بررسی پتانسیل تمایز استخوانی، غضروفی و چربی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان سگ

محمدرضا باغبان اسلامی‌نژاد Ph.D.[1,*]، آق بی‌بی نیک محضر M.Sc.[1]، لیلا تقی‌یار M.Sc.[1]، محمدمهدی دهقان DVM[2]، حسین کاظمی DVM[2]، علی فرخی M.SC.[1]، پوپک افتخاری یزدی Ph.D.[1]

۱. پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

۲. دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

پست الکترونیک: Email: bagesia@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۱۲/۱۴، پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۴

هدف: بررسی پتانسیل تمایز به رده‌های استخوانی، غضروفی و چربی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان سگ

مواد و روش‌ها: ۱۰ قلاده سگ با متوسط وزن ۲۵-۱۵ کیلوگرم بیهوش شدند و ۱۵ میلی‌لیتر مغز استخوان از استخوان لگن خاصره هر کدام آسپیره شد. سپس با استفاده از لیمفودکس و ایجاد گرادیان غلظت سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان جدا شد و با تراکم 5×10^3 سلول بر سانتی‌مترمربع در محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاو کشت شد. با انجام چند پاساژ پی‌درپی، سلول‌های فیبروبلاستی تخلیص و تکثیر شد و سلول‌های پاساژ سوم، از لحاظ پتانسیل تمایز به استخوان، چربی و غضروف مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که به مدت ۳ هفته در معرض محیط تمایز به استخوان، چربی و غضروف قرار گرفتند و در پایان وقوع تمایز با روش‌های هیستوشیمی و RT-PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: به دنبال رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، کشت استئوژنیک قرمز رنگ شد که حاکی از معدنی شدن ماتریکس بود. در این ماتریکس mRNA شاخص بافت استخوانی (کلاژن تیپ I و استئوپونتین) به مقدار زیادی تولید شده بود. همچنین در کشت آدیپوژنیک، قطرات چربی تولید شده به دنبال رنگ اختصاصی اویل رد قرمز شدند. بررسی RT-PCR نشان داد که ژن‌های شاخص چربی(لیپو پروتیین لیپاز و PPARG2) در این کشت بیان شده است. برش‌های تهیه شده از کشت کندروژنیک، به دنبال رنگ آمیزی با سافرانین O ارغوانی شد که حاکی از فراوانی گلیکوز آمینو گلیکان در این کشت بود. نتایج RT-PCR نشان داد که در کشت تمایز به غضروف mRNA برخی شاخص‌های غضروف نظیر کلاژن II و دکورین تولید شده و برخی (ماکرومولکول آگریکان) تولید نشده است.

نتیجه‌گیری: سلول‌های فیبروبلاستی جدا شده از مغز استخوان سگ به راحتی به استخوان و چربی تمایز می‌یابند ولی در تمایز به غضروف، علی‌رغم تولید ماتریکس غنی از گلیکوزآمینوگلیکان، کلاژن II و Decorin، مولکول آگریکان ساخته نمی‌شود.

کلیدواژگان: سلول مزانشیمی، مغز استخوان سگ، تمایز به استخوان، چربی و غضروف

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۳۸-۳۱

مقدمه

سلول‌های بنیادی بالغین (بزرگسالان) سلول‌هایی هستند که در نقاط مختلفی از قبیل مغز استخوان، خون بندناف و اکثر بافت‌های بدن یافت می‌شوند (۱، ۲). در میان این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به دلیل سهولت دسترسی و تکثیر، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و با توانایی تمایز به رده‌های استخوانی، غضروفی و چربی شناخته می‌شوند (۶-۳). تحقیقات اخیر نشان داده است که پتانسیل تمایزی این سلول‌ها وسیع است به طوری که قادرند علاوه بر رده‌های اسکلتی به اکثر سلول‌های مشتق از سه لایه جنینی از قبیل سلول عصبی(۷)، سلول بتای پانکراس، کاردیومیوسیت و هپاتوسیت نیز تمایز پیدا کنند (۱۲-۸).

اگر چه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت‌هایی همچون خون بندناف، بافت چربی، استخوان، کپسول مفصلی و عضله نیز استخراج شده‌اند اما منبع اصلی این سلول‌ها مغز استخوان است (۱۴، ۱۳). حضور این سلول‌ها در مغز استخوان اولین بار توسط فریدنشتاین و همکارانش عنوان شد. آنها نشان دادند استرومای مغز استخوان حاوی جمعیتی از سلول‌های شبه فیبروبلاستی است که توانایی چسبیدن به کف پلاستیک ظرف کشت را دارد و در محیط کشت به راحتی به استخوان،

چربی و غضروف تمایز می‌یابد (۱۸-۱۵). آنها نام واحد تشکیل دهنده کلونی فیبروبلاستی را برای این سلول‌ها برگزیدند (۱۹). پس از آن اوون و همکاران با پیوند سلول بنیادی مزانشیمی به خرگوش نشان دادند که این سلول‌ها در محیط *in vivo* نیز توانایی تبدیل به استخوان، چربی و غضروف را دارا هستند (۱۸).

