهات پیوند سلولهای مزانشیمی بر GVHD[2] متمرکز شده است اما استفاده از سلولهای بنیادی مزانشیم آلوژن در درمان بیماری‌هایی که از طریق پیوند ارگان درمان شده‌اند مثل سندروم Hurler's (مایکوپلی ساکاریدوزیز نوع IH)[3] و لکودیستروفی متاکروماتیک (MLD)[1] نیز گزارش شده است. که این تزریق‌ها ایمن بوده و مشاهدات اولیه بهبودهایی را در این بیماران نشان داده است[۱۸]. مطالعات دیگری توسط هوروتیز (Horwitz) و همکاران نقش مثبت سلولهای مزانشیمی در درمان بیماران مبتلا به Osteogenesis imperfecta که یک بیماری ژنتیکی در کلاژن نوع یک است را نشان داده است [۱۲۷].

مطالعه فاز اول کلینیک برای استفاده از سلولهای مزانشیمی روی ۱۵ بیمار برای بررسی کارآمدی، جداسازی و تکثیر این سلولها در محیط و انتقال آنها از طریق رگ طراحی و انجام پذیرفته است. بیماران در ۳ گروه ۵ نفری به ترتیب ۱ میلیون، ۱۰ میلیون و ۵۰ میلیون سلول مزانشیم دریافت کردند و هیچ واکنش جانبی و عارضه‌ای در این بیماران دیده نشد. این سلولهای تزریقی از طریق رگ برای مدتی در گردش خون دیده می‌شوند که در حقیقت کاک (Koc) و همکاران سلولهای مزانشیمی را در ساعات اولیه پس از تزریق ردیابی نموده‌اند [۱۲۸]. این سلولها بعد از تزریق در بافتهای مختلفی لانه‌گزینی می‌کنند. پتانسیل ماندن سلولهای مزانشیمی در استخوان در پیوند درون رگی این سلولها در کودک مبتلا به Osteogenic imperfecta و یک بیمار مبتلا به آنمی آپلاستیک نشان داده شده است [۱۲۹] .

به دنبال پیوند آلوژن سلولهای بنیادی نشان داده شده است که کلیه سلولهای سیستم خون‌ساز و ایمنی بدن منشا سلولهای

2. Graft Versus Host Disease
3. Hurler's Syndrome

دهنده را نشان می‌دهند. شیمی درمانی با دوز بالا قبل از پیوند اتولوگ یا آلوژن سلولهای مزانشیمی، سبب تخریب بافت استرومای مغز استخوان شده و دوباره بازسازی آن را کاهش می‌دهد. این تخریب استروما می‌تواند در ماندگاری خون‌سازی بعد از پیوند اختلال ایجاد کند که احتمالا بازسازی استروما با استفاده از سلولهای مزانشیم پیوند شده از این امر جلوگیری می‌نماید [۱۲۹].

در اولین مطالعه برای پیدا کردن این مطلب که آیا سلولهای مزانشیم ماندگاری پیوند را در پیوندهای اتولوگ سلولهای بنیادی افزایش می‌دهد یا خیر، سلولهای مزانشیم از بیماران مبتلا به سرطان سینه که قرار بود از طریق تزریق به خون محیطی سلول دریافت کنند، جدا و کشت داده شد. ۲۸ بیمار ۱ الی ۲ میلیون سلول مزانشیم را از طریق رگ دریافت کردند که هیچ سمیتی دیده نشد و اینکه بهبود خون‌سازی سرعت گرفت. نتایج این مطالعه ایمن، راه را برای مطالعات آینده هموار کرده است[۱۲۹] .

سلولهای مزانشیم میزان بالایی از آریل‌سولفاتاز A و آلفا ال-ایدورونیداز را بیان می‌کنند که نقص در مولکول اولی عامل لکودیستروفی متاکروماتیک (MLD) و نقص در مولکول دومی بیماری Hurler's را سبب می‌شود. مزانشیم‌های جدا شده از فرد دهنده، از طریق رگ به بیماران مبتلا به MLD و بیماری Hurler's که قبلا سلول دریافت کرده بودند، تزریق گردید که این تزریق علایم آشکار بهبود در سرعت هدایت عصب[۲] را در ٤ بیمار از ٥ بیمار مبتلا به MLD نشان داد.

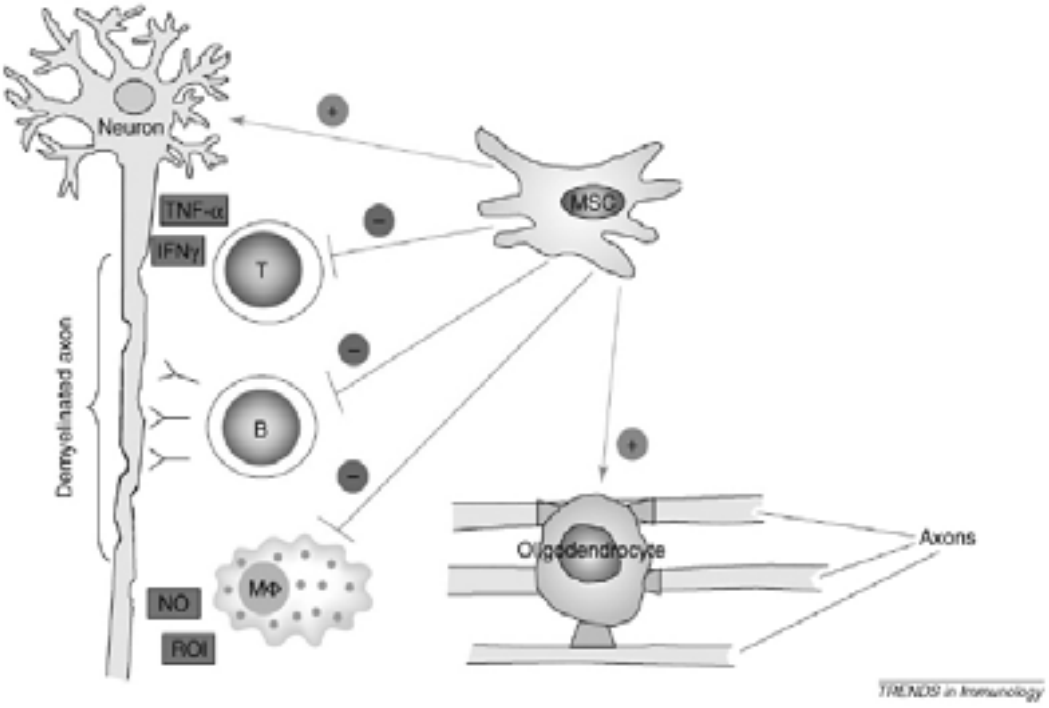
در مطالعه‌ی دیگر یک خانم ۲۰ ساله مبتلا به لوسمی میلوییید مزمن سلولهای بنیادی مشتق از خون پدر خود که از نظر هاپلوتایپ HLA یکسان بودند را به همراه سلولهای مزانشیم دریافت نمود. این بیمار خیلی سریع پیوند را قبول کرد و حتی GVHD حاد و مزمن را هم نشان نداد و تا ۳۱ ماه بعد از پیوند حال عمومی وی خوب بود و مشکل خاصی پیدا نکرد البته لازم به ذکر است که این بیمار یک نمونه منحصر به فرد با نتایج قابل توجه است که گزارش شده است.جالب این که در استفاده از پیوندهای یکسان از نظر هاپلوتایپ که سلولهای T از آنها حذف نشده است خطر علایم GVHD و حتی رد پیوند بسیار بالا است.در یک مطالعه بیمار مذکری که GVHD درجه ٤ علیه روده و کبد را بعد از پیوند آلوژن سلولهای بنیادی گرفته شده از یک فرد مونث که از نظر HLA، A، B و DR با وی سازگار بود نتایج خیره‌کننده‌ای را نشان داد [۱۲۹] .

مطالعاتی که روی تاثیر سلولهای مزانشیم در مدل حیوانی بیماری MS[۳] انجام شده است نشان داده است که در این مدل حیوانی (EAE)[٤] با تزریق سلولهای مزانشیم با القای تحمل سلولهای T ارگانهای لنفویید محیطی این بیماری را تعدیل می‌کند [۱۳۰]. مطالعات بیشتر در این زمینه نشان داده است که تزریق درون رگی سلولهای مزانشیم در این مدل حیوانی پاسخ سلولهای B پاتوژنیک را هم مهار می‌کند [۱۳۱] . بیماری MS و مدل حیوانی آن EAE در حقیقت با از بین رفتن غشای میلین سلولهای عصبی توسط سلولهای فعال ایمنی یعنی سلولهای T ، B و ماکروفاژها و ترشحات سلولهای مزانشیمی شناخته می‌شود. سلولهای مزانشیم به دو طریق از این آسیب جلوگیری می‌کنند ۱- با مهار سلولهای ایمنی و ۲-

1. Metachromatic leukodystrophy
2- nerve conduction velocity
3- Multiple Sclerosis
4- Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

با تاثیر مثبتی که از لحاظ تروفیک[1] روی نورونهـا و سـلولهای آستروسیت اعمال می‌کنند در مهار ایـن بیمـاری نقـش دارنـد (شکل ١٤) [۹۳].

