



## تأثیر عصاره بافت غضروفی جنینی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست

مرضیه رضانی<sup>۱\*</sup>، رمضان خان‌بابایی<sup>۲</sup>، ویدا حجتی<sup>۱</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه زیست‌شناسی، دامغان، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائم‌شهر، گروه زیست‌شناسی، قائم‌شهر، ایران

مسئول مکاتبات: marzieh\_ramezani87@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۷

### چکیده

تمامی سلول‌های بنیادی از دو گروه سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بزرگسال منشأ می‌گیرند. مهمترین سلول‌های بنیادی بزرگسال، سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند. سلول‌های مزانشیمی سلول‌هایی پرتوان و غیرخونساز با قابلیت خودنوزایی و پتانسیل تمایزی بالا می‌باشند. این سلول‌ها در مغز استخوان و سایر بافت‌های اسکلتی وجود دارند. سلول‌های مزانشیمی از منشأ مغز استخوان قادرند به سلول‌های استئوبلاست، استئوسیت، چربی، غضروفی، تاندون و ماهیچه در شرایط *in vivo* و *in vitro* تمایز یابند. تمایز استئوبلاستی در آزمایشگاه نیازمند عوامل متعددی است تا شرایطی همانند میکرومحیط بافت استخوان ایجاد کنند. در این تحقیق اثر عصاره بافتی جنین موش ۱۵ روزه در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های استئوبلاستی مورد مطالعه قرار گرفت. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش جدا شده و در فلاسک‌های حاوی محیط DMEM-F12،  $100 \mu\text{g/mL}$  استرپتومایسین،  $100 \text{ IU/mL}$  پنی‌سیلین و  $10\%$  FBS کشت شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی با انجام عمل پاساژ خالص گردیده، سپس تحت تأثیر عصاره بافت غضروفی جنین موش ۱۵ روزه قرار گرفتند. پس از پایان کشت ۲۱ روزه، برای تشخیص سلول‌های استئوبلاستی از رنگ آلیزارین قرمز استفاده شد. پس از تأثیر عصاره، سلول‌های بنیادی مزانشیمی دوکی شکل تغییر شکل داده و زوائد فراوانی در هر سلول مشاهده گردید. رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاستی را نشان می‌دهد. همچنین تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فاکتورهای مورفوژنی و استئوژنز عصاره بافت غضروفی جنین موش ۱۵ روزه را تأیید می‌کند. این نتایج تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بیان می‌کند، از اینرو می‌توان در تمایز استئوبلاستی مدل‌های آزمایشگاهی و درمان بیماری‌های ژنتیکی استخوان به فراوانی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی، عصاره بافت، جنین موش، تمایز سلولی، استئوبلاست

### مقدمه

کندروسیتی، آدیپوسیتی و سلول‌های ماهیچه‌ای را دریافتند [۱۵، ۱۸، ۲۵]. همچنین تمایز به بافت‌های دیگر که از مشتقات آنها نیستند نظیر قلبی و عصبی شناخته شده است [۲۲]. همچنین در طی مطالعات، سلول‌های بنیادی مزانشیمی پتانسیل تکثیر، تمایز و ترمیمی بالایی از خود نشان داده‌اند [۱، ۲، ۸]. از اینرو پژوهشگران از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان بیماری‌های استخوانی و غضروفی به فراوانی استفاده می‌کنند. درمان بیماری‌ها و آسیب‌های استخوانی بطور خودبخودی و با درمان دارویی بسیار سخت می‌باشد، اگرچه از پیوند آلوگرافت هم می‌

تمامی سلول‌های موجود در بدن از دو نوع سلول بنیادی نشأت می‌گیرد. سلول بنیادی جنینی و سلول بنیادی بزرگسال. سلول‌های بنیادی جنینی نسبت به سلول‌های بنیادی بزرگسال قابلیت تمایزی بیشتری به رده‌های مختلف سلولی را دارا هستند. امروزه کاربرد فراوان سلول‌های بنیادی بزرگسال در درمان بیماری‌ها شناخته شده و پیشرفتی افزایشی داشته است. از جمله سلول‌های بنیادی بزرگسال می‌توان به سلول بنیادی مزانشیمی اشاره کرد. محققان با پژوهش بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، قابلیت تمایز آنها به رده‌های استئوسیتی،