با وجودی که جمعیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مغز استخوان بسیار اندک است و کمتر از ۰/۱ درصد سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان را تشکیل می‌دهد اما به دلیل خاصیت خود تجدیدی، به راحتی در محیط کشت قابل تکثیر هستند. این ویژگی و همچنین توانایی آنها در تمایز به چندین رده سلولی و نیز دسترسی آسان به آنها باعث شده تا محققان این سلول‌ها را به عنوان منبع مناسبی برای مقاصد ژن و سلول درمانی درنظر بگیرند (۲۱-۲۰).

تاکنون سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان گونه‌های مختلف از قبیل انسان، موش، رت، اسب، خوک، گوسفند وبز با موفقیت جداسازی شده است (۲۹-۲۱)، اما دراین بین جداسازی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان سگ به ندرت مورد توجه قرار گرفته است. این در حالی است که سگ شباهت‌های فیزیولوژیکی بسیاری با انسان دارد و مدل ارزشمندی برای آسیب‌های سیستم اسکلتی محسوب می‌شود (۳۰).

سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان سگ برای اولین بار توسط کادیوالا و همکاران جداسازی و پتانسیل استیوژنیک آنها در حالت *in vivo* بررسی شد. بدین‌ترتیب که این محققان ابتدا سلول‌های جدا شده را داخل منافذ سرامیک متشکل از هیدروکسی آپاتیت و تری‌کلسیم فسفات بارگیری کردند؛ سپس آنرا در زیر پوست و داخل عضله سگ پیوند زدند و استخوان‌سازی حاصل را مطالعه کردند (۳۰). پس از آن محققان دیگر در چندین مطالعه پتانسیل استیوژنیک این سلول‌ها را نشان داده‌اند (۳۱، ۳۲). ولی در ارتباط با پتانسیل آدیپوژنیک و کندروژنیک این سلول‌ها گزارشی وجود ندارد. این موضوع در مطالعه حاضر مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان سگ

در مطالعه حاضر تعداد ۱۰ قلاده سگ با متوسط وزن ۲۵-۱۵ کیلوگرم مورد استفاده قرار گرفت.عمل آسپیراسیون مغز استخوان (به طور متوسط ۱۵ میلی‌لیتر) در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و تحت بیهوشی عمومی از استخوان ایلیوم انجام گرفت. نمونه‌های مغز استخوان به پژوهشکده رویان انتقال یافتند و در آزمایشگاه کشت سلول، به منظور استخراج سلول مزانشیمی، به میزان ۳ برابر حجم نمونه محیط، Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM, 12800-116; Gibco, UK) به آن اضافه شد. سپس با استفاده از لیمفودکس و ایجاد گرادیان غلظت و دور سانتریفوژ ۱۲ دور سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان جدا شدند و با تراکم 5×10^4 سلول بر سانتی‌مترمربع در محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum, Cat. No:10270, Gibco, UK: FBS) و ۱۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین/استرپتومایسین (15070-063, Gibco, UK) در داخل فلاسک‌های ۱۵۰ سانتی‌متر مربع کشت داده شدند. ۷ الی ۱۰ روز پس از آغاز کشت، محیط رویی سلول‌ها دور ریخته شد و پس از یک‌بار شستشو با محلول PBS با محیط تازه جایگزین شد. با این عمل سلول‌های خونی و غیرچسبنده از محیط کشت حذف شدند. تعویض محیط هر دو روز یک‌بار انجام گرفت تا زمانی که سلول‌ها ۷۰ الی ۸۰ درصد ظرف کشت را پر کردند. در این زمان (هفته سوم) سلول‌ها تریپسینه (Tripsin/EDTA, 25300-054, Gibco, UK) شد و بین دو فلاسک ۱۵۰ تقسیم شدند. سلول‌های پاساژ اول، پس از ۵ روز ظرف کشت را پر کردند و در ادامه پاساژ دوم انجام گرفت و با انجام پاساژ سوم، سلول به اندازه کافی برای اجرای مراحل بعدی تحقیق فراهم شد. در مطالعه حاضر از سلول‌های پاساژ سوم، به منظور بررسی پتانسیل تمایز استفاده شده است.