1- Trophic



شکل ١٤. نحوه عملکرد دوگانه سلولهای مزانشیم در برخورد با بیماری EAE. MS و مدل موشی آن EAE با از دست دادن آکسون‌های نورونی شناخته می‌شوند. مکانیسمهای متفاوت ایمنی شامل سلولهای B، T و ماکروفاژها در این پدیده دخیل هستند که در این بین آنتی‌بادیها، سایتوکاین‌های مترشحه از ماکروفاژها و ... در این امر دخیل هستند. تزریق سلولهای مزانشیم سبب بهبود EAE می‌شود. همان طور که در شکل نشان داده شده است علاوه بر تاثیر شدید بازدارندگی (خطوط قرمز در تصویر) روی عملکرد سلولهای T، B و ماکروفاژها ، سلولهای مزانشیم روی نورونهای عصبی و الیگودندروسیت‌ها (خطوط سبز) اثر تروفیک دارند. (برگرفته از [۹۳])

پیش نیازهای تولید سلولهای مزانشیمی در مقیاس بالا برای کاربردهای بالینی

قبل از تولید سلولهای مزانشیمی در حجم بالا برای کاربردهای بالینی می‌بایست ٤ نکته را مدنظر داشت: مواد اولیه‌ای که استفاده می‌شود، غلظت سلولها در هنگام کشت دادن، تعداد پاساژ این سلولها و محیط مورد استفاده [۱۲۹]. البته لازم به ذکر است که امروزه استفاده از بیوراکتورها به دلیل تولید انبوه این سلولها در مدت زمان کوتاه ، در تکثیر و ازدیاد این سلولهای بسیار مورد توجه قرار دارد [١٢٦ و ۱۳۲].

موارد اولیه

سلولهای مزانشیم در بخش سلولهای تک‌هسته‌ای مغز استخوان قرار دارند که میزان آن یک سلول به ازای هر ۱۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ سلول است. بعد از جدا سازی سلولها با استفاه از شیب گرادیان سلولهای مزانشیمی به دلیل چسبندگی به ظروف کشت قابل شناسایی و افزایش هستند. اگرچه که سلولهای اندوتلیال و ماکروفاژها هم در محیط خاصیت چسبندگی دارند و ناگزیر می‌بایست با کشتهای مختلف حذف شوند. همان طور که ذکر گردید

منبع اصلی این سلولها مغز استخوان است اما در اینکه آیا این سلولها را می‌توان از منابع دیگری هم جدا کرد مطالعات ضد و نقیضی وجود دارد. با این حال از دیگر منابعی که حاوی این سلولها هستند می‌توان به نمونه خون بند ناف اشاره کرد که منبعی غنی از این سلولها است. جدا سازی سلولهای مزانشیم از خون بند ناف هم همانند جداسازی آنها از مغز استخوان است با این تفاوت که میزان این سلولها در بند ناف خیلی کمتر از مغز استخوان است (یک سلول به ازای هر 10^5 تا 10^8 سلولهای تک‌هسته‌ای) و می‌بایست نکاتی مانند حجم نمونه، فاصله زمانی گرفتن نمونه تا تخلیص سلولها و تعداد سلولهای تک‌هسته ای جدا شده را مد نظر قرار داد [۲۵].

مایع آمینیوتیک از دیگر منابع دسترسی به این سلولها است که سلولهای با فنوتیپ شبیه سلولهای جدا شده از مغز استخوان و با همان توان تمایزی در اختیار ما قرار می‌دهد [٤٧]. اگرچه که به نظر می‌رسد خون محیطی فاقد این سلولها باشد اما بعضی این سلولها از بعضی از منابع خون محیطی جدا شده‌اند ولی به طور معمول این سلولها در خون محیطی دیده نمی‌شوند. از دیگر منابع در دسترس برای جداسازی این سلولها بافت چربی است که سلولهای مزانشیم جدا شده از این بافت تمایز به سمت سلولهای اندوتلیال و قلبی را به خوبی نشان داده‌اند [۳۵]

غلظت سلولها در هنگام کشت دادن

توجه به میزان غلظت سلولها در هنگام کشت این سلولها یکی از نکات مهمی است که در توسعه و گسترش این سلولها در محیط آزمایشگاهی به همراه حفظ بقای توان تمایزی این سلولها باید در نظر داشت. اکثر تحقیقات و مطالعات بالینی استفاده از غلظت بالای این سلولها (170×10^3به ازای هر cm^2) در کشت اولیه را نشان داده‌اند چرا که در کشت اولیه این سلولها همراه سلولهای هماتوپویتیک خواهند بود و برای کشتهای بعدی این میزان کمتر خواهد شد (6×10^3 به ازای هر cm^2) [۱۲۸] . تغییر میزان غلظت سلولها از ۱۰ سلول به ازای هر سانتیمتر مربع به 10^3 سلول میزان رشد و توسعه این سلولها را۵۰۰ تا ۳۰ برابر کاهش می‌دهد و توان تشکیل کلونی این سلولها را از ۳٦ به ۱۳درصد می‌رساند. اما با توجه به اینکه در کاربردهای بالینی به دلیل نیاز به تعداد زیاد این سلولها عملا استفاده از غلظت اولیه ۱۰ سلول به ازای هر سانتیمتر مربع غیر ممکن است (زیرا برای به دست آوردن 10^8 سلول به سطحی معادلcm^2 4×10^4 نیاز داریم) پس به کار بردن دانسیته ۱۰۰۰ سلول به ازای هر سانتیمتر مربع کارساز خواهد بود [۱۳۳].

تعداد پاساژها

سلولهای مزانشیم به طور معمول در ظروف کشت پلاستیکی رشد داده می‌شوند و در حالت تلاقی با یکدیگر دارای بازدانگی معمولی رشد هستند. بعد از انتقال سلولهای تک‌هسته‌ای جدا شده از مغز استخوان و گسترش آنها در محیط کشت در بین این سلولهای مزانشیم سلولهای دیگری که خاصیت چسبندگی دارند مثل سلولهای اندوتلیال، لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها دیده می‌شوند. برای رهایی از این سلولهای ناخواسته و به دست آوردن جمعیت خالص از سلولهای مزانشیم نیاز به پاساژ های متعدد این سلولها است. البته باید مد نظر داشت که پاساژ سلولها به تعداد زیاد از کیفیت این سلولها می‌کاهد [۱۳٤]. لازم به ذکر است که در سلولهای مزانشیم جدا شده از رت توان تکثیر و تمایز خود را تا پاساژ ۱۵ حفظ می‌نمایند. در مورد سلولهای انسانی این سلولها بعد از ۳ هفته کشت اولیه و پاساژ ۱۳ تا ۱۵ میزان تکثیر و توان تمایزیشان

کاهش می‌یابد به طوری که تنها توان تمایزی بـه اسـتخوان را حفظ می‌نمایند [۱۳۵]. و جالب اینکـه ایـن تغییـرات در سلولهای جدا شده از مغـز اسـتخوان افـراد بـالغ بیـشتر از سلولهای جدا شده از کودکان نمود دارد. پیری این سـلولها در محیط کشت و بعد از پاساژ دادن‌های متعـدد مـی‌توانـد ناشی از کوتاه شدن طول تلومر در این سلولها باشد [۱۳٦].

محیط کشت

محیط کشت نیز یکی از مواردی است که در گسترش ایـن سلولها در کاربردهای کلینیکـی بایـد مـدنظر قـرار بگیـرد. محیطهایی که به طـور معمـول اسـتفاده مـی‌شـوند محـیط DMEM و یا MEM-α هستند که با سرم گاوی و یا انسانی و فاکتورهای رشد غنی شـده‌انـد. بـه طـور معمـول بـرای گسترش این سلولها در محیط کـشت حـداقل نیـاز بـه ۱۰ درصد سرم است اگر چه سـرم هـایی کـه در کـشت ایـن سلولها استفاده می‌شـوند عـاری از هـر گونـه میکـروب و ویروس گزارش شده‌اند اما نکته‌ای که باید مد نظر داشـت این است که این سرم می‌تواند عامل بیماریهای ناشـناخته و حتی جنون گاوی باشد. و جالب اینکه سـلولهای مزانـشیم در این شرایط کشت می‌توانند تا حدودی پروتئین‌های سرم را به درون خود جذب و نگهداری نمایند کـه بعـدها ایـن پروتئین‌ها می‌تواند به عنوان ایمونوژن در زمان پیونـد ایـن سـلولها عمـل نماینـد و ایـن امـر در برخـی مـوارد پیونـد سلولهای مزانشیم گزارش شده است که آنها به دلیل پاسـخ ایمنی همورال فرد گیرنده دفع شـده‌انـد[۱۳۷].ایـن مـوارد نشان می‌دهد که برای ایمن بـودن اسـتفاده از ایـن سـلولها می‌بایست شرایط کشت و گسترش این سلولها بـدون نیـاز به سرم فراهم گردد و یا اینکه بتوان از جایگزین‌های سـرم در کشت ایـن سـلولها اسـتفاده کـرد. بعـضی از مطالعـات استفاده از سرم اتولوگ یا سرم فرد با گروه خونی AB را به عنوان جایگزین سرمهای حیوانی گـزارش کـرده‌انـد [۱۳۸] که البته سلولهایی که در این شرایط کـشت داده مـی‌شـوند ناکارآمدتر هستند که البته غنی کـردن سـرم AB بـا فـاکتور رشدی مثل FGF-2[1] این مشکل را رفع نموده است. اگرچـه این سـلولها در محـیط حـاوی ۱۰ درصـد سـرم عـاری از هرگونه فاکتور رشد کـشت داده مـی‌شـوند کـه البتـه ایـن فاکتورهای رشد از عوامل مهم در گسترش این سـلولها بـه خصوص در محیطهای فاقد سرم هـستند. محیطهـای فاقـد سرم در محدوده تحقیقات ایجاد شـده اسـت امـا هنـوز در محدوده کاربردهای کلینیک این سلولها به دلیل مغایر بودن با GMP[2] کاربرد ندارند. فاکتورهای رشد مـورد نیـاز بـرای گسترش و کشت این سلولها به درستی شناخته نشده‌اند اما فاکتور مشتق از پلاکت (PDGF)، فـاکتور رشـد اپـی‌درمـال (EGF) ، TGFβ فاکتور رشد شبه انسولین (IGF)[3] و فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF-2) هستند. از بین این فاکتورهـای رشد به نظر می‌رسد که فاکتور رشـد FGF2 غالـب‌تـرین و اثرگـذار تـرین فـاکتوری اسـت کـه در زیـست شـناختی سلولهای مزانشیم نقش و کاربرد اساسی دارد. ایـن فـاکتور FGF-2 تکثیر تمام سلولهای مـشتق از مـزودرم را تحریـک می‌کند به طوری که خاصیت بازدارندگی این سلولها در حـین رشد و تماس را از بین برده و سلولها می‌توانند به جـای تـک لایه به صورت چند لایه رشد نمایند [۱٤۲-۱۳۹].

