

## جداسازی، کشت و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به سلول های رده استخوان

زینب صحرائیان<sup>۱</sup>، مریم آیت الهی<sup>۲</sup>، رامین یعقوبی<sup>۳</sup>، مهرداد شریعتی<sup>۴</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشکده علوم پایه، شیراز، ایران.

۲- استادیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعصاب بیمارستان نمازی، شیراز، ایران. [ayatollmb@yahoo.com](mailto:ayatollmb@yahoo.com)

۳- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعصاب بیمارستان نمازی، شیراز، ایران.

۴- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، دانشکده علوم پایه، کازرون، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱۵

### چکیده

مقدمه و هدف: سلول های بنیادی مزانشیمی در بافت های متنوعی مثل مغز استخوان یافت می شوند. این سلول ها با دارا بودن ویژگی چندتوانی، قابلیت تمایز به انواع رده های مزودرمی را دارند. سلول های بنیادی مزانشیمی به عنوان کاندید مناسبی در سلول درمانی معرفی شده اند. در این تحقیق توانایی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به سلول های رده استخوان مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: پس از استخراج مغز استخوان از استخوان لگن افراد دهنده، مراحل جداسازی سلول ها صورت گرفت. سپس سلول های جدا شده در محیط کشت مناسب کشت داده شدند. جهت تعیین هویت سلول ها از فلو سائتومتری استفاده شد. سلول های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت تمایزی استخوان کشت داده شده و سپس رنگ آمیزی اختصاصی صورت گرفت.

یافته ها: نتایج آنالیز فلو سائتومتری نشان داد که این سلول ها نسبت به مارکرهای CD ۴۵ و CD ۸۰ منفی می باشند، در حالی که نسبت به مارکر CD ۹۰ مثبت هستند و سلول های بنیادی مزانشیمی پس از ۲۱ روز به سلول های استخوانی تمایز یافتند.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان یکی از منابع مهم سلول های بنیادی می باشند که توانایی تمایز به رده استخوان را دارا می باشند.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمی، مغز استخوان انسان، استخوان، تمایز.

### مقدمه

آزمایشگاه از نظر مورفولوژیکی مخروطی شکل و شبیه فیروبلاست می باشند و در مراحل اولیه رشد تشکیل واحدهای کلنی شکل می دهند، اما از نظر تکثیر، تمایز و پاسخ به تحریک توسط فاکتورهای رشد، خصوصیات متفاوتی را بروز می دهند (۷). جامعه بین المللی سلول درمانی ویژگی های لازم برای شناخت سلول های بنیادی را چسبندگی، انعطاف پذیری سلول-های جدا شده در محیط کشت آزمایشگاهی، بیان مارکرهای CD۱۰۵، CD۳ و CD۹۰ و عدم بیان

سلول های بنیادی مزانشیمی اولین بار در سال ۱۹۷۶ توسط Friedenstein کشف شد (۹). هر چند که این سلول ها معمولاً از مغز استخوان استخراج می شوند، اما در سایر محل ها مثل بافت چربی، غشاء سینوویال، مایع سینوویال، ماهیچه اسکلتی، پوست، خون بند ناف، جفت، کبد، طحال و تیموس نیز یافت می گردند (۱۴، ۵، ۲). لازم به ذکر است که سلول های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت های مختلف، ویژگی های فنوتیپی مشابهی را نشان می دهند. مثلاً در محیط

بیمارستان نمازی شیراز، آسپیره و سریعاً به آزمایشگاه سلول‌های بنیادی مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا این بیمارستان منتقل شد. به ازای ۵ میلی لیتر خون، ۵ میلی لیتر محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco; Germany) حاوی ۱۰٪ سرم (Fetalbovineserum, Gibco; Germany)، یک درصد ال-گلوتامین (Gibco; Germany) و یک درصد آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین/پنی‌سیلین (Gibco; Germany) به آن اضافه و سپس پیپتینگ شد. ۵ میلی لیتر از خون رقیق شده را به آرامی و از جداره فالكون بر روی ۳ میلی لیتر فایکول ریخته و سپس با دور ۲۰۰۰ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سلول‌های تک هسته‌ای از سایر لایه‌ها جدا و به آن حدود ۹ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید. سپس با دور ۱۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. حدود یک میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی را در ۴ میلی‌لیتر محیط کشت (حاوی ۱۰ درصد سرم FBS) در فلاسک T۲۵ به طور یکنواخت کشت داده و در داخل انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن) قرار داده شد. پس از ۱۰-۷ روز سلول‌ها با خاصیت چسبندگی خود به کف ظرف چسبیدند، محیط کشت موجود در سطح سلول‌ها را دور ریخته و به همان اندازه محیط کشت تازه به آرامی بر روی سطح سلول‌ها اضافه گردید. در مراحل بعدی هر ۳-۴ روز یک بار با محلول شستشو (phosphate buffered saline, PBS) شستشو صورت گرفت و سپس تعویض محیط کشت انجام شد. پس از ۱۴ روز از شروع کشت اولیه، با رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰-۸۰ درصد، پاساژ سلولی انجام گرفت. برای انجام پاساژ سلولی، پس از دور ریختن محیط کشت روی سلول‌ها و شستشوی آن‌ها با محلول شستشو، تریپسین روی