تمایز به استخوان و رنگ‌آمیزی آلیزارین رد

برای تمایز استئوژنیک، سلول‌ها با تراکم 5×10^4 سلول بر سانتی‌مترمربع در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند. با پر شدن محیط کشت، محیط القاکننده تمایز استخوان که حاوی 0.1μM dexamethasone (D1753; Sigma, USA), 10mM ß-glycerophosphate (G9891, Sigma, USA), 0.05mM ascorbate (A8960, Sigma, USA) بود، به محیط سلول‌ها اضافه شد. محیط کشت سلول‌ها ۳ بار در هفته تعویض شد و سلول‌ها به مدت ۳ هفته در معرض این محیط قرار گرفتند و در پایان وقوع تمایز با روش RT-PCR و رنگ آمیزی Alizarin red(A5533; Sigma,USA) بررسی شد.

به منظور رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، پس از تخلیه محیط رویی، سلول‌ها با PBS بدون کلسیم و منیزیوم به مدت ۱۰ دقیقه شسته و در متانول ۱۰۰ درصد فیکس شدند. سپس نیم میلی‌لیتر Alizarin Red (۰/۲۵درصد در آب مقطر) به آنها اضافه شد (۲ دقیقه). در پایان، سلول‌ها چندین بار با آب مقطر شسته و با میکروسکوپ مشاهده شدند.

تمایز به چربی و رنگ‌آمیزی اویل رد

برای تمایز به چربی نیز همانند تمایز به استخوان سلول‌ها در پلیت‌های ۶ خانه و در معرض محیط القاکننده چربی حاوی 100nM indomethacine (I-8280, Sigma, USA) و 50μM dexamethasone کشت داده شدند. محیط کشت سلول‌ها ۳ بار در هفته تعویض شد و در پایان روز ۲۱، وقوع تمایز با رنگ‌آمیزی Oil red O (O-0625, Sigma, USA) و روش RT-PCR ارزیابی شد.

به منظور رنگ‌آمیزی با روش اویل رد، سلول‌ها به مدت ۶۰ دقیقه با

فرمالدئید ۴درصد فیکس و با الکل ۷۰ درصد شسته شدند. پس از آن ، از رنگ اویل رد که از۳ قسمت محلول استوک رنگ (۰/۵ درصد اویل رد در ایزوپروپیل الکل ۹۹ درصد) و ۲ قسمت آب مقطر تشکیل یافته بود استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه در محلول اویل رد قرار گرفتند و بعد از این مدت با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شدند.

تمایز به غضروف و روش رنگ‌آمیزی با Safranin O

جهت تمایز به غضروف از روش micro mass culture استفاده شد. به این نحو که ابتدا تعداد ۲۰۰ هزارسلول شمارش و درداخل لوله ۱۵ میلی‌لیتر سانتریفوژ شدند. سپس محیط کندروژنیک حاوی 500 ng/ml (B2805, Sigma, USA) (A 8960, Sigma, 0/1µM dexamethasone, 10ng/ml TGF-B3 (TT5425, Sigma, USA), BMP-6 50mg/ml (Sigma, USA), 40µg/ml praline (.P5607,Sigma, USA), 0.05mM ascorbate USA) (L5900, Sigma, USA), 1.24mg/ml BSA (A9418, Sigma, USA), ITS (I3146; Sigma, USA), 5.35mg/ml linoleic acid

به لوله اضافه شد. محیط کشت سلول‌ها یک روزدر میان تعویض شد و درپایان روز ۲۱، برخی از پلت‌ها برای آنالیز RT-PCR استفاده شدند و از برخی دیگر به منظور رنگ‌آمیزی Safranin O (S2255, Sigma, USA) برش های۵ میکرومتری تهیه شد. این برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با Safranin O رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری معمولی مشاهده شدند.

آنالیز RT-PCR

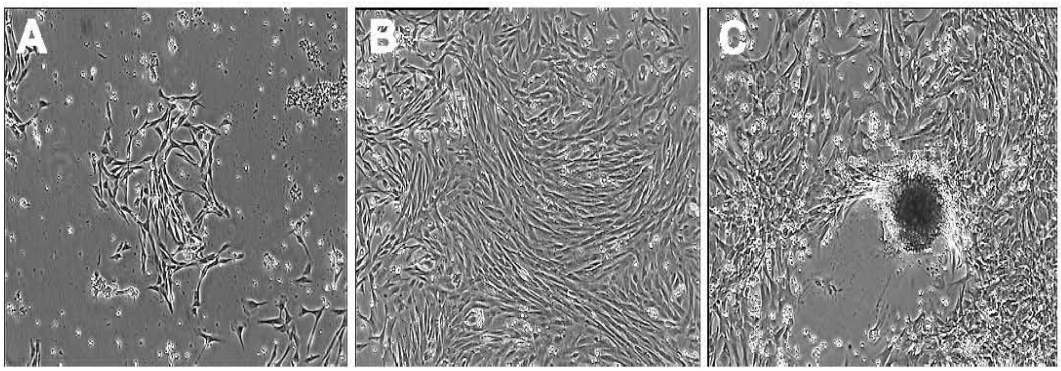
در ابتدابا استفاده از Nucleospin RNA II kit (740955; Macherey-Nagel, Germany) کل موجودی RNA سلولی از سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته به استخوان، چربی و غضروف استخراج شد. نمونه‌های RNA استخراج شده با DNase I (104132, Roch) تحت تیمار قرار گرفتند تا آلودگی‌های احتمالی مربوط به DNAژنومیک از نمونه‌های RNA حذف‌شود. سپس خلوص و غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری تعیین شود.