مثالهـــایی از جداســـازی و روشـــهای کـــشت سلولهای مزانشیمی مـشتق از مغـز اسـتخوان جداسازی و کشت سلولهای مزانـشیمی مـشتق از مغز استخوان Rat

سلولهای مزانشیمی از مغز استخوان rat ۲ تا ٤ ماهه با وزن

1- Fibroblast Growth Factor-2
2- Good Manufacturing Practice
3- Insulin Like Growth Factor

۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم جدا می‌شود. بعد از جدا کردن اپی‌فیز و در دسترس قرار گرفتن حفره مغز استخوان کل حجم مغز استخوان با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی لیتری و در محیط DMEM-LG که با ۱۰ درصد FBS غنی شده است و حاوی ۱ درصد آنتی بیوتیک و مواد ضد قارچی است، جمع‌آوری می‌شود. میزان FBS به کار رفته برای تکثیر و تمایز سلولهای مزانشیم رت مورد نیاز است. نمونه مغز استخوان با استفاده از سوزنهای ۱٦، ۱۸ و ۲۰ که به سرنگهای ۱۰ میلی‌لیتری اتصال یافته‌اند جمع‌آوری می‌شوند. سوسپانسیون سلولی حاصل را می‌بایست به مدت ۵ دقیقه و با دور rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ نموده و مجددا در محیط کشت سوسپانسیون نمایید. سپس بعد از شمارش سلولها که برای این کار از حجم کمی از این سوسپانسیون به همراه اسید استیک ٤ درصد برای حذف گلبولهای قرمز استفاده می‌شود ، سلولها را به میزان ۵×۱۰^{۷} سلول در یک دیش ۱۰۰ میلی‌متری و در انکوباتور CO_2 کشت داده و هر ۳ الی ٤ روز محیط آن را عوض می‌نماییم.به طور معمول سلولها به مدت ۱۲ الی ١٤ روز به صورت کشت اولیه باقی می‌مانند.

هنگامی که کلونیهای بزرگ سلولها ایجاد گردید (تقریبا ۸۰ تا ۹۰ درصد confluence) آنها را با استفاده از PBS دوبار شستشو داده و سلولها را به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه با تریپسین تیمار می‌نماییم. بعد از سانتریفیوژ و شمارش سلولها آنها را به میزان ۵×۱۰^{۷} سلول در یک دیش ۱۰۰ میلی‌متری کشت می‌دهیم که به این کشت پاساژ اولیه می‌گوییم. لازم به ذکر است که روشهای جداسازی و کشت سلولهای بنیادی مشتق از مغز استخوان تقریبا همان روش عمومی ارایه شده به وسیله فریدن اشتاین است که به طور وسیعی استفاده از آن گسترش یافته است. [۱]

جداسازی و کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان

نمونه مغز استخوان از استخوان ایلیاک به دست می‌آید. برای به دست آوردن جمعیت یکنواخت‌تری پیشنهاد می‌شود که با استفاده از ترکیب (RosetteSepTM) غنی‌سازی این سلولها (۵۰ میکرولیتر از این ماده به ازای هر ۱ میلی لیتر از مغز استخوان و یک انکوباسیون ۲۰ دقیقه‌ای مورد نیاز است) صورت پذیرد. این ترکیب(RosetteSepTM) در حقیقت ترکیبی از آنتی بادی‌های منوکلونال علیه شاخصهای سلولهای هماتوپویتیک مثل CD3، CD14، CD19، CD38، CD66b و گلیکوفورین A است که به این ترتیب در حقیقت جمعیت سلولهای هماتوپویتیک به همراه سلولهای متعهد مغز استخوان و گلبول‌های قرمز از نمونه حذف می‌شوند. بعد از انکوباسیون مغز استخوان با RosetteSepTM ، می‌بایست ۲ بار با PBS حاوی ۲درصد FBS و EDTA ۱ میلی مولار،به همراه مخلوط شدن آرام ، شستشو داده شوند. بعد از این مرحله نمونه‌های رقیق شده را می‌توان با استفاده از شیب غلظتی (Ficoll یا Percoll) به مدت ۲۵ دقیقه در دور g ۳۰۰ سانتریفیوژ نمود. بعد از سانتریفیوژ لایه حاوی سلولهای مورد نظر را جدا کرده و بعد از شستشو با PBS در محیط کشت مربوطه سوسپانسیون می‌نماییم. این روش انتخاب منفی در حقیقت به ما کمک می‌کند که در نهایت یک جمعیت یکنواخت‌تری از سلولهای مزانشیمی را در محیط کشت داشته باشیم[۱۷].

برای کشت و تکثیر این سلولها در محیط آزمایشگاه نیاز به مواد اولیه‌ای است که اهم آن در جدول ۵ بیان شده‌اند.

جدول ۵. مواد اولیه و مورد نیاز

ردیف	ماده یا دستگاه	شرکت	شماره کاتالوگ
۱	فایکول [1]	Inno-train	D-61476
۲	بافر PBS	Gibco	21600-051
۳	دکسامتازون	Sigma	D4902
٤	بتا گلیسروفسفات	Sigma	G9891
٥	اسید آسکوربیک ۲ فسفات	Sigma	A8960
٦	3-Isobutyl-1-methylxanthine	Sigma	I5879
۷	ایندومتاسین	Sigma	I-8280
۸	DMSO	Sigma	D2650
۹	DMEM-HG	Gibco	12800-116
۱۰	DMEM-LG	Gibco	31600-083
۱۱	Nile red	Sigma	N3013
۱۲	BSA	Sigma	A9418
۱۳	سرم گاوی [2]	Gibco	10270-106
۱٤	Trypsin-EDTA	Gibco	25300-054
۱٥	ρ-nitrophenyl phosphate	Sigma	N3254
۱٦	رنگ Fast Violet	Sigma	F1631
۱۷	Rosettesep	Stem Cell echnologies	15128
۱۸	5-Aza-2'-deoxycytidine	Sigma	A 365
۱۹	5-Azacytidine	Sigma	A 2385
۲۰	Penicillin/Streptomicine	Gibco	15070-063

1- Lymphodex
2- Fetal Bovine Serum

۲۱	L-glutamine 200mM (100x)	Gibco	25030-024

روشهای جداسازی و کشت سلولهای مزانشیم

آماده سازی محیط و مواد

شیب غلظتی

روش کار آماده سازی شیب غلظتی Percoll

مواد مورد نیاز

استریل

Percoll

کلرید سدیم ۱/۵ مولار

محلول نمکی Tyrode یا Hanks (TBSS or HBSS) یا PBS

لوله‌های فالکون ۵۰ میلی لیتری

غیر استریل

دستگاه سانتریفیوژ

روش کار

مواد استریل زیر را زیر هود به نسبت و مقدار ذکر شده با هم مخلوط نمایید

۲۲/۰۵ ml از Percoll

۲/٤٥ ml از کلرید سدیم ۱/۵ مولار

۱۰/۵ ml از TBSS یا HBSS

این مواد را خوب با هم مخلوط نمایید (در لوله ۵۰ میلی لیتری)

این لوله (ها) را در ۲۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای معمولی سانتریفیوژ نمایید.