کامل تمایز سلول‌های مزانشیمی به رده سلولی ویژه‌ای را ممکن می‌سازد اما با مشکلاتی همراه است. از جمله خطا در مقدار مورفوژن مورد نیاز برای ایجاد تمایز و نیز هزینه مالی بسیار بالا در تحقیقات روزانه آزمایشگاهی مقرون به صرفه نمی‌باشد. از این رو با استفاده از جایگزین‌هایی با همان عملکرد همانند عصاره‌های بافت جنینی می‌توان زیان‌های استفاده از فاکتورهای اختصاصی را جبران کرد و هزینه صرف شده جهت این تمایز را به حداقل رساند. عصاره بافتی علاوه بر داشتن فاکتورهای مورد نیاز برای تمایز سلولی دارای پروتئین‌های فراوان مربوط به همان موقعیت تمایزی می‌باشد، که شرایط مشابه‌ای مانند **in vivo** را تعبیه می‌کند. همچنین تهیه و استفاده آن آسان‌تر از القاءکننده‌های موجود است. در تحقیق حاضر اثر عصاره بافت غضروفی جنین ۱۵ روزه موش نژاد **Balb/c** در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان به سلول‌های استخوانی مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش کار

**جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی:** در مطالعه حاضر از ۱۵ سر موش نژاد **Balb/c** با سن تقریبی ۶-۸ هفته استفاده شد. موش‌ها با جابجایی مهره‌های گردنی کشته شده و استخوان ران آنها خارج گردید. مغزاستخوان از استخوان ران با عمل **flushing** در لوله سانتریفوژ حاوی محیط **DMEM**، **FBS** و **Penicillin-Streptomycin** استخراج گردید. سپس سلول‌های بدست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با دور **۳۵۰g** سانتریفوژ شدند. پس از تخلیه محیط رویی، پلیت سلولی موجود در انتهای لوله سانتریفوژ را با یک میلی‌لیتر محیط **DMEM** به حالت سوسپانسیون درآورده و از سوسپانسیون سلولی ایجاد شده به غلظت  $1 \times 10^5$  سلول در هر میلی‌لیتر تهیه گردید. سپس در فلاسک ۲۵ سانتی-متری ۵ میلی‌لیتر **DMEM-F12** حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی،  $100 \mu\text{g/mL}$  استرپتومایسین، **IU/mL**

توان استفاده کرد اما سلول‌های مورد استفاده پتانسیل تکثیری و تمایزی بسیار کمی دارند و گزینه مناسبی برای درمان بیماری استخوانی محسوب نمی‌شوند [۱۰، ۱۹، ۲۷]. در حالیکه سلول درمانی راهی جدید و آسان‌تر را در درمان اینگونه بیماری‌ها با افزایش بهبودی فراهم آورده است. بدین سبب محققان و پزشکان درمان بیماری‌ها توسط سلول‌درمانی را در آینده‌ی نزدیک وعده داده‌اند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی اولین بار توسط پتراکورا و فریدین اشتاین در سال ۱۹۶۶ از مغز استخوان رت شناسایی و جدا گردیدند [۱۴]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرتوان در طول تکوین جنینی از سلول‌هایی با منشأ مزانشیمی مشتق می‌شوند. این سلول‌ها در بافت‌های مختلفی قرار می‌گیرند و با توجه به محل قرار گیری اختصاصی می‌شوند. در هنگام آسیب بافتی، این سلول‌ها در ترمیم و بازسازی محل آسیب دیده شرکت می‌کنند. این ویژگی، توان نوزایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بیان می‌کند و به مدت طولانی با انجام تقسیمات میتوزی توان خود را حفظ می‌کنند. در شرایط آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از حالت خاموش بیرون آمده و چرخه سلولی خود را از سر می‌گیرند [۱۲، ۲۰]. تکثیری پیوسته را آغاز و کلنی‌های کوچک و متراکم فیبروبلاستی را ایجاد می‌کنند [۱۱، ۱۳]. هرکلنی منفرد مشتق شده از یک سلول، از لحاظ پتانسیل تمایزی هتروژن می‌باشد. یک سوم کلون‌های کشت اولیه از نظر تمایزی چند توان بوده و قادرند به سه رده استخوانی، غضروفی و چربی تمایز یابند و مابقی تنها پتانسیل دو رده استخوانی و غضروفی یا یک رده را دارند. اما تمامی کلنی‌ها توان تمایز به استخوان را دارا هستند [۳]. با تأثیر فاکتورهای اختصاصی بر سلول‌های مزانشیمی همانند بتاگلیسروفسفات، دگزامتازون و آسکوربات، تمایز به سمت رده سلولی استخوانی امکان‌پذیر است [۹، ۱۶، ۲۶]. حضور گلوکوکورتیکوئیدها و فسفات‌ها در محیط موجب بیان نشانگرهای سطحی استخوان و بیان ژن تنظیمی استخوان‌زایی **Cbfa1** می‌شوند [۶، ۷، ۲۴]. اگرچه فاکتورهای اختصاصی بطور



۳۰ و ۴۰٪ قرار گرفتند. کشت و تمایز سلولی به مدت ۲۱ روز، و تعویض محیط و عصاره جنینی هر ۴۸-۷۲ ساعت انجام گرفت. پس از پایان دوره تمایز سلول‌های مزانشیمی، با رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز حضور سلول‌های استخوانی مورد تأیید قرار گرفت.

**رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز:** رنگ‌آمیزی اختصاصی سلول‌های استخوانی توسط رنگ آلیزارین قرمز صورت گرفت. ابتدا سلول‌ها با آب دیونیزه شستشو و با الکل ۷۰٪ به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس سلول‌ها شستشو و با رنگ آلیزارین قرمز ۲٪ به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از آن با آب دیونیزه شستشو و در دمای اتاق خشک شد [۵]. تشخیص سلول‌های استخوانی با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از نرم‌افزار **Image analysis** رنگ‌پذیری و تعداد سلول‌های استخوانی مورد مطالعه قرار گرفت.

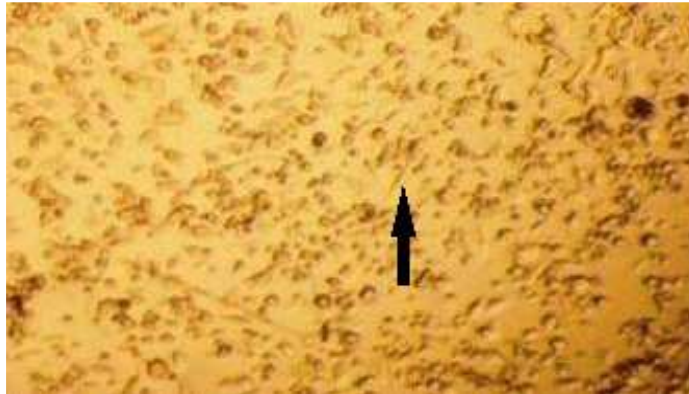
### نتایج

کنترل وضعیت تکثیر سلول‌های مزانشیمی از روزهای آغازین کشت با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا سلول‌ها جمعیتی ناهمگن را تشکیل و ظاهری فیروپلاستی نشان دادند (شکل ۱ و ۲)، اما در هفته دوم سلول‌ها تغییر شکل داده و دوکی شکل شدند (شکل ۳). با افزایش دفعات پاساژ سلولی جمعیت یکنواختی از سلول‌های مزانشیمی بدست آمد (شکل ۴). علاوه بر عمل پاساژ، سلول‌های غیر مزانشیمی به دلیل عدم چسبندگی به کف ظرف به افزایش خالص‌سازی کمک می‌کنند.

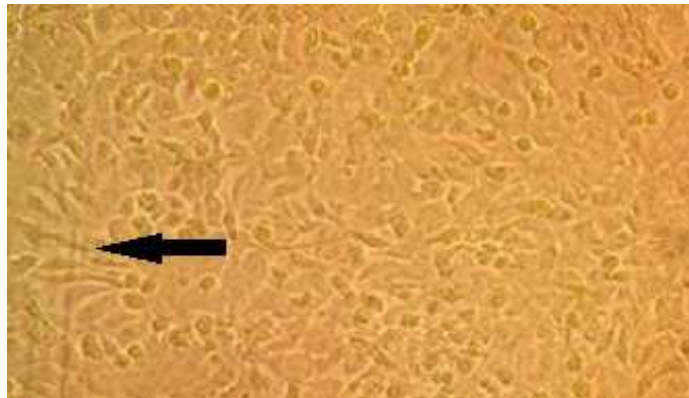
۱۰۰ پنی سیلین (Sigma, USA) کشت داده شدند. ظرف کشت به انکوباتور CO<sub>2</sub> ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل و هر ۷۲-۴۸ ساعت تعویض محیط انجام گردید. در طی ۱۴ روز با مشاهده تراکم سلولی ۹۵٪ در کف فلاسک، پاساژ سلولی با کمک **Trypsin-EDTA** ۰/۰۲۵ درصد خالص‌سازی صورت گرفت. پس از پاساژ هفتم سلول‌ها وارد ظرف کشت ۹۶ خانه شدند و تحت تاثیر عصاره بافت غضروفی جنینی ۱۵ روزه قرار گرفتند.

**عصاره‌گیری بافت جنینی:** برای تهیه عصاره بافتی از روش **Tetsuro** و همکاران با اندکی تغییر استفاده شد. جنین‌های ۵ سر موش باردار نژاد **Balb/c** در شرایط استریل ابتدا از شکم و سپس از شاخ رحمی خارج گردید. جنین‌ها از کیسه کوریونی بیرون آورده و از جفت و رگ‌های خونی اطراف کاملاً تمیز شدند. جنین‌ها در محیط **DMEM-F12** حاوی ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین قرار گرفتند. سپس جنین‌ها را از محیط قبلی به ظرف حاوی **KCL** ۲٪ به مدت ۲۰ دقیقه جهت تورم سلولی انتقال داده شدند. جنین‌ها به قطعات بسیار ریزی تقسیم و در لوله سانتریفوژ به مدت ۴۰ دقیقه با دور **۱۲۰۰g** سانتریفوژ شد. مایع رویی در میکروتیوب جمع‌آوری و در دمای ۱۸- نگهداری شد. عصاره بافت جنینی ۱۵ روزه با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ و ۴۰٪ تهیه شدند.