یک میکروگرم از RNA استخراج شده بااستفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت Revert (K 1622 Fermentas) AldTMH Minus First Strand cDNA Synthesis نسخه‌برداری معکوس شد. سپس از cDNA تولید شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد. به این منظور مواد زیر در یک لوله PCR با یکدیگر مخلوط شدند: 2/5 µl(10x) ،2µl cDNA (100ng/ml) ،PCR Buffer (AMS) ،0/75 µlMgCl2 (50mM) و 0/5dNTPmix µl(10mM) از هر پرایمر (5 µM) 1 µl، 0/5Smar Taq µl(5unit/1 µl) (سینا‌ژن، TA8110C) و در نهایت با استفاده از آب دوبار تقطیر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برای پی‌بردن به بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد. شرایط PCR به صورت: ۱) واسرشتگی اولیه: ۵ دقیقه (۹۳درجه سانتی گراد)، ۲) واسرشتگی هر سیکل: ۴۵ ثانیه، ۹۳درجه سانتی گراد ۳) Annealing: با توجه به Tm پرایمرهای هر ژن که در جدول ذکر شده است. ۴) Extension هر سیکل: ۴۵ ثانیه Extension، ۵) زمانی: ۱۰ دقیقه (۷۲درجه سانتی گراد) انجام شد. محصولات PCR روی آگارز ۱/۷ درصد جدا و با اتیدیوم بروماید قابل رویت شدند.

یافته‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان سگ

در کشت اولیه، کلون‌های کوچکی با مورفولوژی شبه فیبروبلاستی (دوکی) و تعدادی سلول با مورفولوژی گرد ظاهر شد (شکل ۱A).



شکل ۱: سلول های مزانشیمی مغز استخوان سگ. A) ۵ روز پس از آغاز کشت اولیه: کلون سلول فیبروبلاستی در مرکز و سلول های ریز کروی در اطراف قابل مشاهده است.B)هفته سوم کشت اولیه: سلول ها تمام سطوح ظرف کشت را پر کرده اند. C)هفته دوم کشت اولیه یک ندول سلولی ، تقریبا در مرکز تصویر دیده می شود (بزرگنمایی ۱۰۰×، میکروسکوپ معکوس).

با انجام پاساژ سلولی، جمعیت سلول‌های دوکی افزایش و سلول‌های گرد کاهش یافت (شکل ۱B). در کشت اولیه و پاساژهای سلولی، در مناطقی ندول‌هایی مشاهده شد (شکل ۱C).

تمایز استئوژنیک و ارزیابی آن

طی دوره تمایز استئوژنیک، در برخی مناطق کشت، توده‌های سلولی تشکیل شد (شکل ۲A). این توده‌ها به دنبال رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، قرمز رنگ شد که حاکی از معدنی شدن ماتریکس بود (شکل ۲B). به علاوه نتایج RT-PCR حاکی از تولید ژن‌های ویژه بافت استخوانی شامل کلاژن تیپ IA1، IA2 و استئوپونتین بود (شکل۲C). شدت رنگ‌پذیری در رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و همچنین، باند تشکیل شده در بررسی RT-PCR در ده سگ مورد مطالعه تفاوت چندانی نداشت.

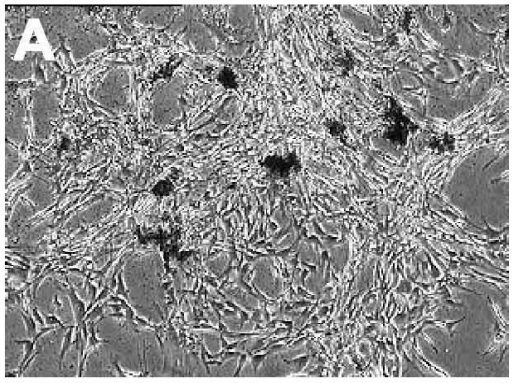
مناطقی ندول‌هایی مشاهده شد (شکل ۱C).