آنها را در ٤ درجه سانتی گراد تا زمانی که بعدا استفاده خواهند شد نگهداری نمایید

محلولهای مورد نیاز برای تمایز به سلولهای استخوانی در محیط آزمایشگاه

دکسامتازون[1] (dex)

یک محلول اولیه از دکسامتازون را با غلظت ۱۰-۳×۱ مولار در اتانول ۱۰۰درصد آماده نمایید. (۳/۹۲ میلی‌گرم از دکسامتازون را در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۱۰۰٪ حل نمایید).

محلول دکسامتازون را با رقت ۱/۱۰۰ از محلول اولیه در محیط کشتی که استفاده می‌نمایید آماده نمایید. (غلظت ۱۰-۵×۱ مولار)

محلول حاصل را با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری فیلتر نموده و در۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

بتا گلیسروفسفات[2] (BGP)

محلول ۲۰۰ میلی مولار این ماده را با حل کردن ۰/۲۱٦ گرم از آن در ۵ میلی‌لیتر TBSS یا هر محلول نمکی متعادل دیگر حل نمایید.

با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل نمایید و در دمای٤ درجه سانتی گراد ذخیره نمایید.

اسید آسکوربیک ۲ فسفات[3]

از این ماده محلول ۵ میلی مولار را با حل کردن ۰/۰۳٤۷ گرم از ماده در ۱۰ میلی لیتر TBSS یا هر محلول نمکی متعادل دیگر حل نمایید.

با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل نمایید و در دمای ٤ درجه سانتی گراد ذخیره نمایید.

محلولهای مورد نیاز برای بررسی کمی و

1- Dexamethasone
2- β-Glycerophosphate
3- Ascorbic Acid 2-Phophate

بیوشیمیایی آلکالاین فسفاتاز

بافر سوبسترا

گلایسین ۵۰ میلی مولار، MgCl2 ۱ میلی مولار، بـا pH ۱۰/۵ : که برای تهیه این محلول ۱/۸۸ گرم گلایسین و ۰/۱۰۱۷ گـرم MgCl2.6H2o را در ۵۰۰ میلی لیتر آب حل نمایید. و pH را بـا استفاده از هیدروکسید سدیم ۱ نرمال به ۱۰/۵ برسانید.

آماده نمودن سوبسترا

۱ قـرص ۵ میلـی گرمـی از سوبـسترای فـسفاتاز یعنـی (ρ-nitrophenyl phosphate) در ۵ میلـی لیتـر بـافر سوبـسترا حـل نمایید.

ρ-nitrophenol برای رسم نمودار استاندارد

محلـول ۵۰μM ایـن مـاده را از ترکیـب ۵۰ μl از محلـول اسـتاندار اولیـه بـا غلظـت ۱۰ mM و ۹/۹۵ میلـی لیتـر از هیدروکسید سدیم ۰/۰۲ نرمال آماده نمایید. سـایر غلظتهـای مورد نیاز را با استفاده از جدول زیر به دست آورید.

ρ-nitrophenol غلظت مورد نیاز بر حسب nmol/ml	حجم (میلی لیتر) از محلول رقیق شده با غلظت ۵۰μM	حجم (میلی لیتر) از هیدروکسید سدیم ۰/۰۲ نرمال
٤/٥	۰/۱	۱/۰
۹/۰	۰/۲	۰/۹
۱۸	۰/٤	۰/۷
۲۷	۰/٦	۰/۵
۳٦	۰/۸	۰/۳
٤٥	۱/۰	۰/۱

محلولهای مورد نیاز برای آزمایش کیفی آلکالاین فسفاتاز

رنگ Fast Violet

یک کپسول از رنگ فوق را در ٤۸ میلی لیتر آب حـل نماییـد. سپس این محلول را در قسمتهای ۱۲ میلـی لیتـری نگهـداری نمایید.

محلول کار سیترات

۲ میلی لیتر از محلول غلیظ سیترات را بـه ۹۸ میلـی لیتـر آب اضافه نمایید.

بافر استون سیترات

٦۰ درصد از محلول کار را با ٤۰ درصد استون مخلوط نمایید.

محلولهای مورد نیـاز بـرای تمـایز بـه سـلولهای چربی و آنالیز فلوسایتومتریک

محیط القا کننده به سلولهای چربی

3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) و ایندومتاسین[1] :

۰/۱۷۸۹ گرم ایندومتاسـین را بـه همـراه ۰/۵۵۵ گـرم IBMX مخلوط کرده.

به آن ۵ میلی لیتـرDMSO ۲ اضـافه نماییـد. بـه ایـن ترتیـب غلظت ۰/۱ مولار ایندومتاسین و ۰/۵ مولار IBMX بـه دسـت می‌آید.

۰/۵ میلـی لیتـر از ایـن محلـول را بـه۵۰۰ میلـی لیتـر محـیط DMEM-HG ۳ اضافه نمایید که به این ترتیب غلظت ۱۰۰ μM ایندومتاسین و غلظت ۵۰۰ μM از IBMX به دست می‌آید.

محلول اولیه را در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره نمایید.

1- Indomethacin

۲- دی‌متیل سولفوکسید

3- Dulbeco's Modified Eagle's Medieum- High Glucose

انسولین

محلول ۱۰ mg/ml از انسولین گاوی را در اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال تهیه نمایید.

۰/٦ میلی لیتر از آن را به ۱۱/٤ میلی لیتر DMEM-HG اضافه نمایید.(۰/۵ mg/ml)

۱۰ میلی لیتر از آن را به ۵۰۰ میلی لیتر DMEM-HG برای به دست آوردن غلظت نهایی ۱۰ µg/ml اضافه نمایید.

این محلول را با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل نمایید و در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

دکسامتازون

محلول اولیه با غلظت ۳-۱۰ از دکسامتازون را در اتانول ۱۰۰ درصد آماده نمایید. (۰/۰۰۳۹۲ گرم از دکسامتازون را در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۱۰۰ درصد حل نمایید).

۰/۵ میلی لیتر از آن را به ۵۰۰ میلی لیتر DMEM-HG اضافه نمایید تا به غلظت ٦-۱۰ این ماده دست پیدا کنید.

آن را با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل نمایید و در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

محلول کار رنگ Nile Red

محلول ۱ mg/ml از این ماده را در DMSO آماده نمایید.

۲۵۰ میکرولیتر از این محلول را به حجم نهایی ۱۰ میلی لیتر در -PBS (PBS فاقد یونهای منیزیم و کلسیم)

جداسازی سلولهای مزانشیمی مغز استخوان انسان (hMSCs)

آسپیزاسیون مغز استخوان

آسپیزاسیون مغز استخوان از استخوان ایلیاک صورت می‌گیرد.

جمع آوری مغز استخوان انسان

مواد اولیه

استریل

بتادین

لیدوکائین ۱ درصد

اسکالپل با شماره ۱۵

سوزن جمشیدی شماره ۱۱

سرنگ ۲۰ میلی لیتری که حاوی ۲ میلی لیتر هپارین باشد

روش کار

دهنده مغز استخوان که برای این کار اطلاع رسانی شده است به پشت خوابانیده می‌شود.

با استفاده از بتادین ناحیه مورد نظر را ضد عفونی می‌نماییم.

استخوان مورد نظر یعنی ایلیاک کرست۱ را مشخص می‌نماییم.

با استفاده از لیدوکائین ۱٪ محل مورد نظر را بی حس می‌نماییم (در صورت نیاز به حجمهای بالای ۲۰۰ میلی‌لیتر نیاز است تا از بیهوشی عمومی برای فرد استفاده گردد).

و یک برش کوچک در ناحیه مورد نظر ایجاد می‌نماییم.

سوزن جمشیدی شماره ۱۱ را در استخوان مورد نظر فرو می‌بریم.

سرنگ ۲۰ میلی لیتری را به سوزن وصل نموده

نمونه مغز استخوان را جمع آوری می‌کنیم.

سوزن را هر بار ۹۰ درجه می‌چرخانیم و نمونه گیری را انجام می‌دهیم (در صورت جمع‌آوری حجمهای بالای ۲۰۰ میلی‌لیتر بهتر است تا از چند نقطه نمونه برداری نماییم).

1- Illiac Crest

غنی‌سازی[1] سلولهای مزانشیم مغز استخوان

بخش سلولی حاوی سلولهای مزانشیمی بـا اسـتفاده از شـیب غلظتی به دست می‌آید.

روش کار

مواد مورد نیاز

استریل

DMEM-LG ۲ حاوی FBS ۱۰درصد: محیط کـشت DMEM به همراه g/l ۱ گلوکز که با ۱۰ درصد FBS غنی شده است . از FBS برای تکثیر و تمایز سلولهای مزانشیمی استفاده مـی‌شـود [۱٤۳].

لوله‌های ۵۰ و ۱۵ میلی لیتری فالکون

فلاسک هـای کـشت سـلولی (cm2 ۷۵) یـا پتـری دیـش ۱۰ سانتیمتری

نکته ایمنی: شخصی که در حال کار کـردن بـا ایـن سـلولهای انسانی اسـت مـی‌بایـست روپـوش آزمایـشگاهی، دسـتکش، عینک، ماسک جراحی استفاده نماید و در زیر هـود کـلاس II کار کند.