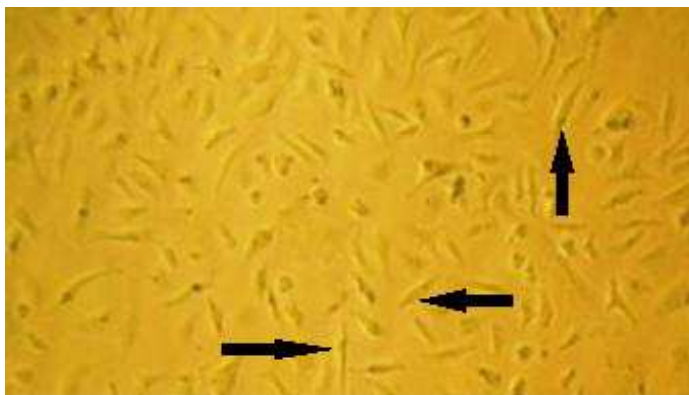
**بررسی توان تمایز سلولی به استخوان:** سلول‌ها پس از پاساژ هفت وارد ظرف کشت ۹۶ خانه شدند. پس از ۴۸ ساعت سلول‌های مزانشیمی کف خانه‌ها را پر کرده و به همراه تعویض محیط، اثردهی عصاره جنینی نیز انجام شد. گروه کنترل حاوی محیط **DMEM-F12**، **FBS**، **Penicillin-Streptomycin** بوده و ۴ گروه دیگر تحت تاثیر عصاره جنینی ۱۵ روزه با ۴ غلظت ۱۰، ۲۰،



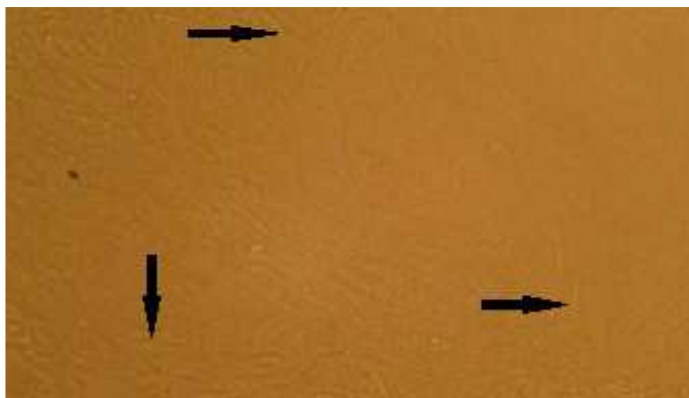
شکل ۱- جمعیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از استخراج