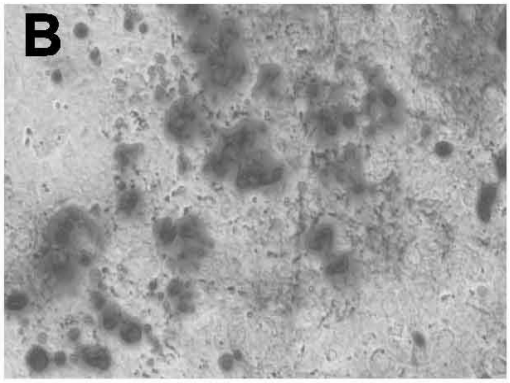
تمایز آدیپوژنیک و ارزیابی آن

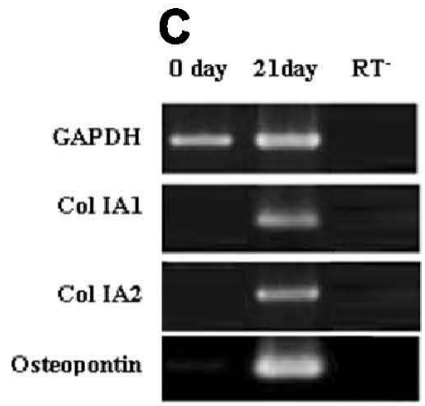
در برخی مناطق کشت، توده‌های سلولی تشکیل شد (شکل ۳A) و تمایز ادیپوژنیک در داخل آن (شکل۳B) و تک لایه سلولی اتفاق افتاد (شکل ۳C). قطرات چربی داخل سلول ها به دنبال رنگ آمیزی با Oil red O قرمز رنگ شد (شکل C و ۳D) وآنالیز RT-PCR نشان داد که mRNA لیپوپروتئین لیپاز (LPL) و PPARG2 تولید شده است(شکل ۳E). شدت رنگ پذیری در رنگ آمیزی Oil Red O و همچنین، باند تشکیل شده در بررسی RT-PCR در ده سگ مورد مطالعه تفاوت چندانی نداشت.

تمایز کندروژنیک و ارزیابی آن

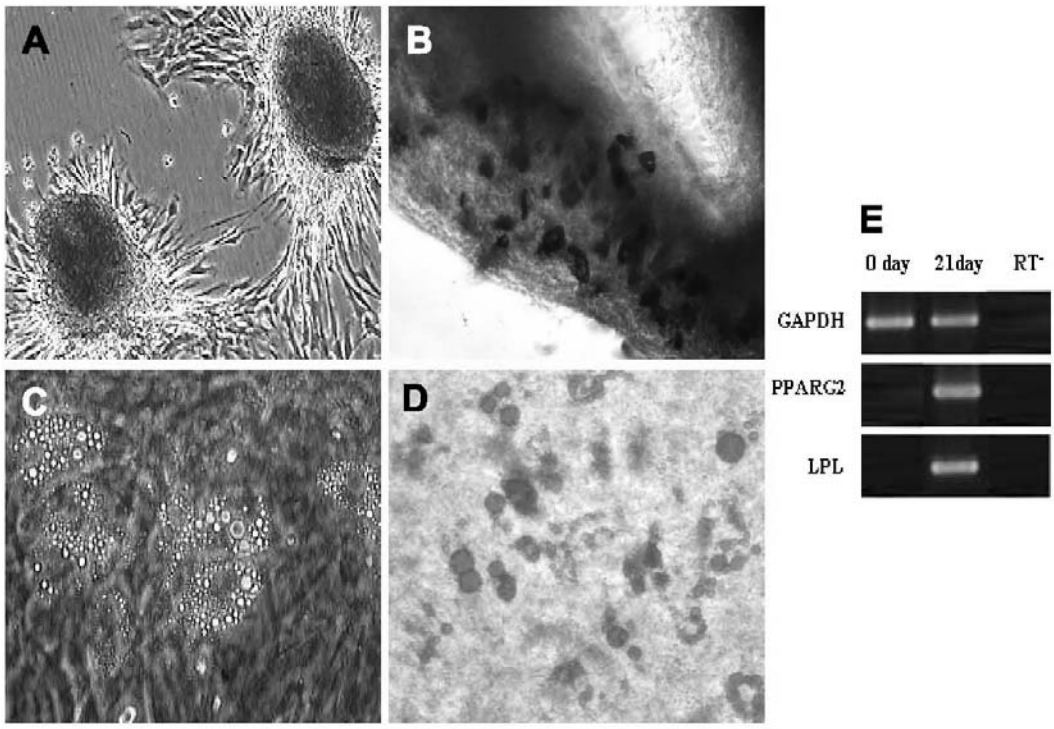
برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شده از پلت تمایز به غضروف، با رنگ‌آمیزی Safranin O مورد ارزیابی قرار گرفتند که حاصل آن ارغوانی شدن جایگاه‌های غنی از گلیکوز آمینو گلیکان بود (شکل ۴A وB۴). بررسی بیشتر با روش RT-PCR نشان داد که در توده سلولی تمایز یافته، از مارکرهای اختصاصی غضروف، کلاژن II و Decorin بیان شده ولی مولکول Agreacan تولید نشده است (شکل۴). شدت رنگ‌پذیری در رنگ‌آمیزی Safranin O و همچنین، باند تشکیل شده در بررسی RT-PCR در ده سگ مورد مطالعه تفاوت چندانی نداشت.