در هنگام کار با کلیه سلولهای مشتق از مغز استخوان بایـد بـه نکات ایمنی از لحاظ زیستی توجه نمود. همیـشه مـی‌بایـست فرض کرد که این نمونه‌ها با ویروس هپاتیت و ویروس ایـدز آلـوده هـستند بنـابراین از مخـزن مناسـب کـه حـاوی مـاده ضدعفونی کننده است برای اوت کردن کلیـه ابزارهـای تیـز و معمولی که در حین کار با این نمونه هـای انـسانی در ارتبـاط بوده‌اند استفاده نمایید. بهتر است از غلظـت ۲۰ درصـد مـایع ضدعفونی کننده استفاد نمایید و موارد اسـتفاده شـده حـداقل نیم ساعت در آن باقی بمانند.

1- Enritchment
2- Dulbeco's Modified Eagle's Medium – Low Glucose

روش کار

نمونه‌های مغز استخوان معمولا در سرنگهای ۲۰ میلی لیتـری انتقال داده می‌شوند. بنابراین آنها به لوله‌های ۵۰ میلـی لیتـری انتقال دهید.

۲۰ تا ۳۰ میلی لیتر از محـیط کـشت را بـه آن اضـافه نماییـد. (DMEM-LG-10FB)[3]

آن را با استفاده از پیپت به طور کامل مخلوط نمایید و حجـم کمی از آن حدود ۲۰۰ میکرولیتر را برای شمارش سلولی نگه داشته و بقیه را به مدت ۵ دقیقه و با دور g ٤۵۰ سـانتریفیوژ نمایید.

در حالیکـه سـانتریفیوژ صـورت مـی‌گیـرد ۵۰ میکرولیتـر از سوسپانسیون باقی مانده را بـا ۵۰ میکرولیتـر محـیط کـشت و ۱۰۰ میکرولیتر اسید استیک ٤ درصد بـرای حـذف گلبولهـای قرمز مخلوط نمایید.

سلولها را با استفاده از لام نئوبار شمارش نموده و میزان آن در حجم اولیه را محاسبه نمایید.

بعد از اتمام سانتریفیوژ محلول رویی را دور بریزید.

سلولها را در شیب غلظتی Percoll که قبلا آماده نموده‌اید و یـا فایکول قرار دهید تا سلولهای تک‌هسته‌ای را جدا نمایید.

۵ میلی لیتر ازسوسپانسیون سلولها را به آرامی در هـر لولـه Percoll یا فایکول قرار دهید به طوری که روی آن قرار بگیرد. لولـه‌هـا را بـه مـدت ۱۵ دقیقـه و در دور g ٤۸۰ سـانتریفیوژ نمایید.

نمونه ها را بعد از سانتریفیوژ به زیر هـود انتقـال داده و ۱۰ الی ١٤ میلی لیتر از محلول رویی هر لوله را به لوله‌ی جدیدی انتقال دهید.

3- Dulbeco's Modified Eagle's Medium – Low Glucose + 10 % Fetal Bovine Serum

حجم آن را با استفاده از محیط کشت به ۵۰ میلی لیتر برسانید.
و مجددا آن را به مدت ۵ دقیقه و در دور g ٤٥٠ سانتریفیوژ نمایید
محلول رویی را دور ریخته و رسوب سلولی را در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت سوسپانسیون نمایید.
تعداد سلولها را با استفاده از روش قبلی که توضیح داده شد محاسبه نمایید.
حجم مورد نظر را با استفاده از محیط کشت به میزان مورد نظر رسانیده و سلولها را به میزان $۱/۸ \times ۱۰^{۵}$ به ازای هر سانتیمتر مربع در ظروف کشت یا فلاسک کشت دهید.
ظروف را در انکوباتور قرار دهید.
محیط آنها را بعد از ۳ روز عوض نمایید و این کار را هر ۳ یا ٤ روز انجام دهید.

کشت اولیه

کشت اولیه سلولهای مزانشیمی با کشت ۱×۱۰^{۷} تعداد سلول به ازای هر دیش ۱۰ سانتیمتری کشت سلولی کشت دهید. این مایع سلولی حاوی مخلوطی از سلولها است که شامل سلولهای خونی قرمز، سلولهای هسته‌دار رده هماتوپویتیک، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلولهای شبه فیبروبلاست است. گلبولهای قرمز و سفید به دلیل نچسبیدن به ظروف کشت در طی مراحل تعویض محیط خارج می‌گردند. خارج کردن سلولهایی که به ظروف کشت نمی‌چسبند خیلی سخت نیست ولی باید این نکته را مد نظر داشت که همین سلولها اثرهای پاراکراین برای رشد سلولهای چسبیده به ظرف را دارا هستند..
این خاصیت چسبندگی سلولها به ظروف کشتی که از لحاظ بار الکتریکی منفی هستند یکی از راههای جداسازی و انتخاب سلولهای فیبروبلاستی است [١٤٤]. سلولهای کمی به ته ظرف می‌چسبند و این سلولهای شبه فیبروبلاست تکثیر می‌یابند و کلونی های بی‌قاعده‌ای از سلولهای دوکی شکل تشکیل می‌دهند که در روزهای ٤ و ٦ بعد از کشت قابل تشخیص هستند. کلونیها از نظر اندازه در طی ۷ روز آینده رشد کرده و به حدی می‌رسند که می‌بایست به ظروف جدید انتقال داده شوند (پاساژ سلولی). باید در نظر داشت که پاساژ سلول ها قبل از اینکه خیلی متراکم و یا چند لایه شوند انجام پذیرد چرا که رشد این سلولها محدود به تماس سلولی نیست و به رشد خود ادامه خواهند داد.

روش کار کشتهای بعدی از سلولهای مزانشیم انسانی

مواد مورد نیاز

استریل
محلول نمکی Tyrode یا Hanks یا PBS
Trypsin-EDTA : ۰/۲۵ درصد تریپسین و EDTA ۱ میلی مولار
سرم گاوی
محیط کشت DMEM-LG غنی شده با ۱۰ درصد FBS

روش کار

سلولهای اولیه جدا شده مزانشیمی می‌بایست قبل از اینکه کلونیها متراکم شوند پاساژ داده شوند. سلولهای کشت داده شده معمولا در روز ١٤ بعد از کشت (۳± روز) تریپسینه می‌شوند.
محیط کشت را از روی سلولها بردارید.
سلولها را با استفاده از حجم مناسب محلول نمکی شستشو دهید. (ظرف کشت ۱۰ سانتیمتری به ۵ میلی لیتر محلول نمکی نیاز دارد)
به میزان ٤ میلی لیتر Trypsin-EDTA به سلولها اضافه کرده و ظروف را به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار دهید. در

نظر داشته باشید که زمان مجاورت با تریپسین به حداقل رسانیده شود.

بعد از اینکه اکثر سلولها از نظر مورفولوژی گرد شدند یا اینکه از ظرف جدا شده بودند، واکنش را با استفاده از سرم گاوی یا محیط کشت به میزان ۲ میلی لیتر متوقف نمایید.

با استفاده از یک پیپت سوسانسیون سلولی را بالا کشیده و با استفاده از همان قسمتهای مختلف ظرف کشت را برای جدا کردن سلولهای باقیمانده شستشو دهید. در نظر داشته باشید که لزومی ندارد تا تمام سلولها از کف ظرف جدا گردند چرا که خیلی از سلولهایی که به نظر می‌رسد مزانشیم نباشند نسبت به تیمار با تریپسین مقاوم‌تر هستند. بنابراین دقت در این مرحله (استفاده از تریپسین) بعد از شیب گرادیان و چسبیدن سلولها به ظرف یکی از مراحل مهم در جداسازی و غنی سازی سلولهای مزانشیمی است که باید در آن خیلی دقت کرد.

سوسپانسیون سلولی را به لوله‌های جدید برای سانتریفیوژ انتقال دهید. در نظر داشته باشید که درهنگام کار با حجم بالای کشت و استفاده از تعداد بیشتری ظروف کشت سلولهای آن ها را به طور جداگانه و به شکل گروهی با هم مخلوط نمایید و سانتریفیوژ نمایید تا به این ترتیب از آلودگی کلی سلول ها جلوگیری نمایید. در ضمن برای هر گروه از پیپیت‌های جداگانه استفاده نمایید.

لوله‌ها را به مدت ۵ دقیقه در دور g ٤٠٠ سانتریفیوژ نمایید.

محلول رویی را دور بریزید.

رسوب سلولی حاصل را در حجم مناسبی از محیط کشت دوباره سوسپانسیون نمایید (معمولا ۵ تا ۱۰ میلی لیتر)

حجم کمی از این سوسپانسیون را برای شمارش سلولها استفاده نمایید.

حجم مورد نظر خود را با استفاده از محیط کشت آماده نمایید و سلولها را به میزان ۳۰۰۰ تا ٤٠٠٠ سلول به ازای هر cm^2 به ظرف کشت جدید انتقال دهید.

محیط آن را هر ۳ الی ٤ روز تعویض نمایید.

سلولها را بعد از این که از نظر رشد و تلاقی به میزان مناسب رسیدند۱ ، پاساژ دهید. در نظر داشته باشید که این سلولها نسبت به سلولهای کشت اولیه در برابر تریپسین حساس تر هستند و بنابراین زمان تیمار با تریپسین کاهش می‌یابد.