شکل ۲- سلول‌های مزانشیمی در هفته‌ی دوم



شکل ۳- سلول‌های مزانشیمی پس از پاساژ اول

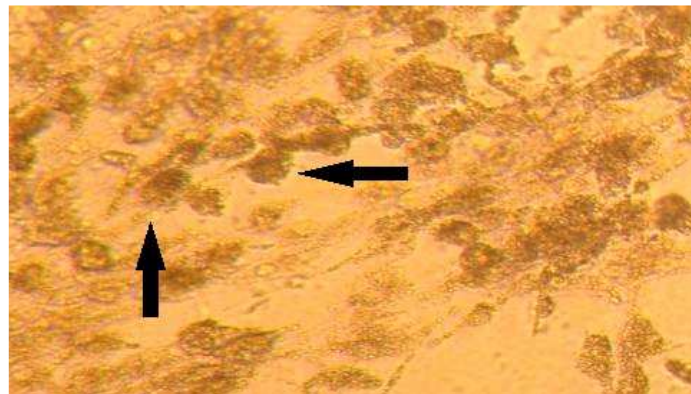


شکل ۴- سلول‌های مزانشیمی پس از پاساژ ۷

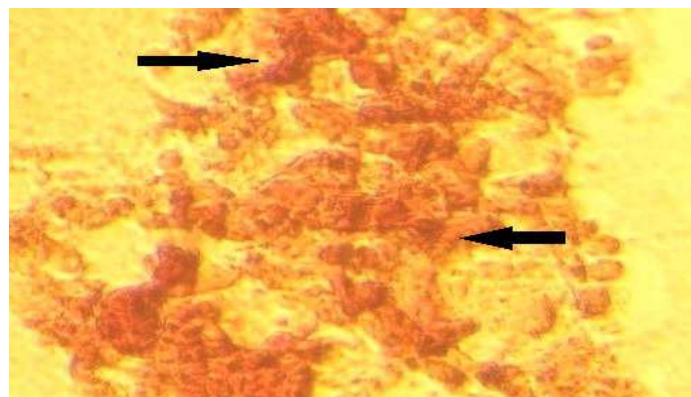
افزایش یافته است. به گونه‌ای که افزایش شدت رنگ-پذیری در غلظت‌های بالا این موضوع را تأیید می‌کند (شکل ۷، ۸، ۹ و ۱۰). اگرچه گروه کنترل به دلیل عدم وجود سلول‌های استخوانی فاقد رنگ‌پذیری بوده است و تصاویری ذکر نشده است.

پس از رنگ‌آمیزی اختصاصی، جمعیت سلولی هر غلظت بر اساس رنگ‌پذیری تعداد سلول توسط نرم‌افزار **image analysis** مورد بررسی قرار گرفتند [۶ و ۱۷] (شکل ۱۱) (نمودار ۱). همانطور در نمودار دیده می‌شود در غلظت ۴۰٪ میزان رنگ‌پذیری نسبت به دیگر غلظت‌ها دارای افزایش بوده است و اثرگذاری عصاره بافت جنینی بر تمایز سلول‌های مزانشیمی را نشان می‌دهد.

پلیت سلولی به مدت ۲۱ روز در معرض محیط استئوژنیک شامل عصاره جنینی قرار داده شد و هر ۳-۴ روز تعویض محیط کشت و عصاره انجام شد. با گذشت روزهای میانی سلول‌های استخوانی کلنی‌های بهم پیوسته-ای تشکیل دادند، به گونه‌ای که با نزدیک شدن به پایان دوره کشت فضاهای بین سلولی با زوائد سلول‌های استخوانی پوشیده شدند (شکل ۵ و ۶). رنگ‌آمیزی اختصاصی سلول‌های استخوانی توسط آلیزارین قرمز انجام شد. تشکیل کمپلکس‌های فراوان آلیزارین و کلسیم تولید شده در سلول‌ها تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست را تأیید می‌کند [۲۵]. با افزایش غلظت عصاره، تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاستی نیز



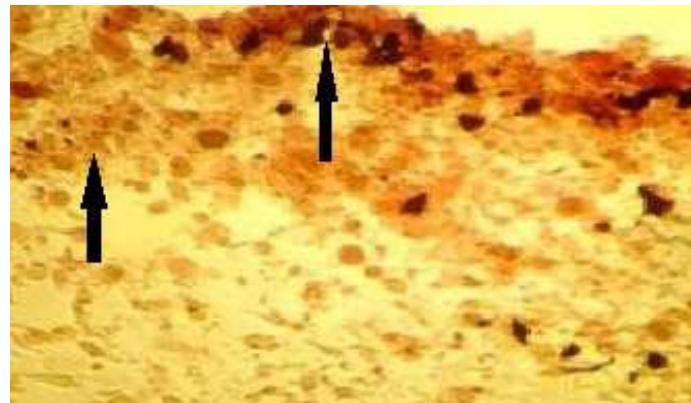
شکل ۵- سلول‌های استخوانی در محیط کشت استئوژنیک



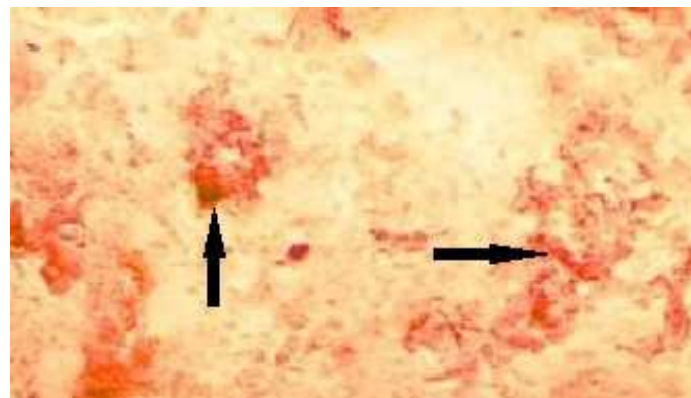
شکل ۶- سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته به استخوان پس از رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز



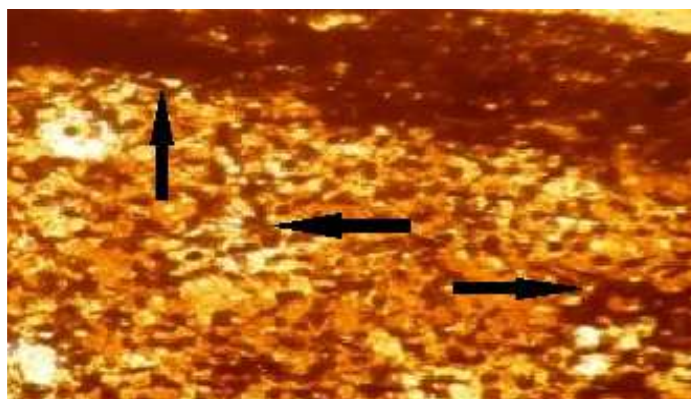
شکل ۷- رنگ آمیزی آلیزارین قرمز سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته به استئوبلاست با عصاره جنینی ۱۵ روزه غلظت ۱۰٪



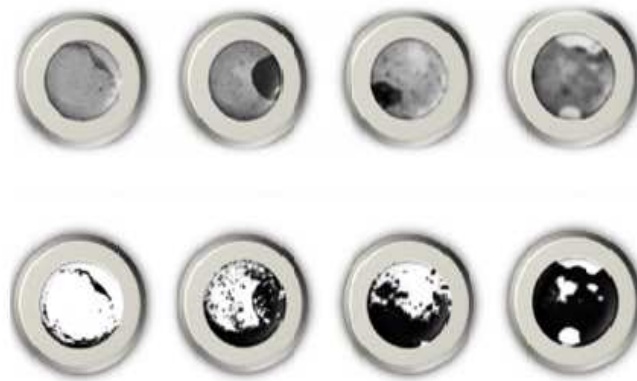
شکل ۸- رنگ آمیزی آلیزارین قرمز سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته به استئوبلاست با عصاره جنینی ۱۵ روزه غلظت ۲۰٪



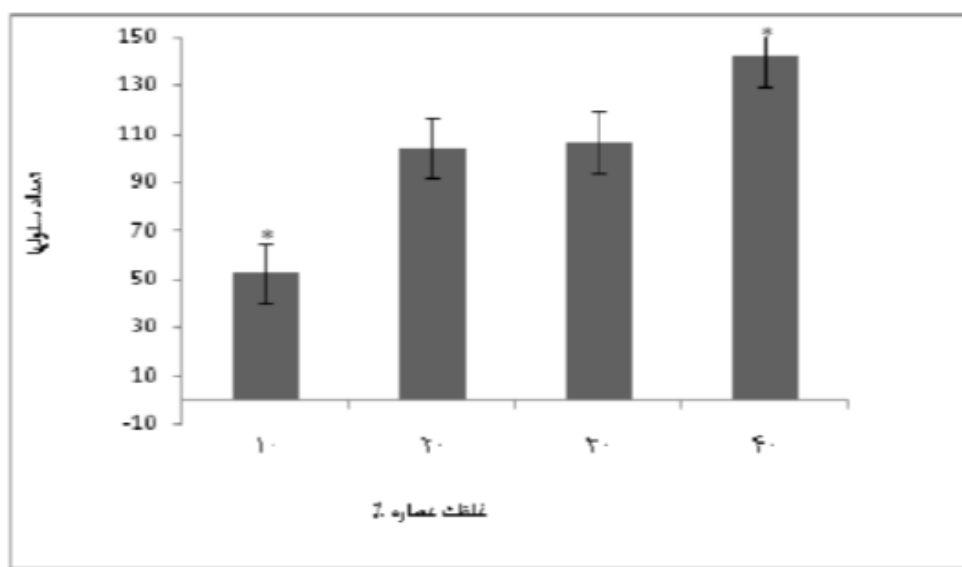
شکل ۹- رنگ آمیزی آلیزارین قرمز سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته به استئوبلاست با عصاره جنینی ۱۵ روزه غلظت ۳۰٪



شکل ۱۰- رنگ آمیزی آلیزارین قرمز سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته به استئوبلاست با عصاره جنینی ۱۵ روزه غلظت ۴۰٪



شکل ۱۱- تصاویر رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز سلول‌های استخوانی. تصاویر ول‌های اسکن شده با Photoshop و آنالیز شده با Image analysis



نمودار ۱- میزان اثرگذاری عصاره بافتی جنین ۱۵ روزه بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاستی (0 رنگ سفید و 150 رنگ سیاه) ( $p \leq 0/05$ ).

### بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از گروه سلول‌های بنیادی بزرگسال مغز استخوان هستند که اولین بار در سال ۱۹۶۶ توسط فریدین اشتاین کشف شد. این سلول‌های چندتوان به علت عدم چسبندگی‌شان به کف فلاسک، همچنین تکثیر و تمایز آسان به چندین رده سلولی از دیگر سلول‌های بنیادی متمایز شده‌اند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به علت داشتن ویژگی خودنوزایی بالا، جهت سلول درمانی و ژن درمانی برگزیده شده است. این سلول‌ها قابلیت تمایز به سلول‌های رده استئوسیت، کندروسیت، آدیپوسیت،

سلول‌های عصبی و عضلانی را در شرایط آزمایشگاهی دارا هستند [۵، ۱۵، ۱۸، ۲۲]. علاوه بر موارد فوق، همانند سلول‌های بنیادی جنینی می‌توانند به سلول‌های عصبی و هپاتوسیتی با منشأ اکتودرمی و اندودرمی تمایز یابند [۲۵]. همانطور در این مطالعه مشخص شد سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی تمایز به سلول‌های استخوانی با استفاده از فاکتور تمایزی عصاره بافت جنینی را دارا هستند. فرآیند تمایز استئوبلاستی تحت تاثیر عوامل هورمونی، مسیرهای پیام‌رسانی، فاکتورهای رشد و فاکتورهای

### نتیجه‌گیری

بر اساس بررسی‌های انجام شده، عصاره جنینی ۱۵ روزه به عنوان القاء کننده استئوژنز نسبت به دیگر موارد از نظر اثرپذیری و تمایز کوتاه‌مدت، شبیه‌سازی شرایط *in vivo* برای سلول‌های مزانشیمی و کاهش مرگ سلولی دارای برتری است. از این رو می‌توان کیفیت تولید سلول‌های استئوبلاستی را افزایش داده و به این شیوه کاربرد مؤثرتری در سلول‌درمانی بیماری‌های استخوانی دارد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کارشناسان پژوهشکده سلولی‌مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر سرکار خانم وحیدا مهدوی و سرکار خانم سپیده میرزا نژاد که در طی این دوره ما را یاری کردند سپاسگزاریم.

### منابع

- ۱- باغبان اسلامی نژاد، م.، تقی‌یار، ل.، قارزی، ا. ۱۳۸۵. مطالعه پتانسیل تمایز به غضروف سلول‌های فیبروبلاستی جدا شده از مغز استخوان موش *NMRI*. مجله علمی-پژوهشی علوم تشریح ایران، سال چهارم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۵، صفحه ۱۱۹-۱۳۰.
- ۲- ترفیعی، ق.، محمودی‌نیا میمند، م.، نوروزی‌نیا، م. ۱۳۸۸. اثر فاکتورهای القاء کننده در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست. مجله ژنتیک در هزاره سوم، سال هفتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۸، صفحه ۱۸۶۴-۱۸۷۰.
- ۳- رضائی، م.، پیریایی، ف.، عینی، ف.، فلاح رئوفی، م. ۱۳۸۸. جداسازی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه به سلول‌های رده استخوان، غضروف، چربی. فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، شماره ۴، پاییز ۸۸، صفحه ۳۵-۴۴.

نسخه‌برداری اختصاصی صورت می‌گیرد [۱، ۲، ۷، ۲۴]. سلول‌های استخوانی بالغ شامل استئوبلاست و استئوسیت می‌باشد. استئوبلاست‌ها پیش‌ساز سلول‌های استئوسیتی بوده و تحت تأثیر فاکتورهای رشد و هورمون‌ها این فرآیند تنظیم می‌شود [۱، ۲، ۳].

در طی دوره جنینی موش، روزهای ۱۲ تا ۱۷ فاکتورهای موثر در استخوان‌زایی تولید و توزیع می‌شوند. اگرچه در روزهای ۱۲ تا ۱۷ القاء‌کننده‌های استئوژنز در حال فعالیت می‌باشند، اما طبق مطالعات انجام شده روز ۱۵ جنینی با در نظر گرفتن مقدار درصد بکار رفته قابلیت تمایز بیشتر در زمان کمتر را دارا می‌باشد. از این رو پژوهشگران می‌توانند آن را جایگزینی مناسب همانند القاء کننده‌های معمول مورد استفاده در تمایز *in vitro* استئوژنز را در اختیار بگیرند. استئوژنز توسط پروتئین مورفوزن استخوان‌زا-۲ (BMP2)، فاکتور رشد تبدیل‌کننده  $\beta$  (TGF $\beta$ )، مسیر پیام‌رسان Wnt5a، هورمون پاراتیروئید و فاکتور رشد فیبروبلاستی پشتیبانی می‌شود [۴، ۱۵]. مهمترین فاکتور رونویسی استئوژنز Runx2/Cbfa1 می‌باشد و مارکری برای شناسایی سلول‌های استئوبلاستی در فرآیند تمایزی کاربرد دارد [۶، ۷]. از دیگر مارکرهاست استئوبلاستی می‌توان سیالوپروتئین، استئوپوننتین، کلاژناز، استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز نام برد [۱، ۲]. آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین در مینرالیزه شدن استئوبلاست‌ها دلالت دارند. با مینرالیزه شدن و حضور کلسیم، رنگ‌پذیری استئوبلاست‌ها با آلیزارین قرمز امکان‌پذیر است [۳، ۲۴]. رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز توانایی تولید کلسیم در سلول‌ها را تأیید می‌کند و وجود سلول‌های استئوبلاستی کلسیفیه شده در محیط را نشان می‌دهد. رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز به عنوان مارکر استاندارد تأیید تمایز استئوبلاستی در تحقیقات پیشین شناخته شده است [۱، ۲].