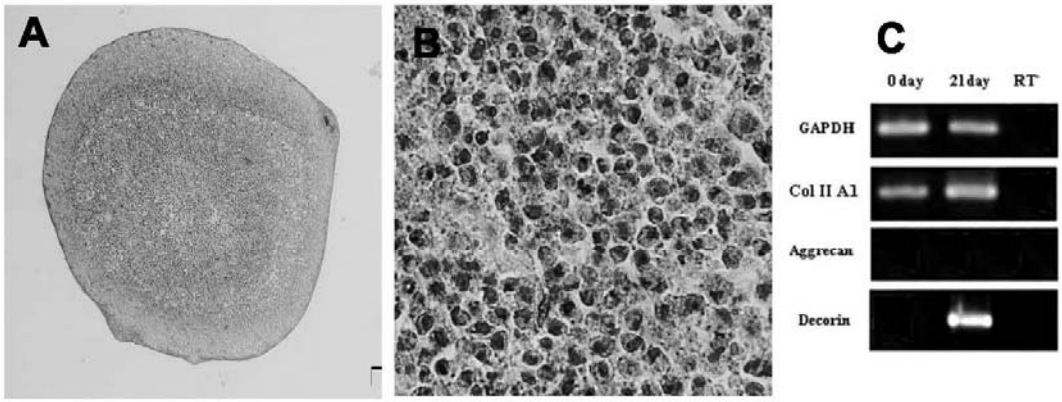




شکل ۲: تمایز به استخوان سلول مزانشیمی سگ. کشت سلول در پایان دوره تمایز A)بدون رنگ آمیزی B)با رنگ آمیزی آلیزارین رد که رنگ قرمز نشانگر مناطق معدنی شده است (بزرگنمایی ۱۰۰×، میکروسکوپ معکوس). C) آنالیز RT-PCR نشانگر بیان ژن های شاخص استخوانی است.
(مشاهده نمونه رنگی تصاویر در انتهای مقالات)



شکل ۳: تمایز به چربی سلول بنیادی مزانشیمی سگ. A) در طی دوره تمایز در برخی مناطق ندول های سلولی تشکیل شد. B) دراثر رنگ آمیزی با اویل رد قطرات چربی در مناطق ندول مانند قرمز رنگ شد. C) قطرات چربی در داخل سلول ها در مناطق تک لایه حتی بدون رنگ آمیزی نیز قابل مشاهده است. D) این قطرات با رنگ آمیزی اویل رد قرمز رنگ شد (بزرگنمایی ۱۰۰×، میکروسکوپ نوری معکوس). E) نتایج RT-PCR حاکی از بیان ژن های شاخص چربی بود (بزرگنمایی ۱۰۰×، میکروسکوپ معکوس) (مشاهده نمونه رنگی تصاویر در انتهای مقالات).



شکل ۴: تمایز به غضروف سلول های بنیادی مزانشیمی غضروف. A) برش های ۵ میکرومتری تهیه شده از پلت سلولی در اثر رنگ آمیزی با سافرانین O ارغوانی شده است که نشانگر گلیکوز آمینو گلیکان فراوان در کشت سلولی است (بزرگنمایی ۴۰×، میکروسکوپ نوری). B) سلول های غضروفی و ماتریکس آنها (بزرگنمایی ۴۰۰×، میکروسکوپ نوری). C) آنالیز RT-PCR نشان داد که کلاژن تیپ II و ماکرومولکول Decorin به عنوان شاخص غضروف به فراوانی در کشت تولید شده است ولی ژن Agreacan بیان نشده بود (مشاهده نمونه رنگی تصاویر در انتهای مقالات).

بحث

در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان سگ جداسازی و طی سه پاساژ متوالی تکثیر و تخلیص شد. این سلول‌ها، با فراهم شدن شرایط مناسب توانستند به رده سلول‌های استخوانی، چربی تمایز یابند. در شرایط کندروژنیک، mRNA کلاژن تیپ II و ماکرومولکول Decorin به میزان زیادی در سلول تولید شد ولی ژن آگریکان بیان نشد. در مطالعات پیشین، اغلب پتانسیل استوژنیک این سلول‌ها بررسی شده و پتانسیل تمایز به غضروف و چربی آنها به فراموشی سپرده شده است.