مارکرهای CD ۱۱ b یا CD ۱۴، CD۴۵، CD ۳۴ و CD۷۹a یا CD۱۹ می‌داند. قدرت تمایز یافتن به استخوان، چربی و غضروف نیز از ویژگی‌های دیگر این سلول‌ها بیان می‌شود (۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هتروژنی قابل توجهی را نشان می‌دهند. بنابر این همسانی مشخص و قابل قبول، فنوتیپ قطعی و یا مارکرهای سطحی خاصی برای جداسازی آن‌ها وجود ندارد. شناسایی این سلول‌ها در آزمایشگاه با کمک ترکیبی از مارکرها و قدرت تمایز و ویژگی‌های عملکردی آن‌ها انجام می‌گیرد (۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای ظرفیت چند توان می‌باشند. این سلول‌ها سریعاً به کف ظرف چسبیده و دارای ویژگی‌های منحصر به فرد هستند. آن‌ها قادرند به دودمان‌های مزودرمی و غیرمزودرمی شامل سلول‌های استخوان، چربی، غضروف، ماهیچه، قلب، فیروبللاست، میوفیروبللاست، سلول‌های اپی‌تلیال و عصبی تمایز یابند. تمایز این سلول‌ها به سایر رده‌های سلولی، نشان دهنده پتانسیل تمایزی بالای آن‌ها می‌باشد (۳، ۱۶، ۱۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمی که به عنوان سلول‌های زمینه‌ای مغز استخوان و یا سلول‌های پیش‌ساز مزانشیم هم شناخته می‌شوند در ترمیم بافت‌هایی با منشاء مزودرمی مثل استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی شرکت می‌کنند (۱). در این تحقیق با توجه به اهمیت کاربرد بالینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به مطالعه قدرت تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به سلول‌های رده استخوانی شده است.

### مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از مغز استخوان، جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان توسط متخصص مغز استخوان از استخوان لگن افراد دهنده سالم و ترجیحاً جوان (سن ۳۰-۱۷ سال)، در

دست آوردن نتایج، تجزیه و تحلیل و رسم نمودارهای مورد نظر انجام گرفت.

#### تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوسیت

برای تمایز دادن سلول‌ها به رده سلول‌های استخوانی، ابتدا محیط کشت تمایزی مخصوص، جهت تمایز استخوان که شامل محیط کشت High glucose - DMEM حاوی ۱۰٪ FBS، ۸-۱۰ مول بر لیتر دگزامتازون (Sigma;USA)، ۱۰ میلی مول بر لیتر  $\beta$  - گلیسرول فسفات (Sigma;USA)، ۳/۷ گرم بر لیتر بی-کربنات سدیم و ۰/۰۵ گرم بر لیتر اسید آسکوربیک (Sigma;USA) می باشد، تهیه شد. سپس سلول‌های یک فلاسک T25 با تراکم ۸۰-۷۰ درصد در مرحله پاساژ چهارم ترپسینه گردید. سلول‌ها با دور ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. محلول رویی جهت به دست آوردن یک میلی لیتر سولوشن سلولی خارج شد. سلول‌ها در محیط کشت تمایزی مخصوص استخوان در پلیت شش خانه کشت داده شدند و در داخل انکوباتور قرار داده شدند. هر ۳-۴ روز یک بار حدود یک میلی‌لیتر از محیط کشت تمایزی را خارج و محیط تمایزی تازه اضافه شد. به عنوان گروه کنترل، سلول‌های یک فلاسک نیز با محیط کشت فاقد مواد تمایزی کشت داده شدند. ویژگی‌های مورفولوژیک و بافتی سلول‌ها مرتباً با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند و پس از طی مدت زمان ۲۱ روز و کامل شدن پروسه تمایزی، سلول‌ها با آلزارین رد (Sigma;USA) رنگ آمیزی و از آن‌ها عکس تهیه شد.