سلولهای بنیادی مزانشیمی ظرفیت بالایی برای تکثیر دارند و می‌توانند به مدت زیادی کشت و پاساژ داده شوند. در طی گسترش و تکثیر این سلولها همواره در محیط کشت DMEM-LG غنی شده با ۱۰FBS درصد کشت داده می‌شوند که در این شرایط بدون تمایز به تکثیر خود ادامه می‌دهند. Burder و همکارانش در سال ۱۹۹۷ توانستند این سلولها را تا پاساژ ۱۵ حفظ نمایند. حفظ اطلاعات دقیق از شمارش و تعداد سلول ها در هر پاساژ نشان داده است که این سلولها می‌توانند تا ۳۸ نسل بدون بروز پیری رشد و تکثیر یابند. کشت‌های ثانویه از این سلولها از لحاظ اینکه سلولها شکل دوکی خود را حفظ می‌نمایند شبیه کشت اولیه هستند [١٤٥].

انجماد و ذوب سلولهای مزانشیمی انسانی

یکی دیگر از جنبه‌های جالب مطالعه Bruder و همکارانش در سال ۱۹۹۷ این بودکه آنها انجماد تعدادی از سلولها را در نیتروژن مایع بعد از تیمار با تریپسین در انتهای کشت اولیه و ذوب کردن مجدد آن را گزارش کرده‌اند[١٤٥]. دیده شده است که این انجماد هیچ تاثیر منفی در رشد و تکثیر این سلولها نداشته است. طرز عمل انجماد و ذوب کردن این سلولها در بخش زیر توضیح داده خواهد شد.

روش کار ذخیره سلولهای مزانشیم به صورت

1- Confluence

منجمد

مواد مورد نیاز

استریل

Trypsin-EDTA
DMSO
FBS

غیر استریل

محفظه انجماد با سرعت کاهش دما به میزان ۱ درجه در هر دقیقه.

روش کار

محیط مورد نیاز برای انجماد را که شامل ۱۰درصد DMSO و ۹۰ درصد FBS است آماده نمایید.همواره مد نظر داشته باشید که این محیط را به صورت تازه آماده نمایید.

سلول ها از نظر رشد می بایست در فاز لگاریتمی با تکثیر با سرعت باشند که ذخیره سازی به خوبی صورت پذیرد.

سلولها را به روشی که قبلا توضیح داده شد با تریپسین تیمار نمایید.

و آن ها را بعد از سوسپانسیون کردن شمارش نمایید.

آن ها را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و با دور ٤۰۰g سانتریفیوژ نمایید.

محلول رویی را دور ریخته و سلولها را به آرامی در محیط انجماد با غلظت ۱۰٦ cells/ml × ۱ سوسپانسیون نمایید.

روی ویال‌های مخصوص۱ انجماد در نیتروژن مایع برچسبی که شامل اطلاعات کاملی از سلول مورد نظر است (نوع سلول، شماره دهنده سلول، شماره پاساژ و غلظت آن) به همراه تاریخ و اطلاعات مربوط به اپراتور را بچسبانید.

۱ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی را به هر ویال انتقال دهید و درب آن را خوب محکم کنید.

و این ویال ها را در مخزن کاهش دما قرار دهید و مخزن انجماد را در فریزر ۷۰- درجه قرار دهید و بعد از ٢٤ ساعت این ویال‌ها را به نیتروژن مایع انتقال دهید.

نکات ایمنی: در هنگام کار با نیتروژن مایع دستکش و ماسک مربوطه را استفاده نمایید و از تهویه مناسب هوا مطمئن شوید.

روش کار ذوب کردن سلولهای انجماد یافته

مواد مورد نیاز

استریل

DMEM-LG-10% FB
ظروف کشت مورد نظر

غیر استریل

تریپان بلو

بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد

روش کار

محیط کشت (DMEM-LG-10FB) را به دمای محیط برسانید.

ویال‌های مورد نظر را از نیتروژن مایع خارج نمایید.

و به آرامی در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد ذوب نمایید.(در این مرحله مقداری کریستال یخ در نمونه باقی می‌ماند).

نکته ایمنی: دستکش به دست داشته باشید و درب بن ماری را ببندید که در صورت نفوذ نیتروژن مایع به درون ویال احتمال ترکیدن ویال وجود دارد. بهتر است که همواره ویال‌ها طوری در تانک قرار داده شوند که در درون مایع نیتروژن فرو نروند.

به آرامی سلولهای ذوب شده را به لوله‌ای که حاوی ۳۵ میلی لیتر از محیط کشت است انتقال دهید. (نمونه در این مرحله به طور کامل ذوب می‌شود)

آن را به مدت ۵ دقیقه در دور ۲۵۰ g سانتریفیوژ نمایید.

محلول رویی را دور بریزید.

1- Cryovials

۲ تا ۵ میلی لیتر از محیط کشت بـه آن اضـافه نماییـد و آن را شمارش نمایید و با استفاده ار تریپان بلو از نظـر میـزان زنـده بودن سلولها بسنجید.

سلولها را به میزان $۲/۵ \times ۱۰^{۵}$ به ظرف کشت ۱۰ سانتیمتری و یا فلاسک کشت انتقال دهید.

محیط آن را هر ۳ یا ٤ روز تعویض نماییـد. سـلولها بـه طـور معمول طی ۷ روز ظرف کشت را پر می‌نمایند[۱].

سلولها را می‌توان به روش ذکر شده در روش کار پاساژ داد.

سلولهای مزانشیم ذوب شده از نظر ریخت‌شناسی کاملا شـبیه آنهایی هستند که تا بحال منجمد و ذوب نشده‌اند. البته ممکن است در روز اول کمی کشیده و بلندتر از سـلولهای معمـولی باشند اما بعد از گذشـت ۱ روز و سـازگار شـدن بـا شـرایط کشت دوباره به شکل سلولهای غیر منجمد باز می‌گردند. لازم به ذکر است که تعدادی از سلولها به ظرف کشت نمی‌جـسبند و به صورت غوطه‌ور در محیط باقی می‌ماننـد کـه البتـه طـی مراحل بعدی تعویض محیط اینها نیز خارج می‌گردنـد و تنهـا سلولهایی کـه همچنـان خاصـیت چـسبندگی خـود را حفـظ کرده‌اند به تکثیر خود ادامه می‌دهند [١٤٦].

References

1. **Friedenstein AJ, Piatetzky S, Petrakova KV.** Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol 1966; 16(3): 381-90.
2. **Baksh D, Song L, Tuan RS.** Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med 2004; 8(3): 301-16.
3. **Kemp KC, Hows J, Donaldson C.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Leuk Lymphoma 2005; 46(11): 1531-44.
4. **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; 284(5411): 143-7.
5. **Yoo J, Barthel T, Nishimura K, Solchaga L, Caplan A, Goldberg V, Johnstone B.** The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. . J Bone J Surg 1998; 80: 1745-1757.
6. **Alhadlaq A, Elisseeff JH, Hong L, Williams CG, Caplan AI, Sharma B, Kopher RA, Tomkoria S, Lennon DP, Lopez A, Mao JJ.** Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle. Ann Biomed Eng 2004; 32(7): 911-23.
7. **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(8): 896-904.
8. **Alhadlaq A , Mao J.** Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. J Dent Res 2003; 82: 951-956.
9. **Meirelles LS, Nardi N.** Murine marrowderived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. Br J Haematol 2003; 123: 702-711.
10. **Kadiyala S, Young R G, Thiede M A, Bruder S P.** Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. Cell Transplant 1997; 6(2): 125-34.

11. **Wakitani S, Goto T, Pineda S, Young R, Mansour J, Caplan A, Goldberg V.** Mesenchymal cellbased repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 1994 76A: 579-592.
12. **Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y.** Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. J Craniofac Surg 2001; 12: 586-593.
13. **Lennon DP S H, BN Jaiswal and AI Caplan.**, Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: identification of serum for optimal selection and proliferation. . In Vitro Cell Dev Biol Anim 1996; 32: 602-611.
14. **Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester G, Haupl T, Sittinger M.** Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. Cell Tissue Res 2002 307: 321-327.
15. **Worster A, Nixon A, Brower-Toland B, Williams J.** Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. Am J Vet Res 2000; 61: 1003-1010.
16. **Niku M, Ilmonen L, Pessa-Morikawa T, Iivanainen A.** Limited contribution of circulating cells to the development and maintenance of nonhematopoietic bovine tissues. Stem Cells 2004; 22: 12-20.
17. **Alhadlaq A , Mao J J.** Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. Stem Cells Dev 2004; 13(4): 436-48.
18. **Keating A.** Mesenchymal stromal cells. Curr Opin Hematol 2006; 13(6): 419-25.
19. **Gregory CA, Prockop DJ.** The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. J Biol Chem 2003; 278: 28067–28078.
20. **Gregory CA, Reyes E.** Dkk-1-derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow. J Biol Chem 2005 280: 2309–2323.
21. **Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT.** Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche Nature 2003; 425: 841-846.
22. **Tavassoli M , Takahashi K.** Morphological studies on long-term culture of marrow cells: characterization of the adherent stromal cells and their interactions in maintaining the proliferation of hemopoietic stem cells Am. J. Anat. 1982; 164: 91-111
23. **Wang QR, Wolf NS.** Dissecting the hematopoietic microenvironment. Clonal isolation and identification of cell types in murine CFU–F colonies by limiting dilution Exp. Hematol. 1 1990; 8: 355-359.
24. **Tuan RS, Boland G, Tuli R.** Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering Arthritis Res.Ther. 2003; 5: 32-45.
25. **Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE.** Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem Cells 2005; 23(2): 220-9.
26. **Huss R.** Perspectives on the morphology and biology of CD34-negative stem cells. J

Hematother Stem Cell Res 2000; 9: 783-793.