- 13- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., N.V.Latsinik, A.F. Panansyuk, I.V. Keiliss - Borok (1974), Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation. *In vivo Transplantation*, 17: 331-40.
- 14- Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, K.V. Petrakova (1966), Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 16(3): 381-90
- 15- Gordeladze J.O., E. Janne (2010), Reseland from Stem Cells to Bone. *ILAR Journal*, 2010: 51(1): 42-61
- 16- Hu, Y.L., L. Ma, G. Ma (2002), Comparative study of human fetal and adult bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*; 23(12): 645-8. (In chinees).
- 17- Huang, Z.H., E.R. Nelson, L. Smith (2007), The Sequential Expression Profiles of Growth Factors from Osteroprogenitors to Osteoblasts In Vitro. *Tissue Engineering*, 13(9): 2311- 2320
- 18- Kumar, S., C. Wan, G. Ramaswamy (2010), Mesenchymal stem cells expressing osteogenic and Mesenchymal stem cells expressing osteogenic and angiogenic factors synergistically enhance bone formation in a mouse model of segmental bone defect. *Molecular Therapy*, 18(5): 1026-34
- 19- Logeart-Avarmgnostou, F., R. Bizious, H. Petite (2005), Engineering bone: challenges and obstacles. *Journal of Cell and Molecular Medicine*, 9: 72-84
- 20- Minguell, S.S., P. Conget, A. Erices (2000), Biology and clinical utilization of Mesenchymal progenitor cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33: 881-887.
- 21- Muraglia, A., Cancedda R, Quarto R. (2000), Clonal mesenchymal progenitor from human marrow differentiation in vitro according to hierarchical model. *Journal of Cell Science*, 113: 1161-1166
- 22- Pansky, A., B. Roitzheim, E. Tobiasch (2007), Differentiation potential of adult
- 4- Alhadlaq, A., J. Mao (2004), Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev*, 13(4): 436-48.
- 5- Baksh, D., L. Song, R.S. Tuan (2004), Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 8(3): 301-16
- 6- Bennett, J.H., C.J. Joyner, J.T. Ttiffitt, M.E. Owen (1991), Adipocyte cells cultured from marrow has Osteogenic potential. *Journal of Cell Science*, 99: 131-139
- 7- Beresford, J.N., J.H. Bennett, C. Delvin, P.S. Leboy, M.E. Owen (1992), Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *Journal of Cell Science*, 102: 341-351
- 8- Bruder, S.P., K.H. Krause, S.E. Hayneworth (1997), Growth kinetic, self renewal, and the osteogenetic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive sub cultivation and following cryopreservation. *Journal of Cell Biochemistry*, 62: 247-294
- 9- Collas, P., S. Timoskainen, A. Noer (2009), Epigenetic basis for differentiation plasticity in stem cells. In: Rajasekhar VK, Vemuri MC. Editors. Human press, 257-68.
- 10- Freed, L.E., G. Vunjak -Novakovic (1995), Tissue engineering of cartilage. The Biomedical Engineering Handbook. CRC Press, 1778-96.
- 11- Friedenstein, A.J., U.F. Deriglasova, N.N. Kulagina (1974), Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay methods. *Experimental Hematology*, 2: 83-92.
- 12- Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, K.S. Lalykina (1970), The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pic bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinetics*, 3: 393-403.



human Mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical and Biotechnology*, 1: 24-34.

26- Takada, I., A.P. Kouzmenko, S. Kato (2009), Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13(5): 593-603.

27- Yang, W.D., S.J. Chen, T.Q. Mao, F.L. Chen, D.L. Lei (2003), A study of injectable tissue engineering autologous cartilage. *Journal of Clinical Dental Research*, 10-15.

human mesenchymal stem cells. *Journal of Clinical Lab*, 53(1-2): 81-4.

23- Pittenger, M.F., A.M. Mackay, S.C. Beck (1977), Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147.

24- Rastegar, F., Shenaq D., Huang J. (2010), Molecular characteristics and clinical applications. *World Journal of Stem Cells*; 2: 67-80

25- Salasnyk, R.M., W.A. Williams, A. Boskey, A. Batorsky, G.E. Plopper (2003), Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of