#### رنگ آمیزی سلول‌های استخوانی

پس از کامل شدن پروسه تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی، جهت تشخیص بهتر آن‌ها، سلول‌ها با آلزارین رد رنگ آمیزی شدند. برای رنگ آمیزی سلول‌ها، ابتدا محیط کشت روی سلول‌ها

سطح سلول‌ها ریخته شد. بعد از طی مدت کوتاهی (۵-۲ دقیقه) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با گرد و کنده شدن سلول‌ها از کف ظرف، سلول‌ها جمع آوری و به دو یا چند (بسته به تراکم سلول‌ها) فلاسک جدید حاوی محیط کشت تازه منتقل شدند. سپس روز بیست و دوم، پاساژ دوم و روز بیست و چهارم از شروع کشت، پاساژ سوم و روز بیست و هفتم پاساژ چهارم انجام گرفت. ضمناً سلول‌های شمارش شده در یک فلاسک T25 که تحت پاساژ قرار گرفتند نشان داد که تعداد آن‌ها حدود  $2 \times 10^5$  سلول در میلی‌لیتر بود.

#### اثبات هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

برای اثبات این که سلول‌های به دست آمده از نوع بنیادی مزانشیمی هستند از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد. از سلول‌های دو فلاسک T25 در مرحله پاساژ سوم با تراکم بیش از ۸۰ درصد جهت انجام فلوسایتومتری استفاده گردید. پس از ترپسینه کردن سلول‌ها، آن‌ها را با دور ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و سلول‌ها با یک میلی لیتر بافر شستشو، شستشو داده شدند. سپس با دور ۲۱۰۰، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۴ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر FBS به رسوب سلولی اضافه گردید و در دمای ۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. مجدداً مرحله شستشو و سانتریفوژ را تکرار نموده و پس از پیتینگ، به رسوب سلولی آنتی‌بادی‌های CD۴۵، CD۸۰ و ۹۰ CD آغشته به ایزوتیوسیانات فلورسنت اضافه شدند و پس از پیتینگ، به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شدند. محلول موجود را با یک میلی لیتر بافر، شستشو داده و سپس سانتریفوژ گردیدند. محلول رویی را دور ریخته و با پارا فرمالدئید ۴ درصد فیکس شد. نهایتاً پس از قرار دادن در دستگاه فلوسایتومتر و به

شستشو داده و یک میلی‌لیتر اتانول بر روی سلول‌ها سلول‌ها و بررسی میکروسکوپی، در ابتدا تعداد بسیار زیادی سلول از انواع مختلف شامل انواع گلبول‌های سفید، گلبول قرمز و غیره دیده می‌شود که در طی مراحل خالص سازی به تدریج حذف می‌شوند.

#### نتایج مربوط به کشت اولیه سلول‌ها

پس از کشت اولیه سلول‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به طور روزانه با کمک میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار می‌گیرند. بر اساس این مشاهدات، از بین هزاران سلول موجود، در روزهای دوم و سوم سلول‌های بسیار کمی در کشت اولیه فیروبلاستی و دوکی شکل شده و به کف ظرف می‌چسبند. کلنی‌های بزرگ سلولی با گذشت زمان رشد نموده (شکل ۱) و ۸ روز پس از آغاز کشت، کلنی‌ها در محیط پخش شده و به صورت تک لایه‌ای از سلول‌های دوکی شکل، کف ظرف را می‌پوشانند (شکل ۲).

را برداشته و سپس با محلول شستشو (PBS) سلول‌ها را ریخته تا فیکس شدن سلول‌ها انجام پذیرد. در مرحله بعد اتانول را برداشته و سلول‌ها در معرض آلیزارین رد به مدت ۱۰-۲ دقیقه قرار می‌گیرند. در مرحله نهایی سلول‌ها را با آب مقطر شستشو داده و پس از خشک شدن، مورد بررسی میکروسکوپی و عکس برداری قرار گرفت.