27. **Hristov M, Erl W, Weber PC.** Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. Trends Cardiovasc Med 2003; 13(5): 201-6.
28. **Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, Dominici M, Horwitz EM.** Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. Blood 2007; 109(10): 4245-8.
29. **Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC.** SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. Blood 2007; 109(4):1743-51.
30. **Silva W, Covas D, Panepucci R, Proto-Siqueira R, Siufi J, Zanette D, Santos R, Zago M.** The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells 2003; 21: 661-669.
31. **Dormady S, Bashayan O, Dougherty R, Zhang X, Basch R.** Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. J Hematother Stem Cell Res 2001; 10: 125-140.
32. **Schieker M, Pautke C, Reitz K, Hemraj I, Neth P, Mutschler W, Milz S.** The use of four–colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. J Anat 2004; 204(2): 133-9.
33. **Guo KT, SchAfer R, Paul A, Gerber A, Ziemer G, Wendel HP.** A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers. Stem Cells 2006; 24(10): 2220-31.
34. **Schrepfer S, Deuse T, Lange C, Katzenberg R, Reichenspurner H, Robbins RC, Pelletier MP.** Simplified Protocol to Isolate, Purify, and Culture Expand Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells and Development 2007; 16(1): 105-108.
35. **Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001; 70(2): 211-28.
36. **Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H.** Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells 2004; 22(4): 625-34.
37. **Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K.** Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. Transplantation 2006; 81(10): 1390-7.
38. **Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P.** A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. J Exp Med 2004; 200(2): 123-35.
39. **Zvaifler NJ, Adams ML.** Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. Arthritis Res. 2000; 2: 477–488.
40. **Risbud MV, Shapiro IM, Guttapalli A, Di Martino A, Danielson KG, Beiner JM, Hillibrand A, Albert TJ, Anderson DG, Vaccaro AR.** Osteogenic potential of adult

human stem cells of the lumbar vertebral body and the iliac crest. Spine 2006; 31(1): 83-9.

41. **Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM.** Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. Cytotherapy 2004; 6(1): 7-14.
42. **Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB.** Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. Bull Exp Biol Med 2005; 140(1): 138-43.
43. **Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K.** Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. Stem Cells 2004; 22(5): 649-58.
44. **Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD.** Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol 2005; 33(11): 1402-16.
45. **Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T.** Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. Transplantation 2005; 79(5): 528-35.
46. **Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP.** Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. BMC Dev Biol 2007; 7: 11.
47. **De Coppi P, Callegari A, Chiavegato A, Gasparotto L, Piccoli M, Taiani J, Pozzobon M, Boldrin L, Okabe M, Cozzi E, Atala A, Gamba P, Sartore S.** Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. J Urol 2007; 177(1): 369-76.
48. **De Coppi P, Pozzobon M, Piccoli M, Gazzola M V, Boldrin L, Slanzi E, Destro R, Zanesco L, Zanon GF, Gamba P.** Isolation of mesenchymal stem cells from human vermiform appendix. J Surg Res 2006; 135(1): 85-91.
49. **Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC.** Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells 2004; 22(7): 1330-7.
50. **Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD.** Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. Braz J Med Biol Res 2003; 36(9): 1179-83.
51. **SONG L, TUAN R.** Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. Faseb 2004; 18: 980-982
52. **Song L, Tuan RS.** Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. Faseb J 2004; 18(9): 980-2.
53. **Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel**

N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol 2000; 164(2): 247-56.

54. **Xiang Y, Zheng Q, Jia BB, Huang GP, Xu YL, Wang JF, Pan ZJ.** Ex vivo expansion and pluripotential differentiation of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. J Zhejiang Univ Sci B 2007; 8(2): 136-46.
55. **Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L.** Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. Handb Exp Pharmacol 2006(174): 249-82.
56. **Li W, Liu SN, Luo DD, Zhao L, Zeng LL, Zhang SL, Li SL.** Differentiation of hepatocytoid cell induced from whole-bone-marrow method isolated rat myeloid mesenchymal stem cells. World J Gastroenterol 2006; 12(30): 4866-9.
57. **Oh S, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T.** Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. . Biochem Biophys Res Commun 2000; 279(2): 500-4.
58. **Ong SY, Dai H, Leong KW.** Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. Biomaterials 2006; 27: 4087–4097.
59. **Ong S Y, Dai H, Leong K W.** Hepatic Differentiation Potential of Commercially Available Human Mesenchymal Stem Cells. Tissue Eng 2006.
60. **Lange C, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC.** Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells World J Gastroenterol 2006 12(15): 2394-2397.
61. **Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, Gomez-Lechon MJ.** Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. World J Gastroenterol 2006; 12(36): 5834-45.
62. **Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, Sin YK, Lim CH, Chua T, Teh M, Liu TC, Sim E.** Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 324(2): 481-8.
63. **Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S.** Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. J Clin Invest 1999; 103(5): 697-705.
64. **Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, Morisaki T, Yutani C, Kitamura S, Nakatani T.** Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro. J Thorac Cardiovasc Surg 2003; 125(6): 1470-80.
65. **Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK.** Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. Ann Thorac Surg 2003; 75(3): 775-9.
66. **Xaymardan M, Tang L, Zagreda L, Pallante B, Zheng J, Chazen JL, Chin A, Duignan I, Nahirney P, Rafii S, Mikawa T, Edelberg JM.** Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone

marrow-derived cardiac myocytes. Circ Res 2004; 94(5): E39-45.

67. **Wakitani S, Saito T, Caplan AI.** Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. Muscle Nerve 1995; 18(12): 1417-26.
68. **Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ.** Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. Circulation 1999; 100(19 Suppl): II247-56.
69. **Lin GS, Lu JJ, Jiang XJ, Li XY, Li GS.** Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells improved heart function after myocardial infarction. Acta Pharmacol Sin 2004; 25(7): 876-86.
70. **Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Ohtsu Y, Ishida M, Yutani C, Kitamura S.** G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. Cell Transplant 2004; 13(7-8): 741-8.
71. **Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y.** Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. Exp Biol Med (Maywood) 2004; 229(7): 623-31.
72. **Meifeng Xu M, Maqsood Wani, Yan-Shan Dai, Jiang Wang, Mei Yan M, Ahmar Ayub, Muhammad Ashraf.** Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells Into the Cardiac Phenotype Requires Intercellular Communication With Myocytes. Circulation 2004; 110 2658-2665.
73. **Wang TZ, Ma AQ, Xu ZY, Jiang WH, Du Y.** Differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes induced by cardiomyocytes. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2005; 30(3): 270-5.
74. **Lagostena L, Avitabile D, De Falco E, Orlandi A, Grassi F, Iachininoto MG, Ragone G, Fucile S, Pompilio G, Eusebi F, Pesce M, Capogrossi MC.** Electrophysiological properties of mouse bone marrow c-kit+ cells co-cultured onto neonatal cardiac myocytes. Cardiovasc Res 2005; 66(3): 482-92.
75. **Beeres SL, Atsma DE, van der Laarse A, Pijnappels DA, van Tuyn J, Fibbe WE, de Vries AA, Ypey DL, van der Wall EE, Schalij MJ.** Human adult bone marrow mesenchymal stem cells repair experimental conduction block in rat cardiomyocyte cultures. J Am Coll Cardiol 2005; 46(10): 1943-52.
76. **Yoon J, Shim WJ, Ro YM, Lim DS.** Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. Ann Hematol 2005; 84(11): 715-21.
77. **Gallo MP, Ramella R, Alloatti G, Penna C, Pagliaro P, Marcantoni A, Bonafe F, Losano G, Levi R.** Limited plasticity of mesenchymal stem cells cocultured with adult cardiomyocytes. J Cell Biochem 2007; 100(1): 86-99.
78. **Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG.** Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. Br J Haematol 1997; 97(3): 561-70.
79. **Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ.** 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 1995; 92(11): 4857-61.

80. **Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, Goulet JA, Goldstein SA.** Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. J Orthop Res 1999; 17(6): 900-8.
81. **Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI.** The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. Clin Orthop Relat Res 1991(269): 274-83.
82. **Kataoka H , Urist MR.** Transplant of bone marrow and muscle-derived connective tissue cultures in diffusion chambers for bioassay of bone morphogenetic protein. Clin Orthop Relat Res 1993(286): 262-70.
83. **Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI.** Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. Tissue Eng 1999; 5(3): 267-77.
84. **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(4): 406-13.
85. **Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F.** Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 1998; 279(5356): 1528-30.
86. **Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG.** Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(19): 10711-6.
87. **Minguell JJ, Conget P, Erices A.** Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. Braz J Med Biol Res 2000; 33(8): 881-7.
88. **Shiota M, Heike T, Haruyama M, Baba S, Tsuchiya A, Fujino H, Kobayashi H, Kato T, Umeda K, Yoshimoto M, Nakahata T.** Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties. Exp Cell Res 2007; 313(5): 1008-23.
89. **Khodadadi L , Baharvand H.** Immunogenecity of stem cells. Yakhteh 2007; 8(32): 276-303.
90. **Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F.** Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. Curr Opin Pharmacol 2006; 6(4): 435-41.
91. **Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O.** HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp Hematol 2003; 31(10): 890-6.
92. **Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F.** Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24(2): 386-98.
93. **Uccelli A, Pistoia V, Moretta L.** Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression?. Trends Immunol 2007.
94. **Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey**

S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. Blood 2005; 106(13): 4057-65.