یکی از محدودیت‌های کار با سلول بنیادی مزانشیمی این است که برای این سلول‌ها مارکر ویژه‌ای شناسایی نشده است. اعتقاد بر این است که یکی از راه‌های حصول اطمینان از ماهیت بنیادی- مزانشیمی سلول، بررسی پتانسیل تمایز آن به دو یا چند رده سلولی است (۳۵-۳۳). این در حالی است که در مطالعات پیشین سلول‌های جدا شده از مغز استخوان سگ سلول مزانشیمی نامیده شده، بدون اینکه پتانسیل آنها در تمایز به سه رده استخوان و غضروف و چربی بررسی شود. مطالعه حاضر به پتانسیل‌های تمایزی سلول‌های فیبروبلاستی جدا شده از مغز استخوان سگ پرداخته است.

یکی از نتایج جالب تحقیق حاضر، رفتار سلول‌ها، در حین تکثیر بود. سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از مغز استخوان سگ، در کشت اولیه هنگام تکثیر، در مناطقی به شکل ندول‌های سلولی رشد کردند. البته این رفتار در پاساژهای سلولی نیز مشاهده شد. در کشت آدیپوژنیک نیز سلول‌های مزانشیمی در مناطقی به شکل ندول رشد کردند و در داخل این ندول‌ها سلول‌ها به آدیپوسیت متمایز شدند که این رفتار سلولی درگونه‌های دیگر گزارش نشده است. بر اساس مطالعات پیشین، سلول‌های مزانشیمی انسان و سایر رده‌ها، در کشت آدیپوژنیک در تمام مدت کشت به حالت تک لایه رشد می‌کنند (۲۵-۲۱).

براساس نتایج این مطالعه، چنین به نظر می‌رسد که تمایز به غضروف سلول‌های مزانشیمی سگی در مقایسه با انسان و سایر رده‌ها تا حدودی متفاوت است. به طوری که در کشت کندروژنیک سلول‌های مزانشیمی سگی، ماتریکس سرشار از گلیکوز آمینوگلیکان در لابه‌لای سلول‌ها تجمع یافته بود و mRNA کلاژن تیپ II و ماکرومولکول Decorin به میزان زیادی تولید شده بود ولی ژن آگریکان بیان نشده بود و این سلول‌ها از این نظر با سلول‌های انسانی و سایر رده‌ها که تولید آگریکان در تمایز کندروژنیک آنها گزارش شده است تفاوت داشتند.

با توجه به عدم تولید ماکرومولکول آگریکان در سلول‌های حاصل از تمایز کندروژنیک سگ و با در نظر گرفتن این نکته که این ماکرومولکول به عنوان ساختار اصلی ماتریکس غضروفی است می‌توان چنین استدلال کرد که غضروف حاصل از لحاظ ماتریکس ترشحی، بافتی نابالغ است و در نتیجه تمایز به غضروف سلول مزانشیمی سگ در سیستم micro mass به طور کامل انجام نمی‌گیرد. شاید این اساسی‌ترین تفاوت سلول مزانشیمی سگی با سایر رده‌ها باشد.

البته باید به این نکته توجه کرد که روش Micro mass تنها روش تمایز به غضروف نیست. برای تمایز کندروژنیک از روش کشت سلول بر روی داربست یا ماتریکس نیز استفاده شده است (۳۹-۳۶). شاید برای تمایز سلول‌های مزانشیمی سگی سیستم mass Micro مناسب نباشد و القای قوی‌تری نظیر استفاده از داربست و یا ماتریکس مناسب نیاز باشد. به هر حال این موضوع به مطالعه بیشتری نیاز دارد.

نتیجه‌گیری

روی هم رفته به نظر می‌رسد سلول مزانشیمی سگ همانند سلول مزانشیمی سایر رده‌ها نظیر انسان و موش پتانسیل تمایز به استخوان، چربی و غضروف را دارد ولی به نظر می‌رسد تمایز به غضروف این سلول‌ها در سیستم micro mass به طور کامل انجام نمی‌شود. به علاوه، در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی سگی بر خلاف سایر رده‌ها در زمان تکثیر و تمایز به چربی مناطق ندول مانندی ظاهر می‌شود که علت این پدیده برای ما ناشناخته است و نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

References

1. Prosper F, Perez A, Merino J, Rabago G Chachques J.C, Hernandez M, Barba J, Alegria E, Gavira JJ, Panizo A and Herreros J. Adult stem cells for myocardial repair. Basic Appl Myol 2003; 13(1): 15-22

2. Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. J Allergy Clin Immunol 2003; 111(2): 745-753