#### نتایج

نتایج جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای پس از ریختن خون رقیق شده با محیط کشت DMEM بر روی فایکول و سانتریفوژ کردن، چهار لایه مجزا در لوله آزمایش قابل مشاهده می‌باشد که از پایین به بالا شامل: گلبول‌های قرمز خون، فایکول، لایه سلول‌های تک هسته‌ای که مابین فایکول و پلاسما قرار گرفته است و پلاسما می‌باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در لایه سلول‌های تک هسته‌ای قرار دارد که به صورت هاله بسیار باریکی می‌باشد. پس از جمع‌آوری و کشت



شکل ۱- کلنی‌های تشکیل شده در مراحل اولیه کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان

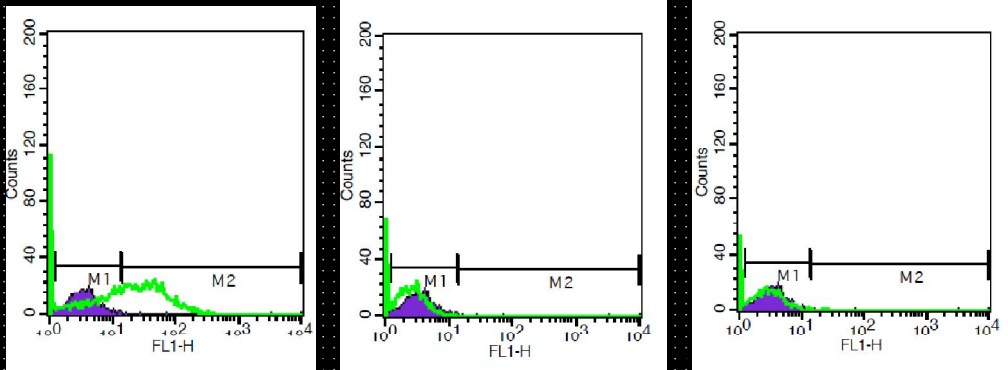


انجام گرفت. ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال نیز که مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کف ظرف می‌چسبند، با انجام پاساژهای متوالی حذف می‌شوند. در مرحله پاساژ سلولی، ملاحظه شد که زمان مناسب انجام پاساژ و انتقال تعداد کافی از سلول‌ها به ظروف کشت جدید از اهمیت به سزایی برخوردار است که توجه به این نکات در داشتن سلول‌هایی کاملاً ایده آل کمک کننده است.

#### نتایج مربوط به فلوسایتومتری

بیان مارکرهای خاص از اختصاصات ویژه هر رده سلولی محسوب می‌شود. از این ویژگی در جهت تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان استفاده می‌شود. نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که این سلول‌ها نسبت به مارکرهای CD ۴۵ و CD ۸۰ منفی می‌باشد، در حالی که نسبت به مارکر CD ۹۰ مثبت می‌باشند. نتایج به دست آمده ویژگی منحصر به فرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به اثبات می‌رساند (نمودار ۱).

هر روز با مشاهده میکروسکوپی انجام شده، ملاحظه شد که به طور فزاینده‌ای بر تعداد سلول‌های چسبنده افزوده می‌شود. این سلول‌ها در طی دوره رشد، ریخت‌شناسی فیروبلاستی خود را حفظ نمودند. پس از طی شدن مرحله کشت اولیه و رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰-۷۰ درصد، جهت جلوگیری از مرگ سلول‌ها و به دست آوردن دودمان خالص از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان، پاساژهای متوالی مورد نیاز است. اولین پاساژ، در روز چهاردهم پس از کشت اولیه سلول‌ها، انجام گرفت. سلول‌ها پس از این که توسط تریپسین تیمار شدند از نظر ریخت‌شناسی تغییر نمودند. شکل سلول‌ها در این مرحله از حالت فیروبلاستی و دوکی شکل به صورت کاملاً گرد در آمدند که در محیط کشت معلق بودند. پس از طی یک روز مجدداً سلول‌ها به فرم کشیده در آمده و به کف ظرف چسبیدند. از این مرحله به بعد سلول‌ها با رشد شگفت‌آوری افزایش یافته و هشت روز بعد، سلول‌ها برای انجام پاساژ دوم آماده شدند. پاساژ سوم، دو روز بعد و پاساژ چهارم، سه روز پس از پاساژ سوم