95. **Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L.** Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. Blood 2006; 107(4): 1484-90.
96. **Dantzer D, Ferguson P, Hill RP, Keating A, Kandel RA, Wunder JS, O'Sullivan B, Sandhu J, Waddell J, Bell RS.** Effect of radiation and cell implantation on wound healing in a rat model. J Surg Oncol 2003; 83: 185–190.
97. **Rojas M,Xu J,Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. Am J Resp Cell Mol Biol 2005; 33: 45–152.
98. **Mansilla E, Marin GH, Sturla F, Drago HE,Gil MA, Salas E, Gardiner MC, Piccinelli G, Bossi S, Salas E, Petrelli L, Iorio G, Ramos CA, Soratti C.** Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. Transplant Proc. 2005 37: 292–294.
99. **Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM**. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogenic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 11474-11479.
100. **Schmidt A, Ladage D, Steingen C, Brixius K, Schinkothe T, Klinz FJ, Schwinger RH, Mehlhorn U, Bloch W.** Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. Eur J Cell Biol 2006; 85(11): 1179-88.
101. **Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiati LC, Allidina Y, Liu P, Li RK.** Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg 2002; 123(6): 1132-40.
102. **Dai w, Hale sl, Martin bj, Kuang j, Dow js, Wold le, Kloner ra.** Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Postinfarcted Rat Myocardium Short- and Long-Term Effects. Circulation 2005; 112: 214-223.
103. **Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC.** Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. J Thorac Cardiovasc Surg 2000; 120(5): 999-1005.
104. **Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ.** Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. Ann Thorac Surg 2002; 73(6): 1919-25.
105. **Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, Coulter SC, Lin J, Ober J, Vaughn WK, Branco RV, Oliveira EM, He R, Geng YJ, Willerson JT, Perin E C.** Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. Circulation

2005; 111(2): 150-6.

106. **Amado LC, Schuleri KH, Saliaris AP, Boyle AJ, Helm R, Oskouei B, Centola M, Eneboe V, Young R, Lima JA, Lardo AC, Heldman AW, Hare JM.** Multimodality noninvasive imaging demonstrates in vivo cardiac regeneration after mesenchymal stem cell therapy. J Am Coll Cardiol 2006; 48(10): 2116-24.
107. **Bartunek J, Croissant J D, Wijns W, Gofflot S, de Lavareille A, Vanderheyden M, Kaluzhny Y, Mazouz N, Willemsen P, Penicka M, Mathieu M, Homsy C, De Bruyne B, McEntee K, Lee IW, Heyndrickx GR.** Pretreatment of adult bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyogenic growth factors and repair of the chronically infarcted myocardium. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 292(2): H1095-104.
108. **Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P.** Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. Ann N Y Acad Sci 2001; 938: 221-9; discussion 229-30.
109. **Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ.** Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. Nat Med 2003; 9(9): 1195-201.
110. **Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD.** Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. Lancet 2004; 363(9411): 783-4.
111. **Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW.** Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. Circulation 2004; 109(25): 3154-7.
112. **Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T.** Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. Circulation 2001; 104(9): 1046-52.
113. **Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD.** Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation 2002; 105(1): 93-8.
114. **Bittira B, Kuang JQ, Al-Khaldi A, Shum-Tim D, Chiu RC.** In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. Ann Thorac Surg 2002; 74(4): 1154-9; discussion 1159-60.
115. **Min JY, Sullivan MF, Yang Y, Zhang JP, Converso KL, Morgan JP, Xiao YF.** Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. Ann Thorac Surg 2002; 74(5): 1568-75.
116. **Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Hirata K, Yano M, Kohno M, Matsuzaki M.** Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. Ann Thorac Surg 2002; 73(4): 1210-5.
117. **Thompson RB, Emani SM, Davis BH, van den Bos EJ, Morimoto Y, Craig D, Glower D, Taylor DA.** Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells.

Circulation 2003; 108 Suppl 1: II264-71.

118. **Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S.** Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 287(6): H2670-6.
119. **Misao Y, Takemura G, Arai M, Sato S, Suzuki K, Miyata S, Kosai K, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H.** Bone marrow-derived myocyte-like cells and regulation of repair-related cytokines after bone marrow cell transplantation. Cardiovasc Res 2006; 69(2): 476-90.
120. **Price MJC, Choh Ch, Frantzen M, Miyamoto T, Kar S.** Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. International Journal of Cardiology 2006; 111: 231-239.
121. **Hu X, Wang J, Chen J, Luo R, He A, Xie X, Li J.** Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. Eur J Cardiothorac Surg 2007; 31(3): 438-43.
122. **Krause U, Harter C, Seckinger A, Wolf D, Reinhard A, Bea F, Dengler T, Hardt S, Ho A, Katus H A, Kuecherer H, Hansen A.** Intravenous delivery of autologous mesenchymal stem cells limits infarct size and improves left ventricular function in the infarcted porcine heart. Stem Cells Dev 2007; 16(1): 31-7.
123. **Chen SL, Fang WW, Qian J, Ye F, Liu YH, Shan SJ, Zhang JJ, Lin S, Liao LM, Zhao RC.** Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. Chin Med J (Engl) 2004; 117(10): 1443-8.
124. **Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos l, Korovesis S, Perez SA, Voridis EM, Papamichail M.** Transcoronary Transplantation of Autologous Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitors Into Infarcted Human Myocardium. Catheterization and Cardiovascular Interventions 2005; 65: 321–329
125. **Katritsis DG, Sotiropoulou P, Giazitzoglou E, Karvouni E, Papamichail M.** Electrophysiological effects of intracoronary transplantation of autologous mesenchymal and endothelial progenitor cells. Europace 2007.
126. **Chen X, Xu H, Wan C, McCaigue M, Li G.** Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24(9): 2052-9.
127. **Horwitz EM Gordon Pl, Koo WKK.** Isolated allogeneic bone marrowderived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. Proc Natl Acad Sci USA 2002 99:8932–8937.
128. **Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM.** Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. J Clin Oncol 2000; 18(2): 307-16.
129. **Ho H , Zanjani R.** Stem cell Transplantation:

Biology, Processes, Therapy. 2006: WILEY-VCH.

130. **Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A.** Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. Blood 2005; 106(5): 1755-61.
131. **Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, Musio S, Bonanni I, Pedemonte E, Mantegazza R, Frassoni F, Mancardi G, Pedotti R, Uccelli A.** Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. Ann Neurol 2007; 61(3): 219-27.
132. **Xie YZ, Zhu ZA, Tang TT, Dai KR, Lu JX, Pierre H.** Using perfusion bioreactor for mesenchymal stem cell proliferation in large tricalcium phosphate scaffold. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2006; 86(23): 1633-7.
133. **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.
134. **Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B.** Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC Cell Biol 2006; 7: 14.
135. **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.
136. **Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I.** Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. Stem Cells 2004; 22(5): 675-82.
137. **Spees J, Gregory, CA and Singh, H.** Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. Mol Ther 2004; 9: 747 –56.
138. **Kocaoemer A, Kern S, Klueter H, Bieback K.** Human AB-Serum as well as Thrombin-activated Platelet-Rich-Plasma are suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. Stem Cells 2007.
139. **Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, Viebahn S, Gieseke F, Langer H, Gawaz MP, Horwitz EM, Conte P, Handgretinger R, Dominici M.** Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. Cytotherapy 2006; 8(5): 437-44.
140. **Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, Bron D, Lagneaux L.** Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. Eur J Haematol 2006; 76(4): 309-16.
141. **Berger MG, Veyrat-Masson R, Rapatel C, Descamps S, Chassagne J, Boiret-Dupre N.** Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. Stem Cells 2006; 24(12): 2888-90.
142. **Tamama K, Fan VH, Griffith LG, Blair**

HC, Wells A. Epidermal Growth Factor as a Candidate for Ex Vivo Expansion of BoneMarrow–Derived Mesenchymal Stem Cells. stem cells 2006; 24: 686-695.

143. **Lennon D, Haynesworth S, Jaiswal B, Caplan A.** Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: identification of serum for optimal selection and proliferation. . In Vitro Cell Dev Biol Anim 1996; 320: 602-611.

144. **Phinney DG, Baddoo M, Dutreil M, Gaupp D, Lai WT, Isakova IA.** Murine mesenchymal stem cells transplanted to the central nervous system of neonatal versus adult mice exhibit distinct engraftment kinetics and express receptors that guide neuronal cell migration. Stem Cells Dev 2006; 15(3): 437-47.

145. **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(2): 278-94.

146. **lennon D , Caplan A**. Culture of cells for tissue engineering: chapter 2, Mesenchymal stem cell for tissue engineering. 2006:John wiley & sons, Inc. 23-59.