3. Fischbach GD, Fischbach RL. Stem cells: science, policy and ethics.The J Clin Invest 2004; 114(10): 1364-1369

4. 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: 625-634

5. Short B, Brouard N, Scott T, Ramakrishnan A, simmons PJ. Mesenchymal stem cells. Arch of Med Res 2003; 34: 565-571

6. Yoshikawa T, Noshi T, Mitsuno H, Hattoei K, Ichijima K, takakura Y. Bone and soft tissue regeneration by bone marrow mesenchymal stem cells. Mater Sci Engin 2001; 19-26

7. Woodbury D, Schwaz E, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons.J of Neuro Scien Res 2000; 61: 364-370

8. Chen L-B, Jiang Xb, Yang. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. World J Gastroenternol 2004; 10(20): 3016-

3020
9. Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, Laplante JM, Hatch HM, Petersen BE. Adult bone marrow-derived cells trans-differetiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. Lab Invest 2004; 84: 607-617
10. Minguell J.J, Erices A and Congent P: Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med 2001; 226(6): 507-520
11. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of Adult Stem Cellsderived from Bone Marrow Stroma into Leydig or Adrenocortical Cells. Endocrinology. 2006; 25 (Epub ahead of print)
12. 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 cardiomycyte phenotype in vitro. Exp Biol Med; 229: 623-631
13. Wanger W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, wirkner V, 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: 1416-1420
14. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Soilmani M, Tachikhani M, Shokrgozar MA. Isolation, culture and characterization of post natal human umbilical vein-derivad mesenchymal stem cells. DARU 2005; 13(4): 170-176
15. Friedenstein, AJ, Challakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cel Tissue Kinet 1970; 3: 393-403
16. Friedenstein AJ, Challakhyan RK, Latsinik NV, Panansyuk AF, Keiliss–Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation 1974; 17: 331-340
17. Friedenstein AJ, Deriglasora UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay methods. Exp Hematol 1974; 2: 83-92
18. Owen M. Marrow stromal stem cells. J Cell Sci 1988; 3: 63-76
19. Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. Ann Biomed Eng. 2004; 32: 160-165
20. Mohyeddin Bonab M, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavanzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC Cell Biol 2006; 7: 1-7
21. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. Exp Hematol 2002; 3: 879-886
22. Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ, Azizi SA. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engrafment in a rat model of Parkinson disease. Hum Gene Ther 1999; 10: 2539-2549
23. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Stargeon C, Hewett T, Chaung T, Stock W, Sher D, Weissman S, Ferrerk J, Mosca J, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. Exp Hematol 2001; 29: 244-255
24. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large full thickness defects of articular cartilage. J Bone Joing Surg 1994; 76: 579-592
25. Awad HA, Butler DL, Boivine GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI. Autologous mesenchymal stem cells mediated repair of tendon. Tissue Eng 1999; 5: 267-277
26. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K,Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Haupl T, Sittinger M. Porcine mesenchymal stem cells.Induction of distinct mesenchymal cell lineages. Cell Tissue Res 2002; 307: 321-327
27. Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, Davis-Sproul J, Chauang LC, Majumdar MK, Chopra R, Barry F, Murphy M, Thiede MA, Junker U, Rigg RJ, Forestell SP, Bohnlein E, Storb R, Sandmaier BM. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. Clin Orthop 2000; 379: 71-90
28. Jessop HL, Noble BS, Cryer A. The differentiation of a potential mesenchymal stem cells population within ovine bone marrow. Biochem. Soc Trans 1994; 22: 248
29. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri, S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. Dev. Growth. Differ

2006; 48: 361-370
30. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. Cell Transplant. 1997; 6(2): 125-134
31. Volk SW, Diefenderver DL, Christopher SA, Haskins ME, Leboy PS. Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells.Am J Vet Res 2005; 66: 1729-1737
32. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiala S. The Effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. J Bone Joint Surg 1998; 80: 958-996
33. Seshi B, Kumar S, Sellers D. Human bone marrow stromal cells: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages.Blood Cells Mol Dis 2000; 26: 234-246
34. Majumdar MK, Thiede MA, Hynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages.J Hemathother Stem Cell Res 2000; 9: 841-848
35. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express gene encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanism.Circ Res 2004; 678-685
36. Johnstone B. Mesenchymal stem cells and chondrogenesis. Europ Cell Mat 2002; 27
37. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. Tissue Eng 1998; 4, 415-428
38. Cheung HS. In vitro cartilage formation on porouse hydroxyl apatite ceramic granules. In Vitro Cell Dev Biol 1985; 21: 353-357
39. Van susante JL, Buma P, Van osch GJ, Versleyen D, Van Der Kraan PM, Van Der Berg WB, Homminga GN. Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. Acta Orthop Scand 1995; 66: 549-556