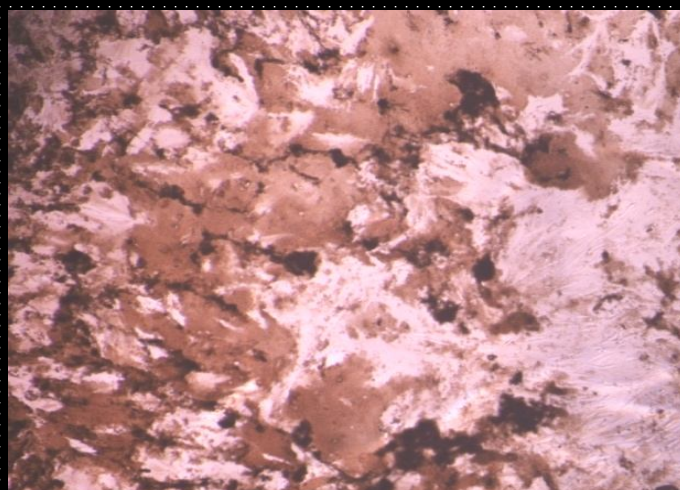
ملاحظه شد. در این زمان تمایز سلول‌ها به استخوان خاتمه یافته و سلول‌ها جهت اثبات حضور ترشحات ماتریکس معدنی با روش رنگ آمیزی آلیزارین‌رد ارزیابی شدند.

#### نتایج رنگ آمیزی سلول‌های تمایز یافته به استخوان

نتایج رنگ‌آمیزی سلول‌های تمایز یافته به استخوان با آلیزارین‌رد نشان داد که توده‌های سلولی قرمز رنگ شدند اما در کشت کنترل که محیط کشت فاقد مواد تمایزی بود هیچ‌گونه توده قرمز رنگی ایجاد نشد (شکل ۳).

#### نتایج تمایز سلول‌ها به استخوان

سلول‌های پاساژ چهارم را پس از در معرض قرار دادن با محیط کشت تمایزی استخوان، به طور روزانه با میکروسکوپ معکوس بررسی نمودیم. اولین نشانه‌های تغییرات ریخت‌شناسی و تمایز به استخوان یک هفته پس از القای تمایز مشاهده شد. مشاهدات میکروسکوپی، توده‌های سلولی را نشان دادند که در مناطقی از محیط کشت به وجود آمده بودند که در روزهای بعد بزرگ‌تر شدند. در پایان دوره تمایز (روز ۲۱) تعداد فراوانی از این توده‌ها در ظروف کشت



## بحث و نتیجه گیری

اولین بار در سال ۱۹۹۹ در گزارش پیتنجر مشخص شد که برخی از کلنی‌ها در محیط کشت قادر به تمایز به هر سه رده سلولی (استخوان، غضروف و چربی) می‌باشند و برخی از کلنی‌های سلولی فاقد قدرت تمایز یافتن به حداقل یکی از رده‌های سلولی بودند. اما این مسأله مشهود بود که همه جمعیت‌های سلولی قادر به تمایز یافتن به رده سلول‌های استخوانی هستند (۱۷). پس از آن تحقیقات در این زمینه ادامه یافت و کاریستینو و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سینه‌ویوم انسانی قادر به تمایز یافتن به سلول‌های رده استخوان و غضروف می‌باشند در حالی که فقط ۳۰٪ از کلنی‌های سلولی توان تمایز یافتن به رده چربی را دارند (۱۰). هم چنین گزارشاتی نیز از قدرت تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های غیر مزودرمی مثل نورون‌ها داده شدند (۲۲).

قدرت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده استخوان به خاطر اهمیت این سلول‌ها در جهت سلول درمانی بیماری‌های استخوانی، از توجه خاصی برخوردار است. در مطالعه‌ای که توسط موراگلیا بر روی موش صورت گرفت، نشان داده شد که نقص‌های بزرگ استخوانی در شرایط *In vivo* توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ ترمیم می‌شود (۱۵). تحقیقات مشابهی در حیوانات بزرگ‌تر (۱۱) و انسان (۱۹) نیز انجام گرفت. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ به سلول‌های رده استخوانی می‌تواند در سلول درمانی بیماری‌های مرتبط با استخوان مفید باشد. یکی از اهمیت‌های این سلول‌های اتولوگ که آن‌ها را به عنوان کاندیدهای مناسب در سلول درمانی معرفی می‌کند، عدم تحریک سیستم ایمنی بدن توسط آن‌ها و در نتیجه عدم سرکوب این سلول‌ها توسط سلول‌های ایمنی بدن ضمن درمان می‌باشد (۲۱).

در چندین تحقیق قدرت تمایز و تکثیر این سلول‌ها در شرایط *In vitro* مورد بررسی قرار گرفته است. تحقیقات نشان می‌دهد که حداکثر قدرت تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بین پاساژهای ۲ و ۶ می‌باشد و در پاساژهای بالاتر توان تمایزی به شدت کاهش می‌یابد (۱۳، ۶، ۴). در تحقیق حاضر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مرحله پاساژ چهارم جهت تمایز دادن آن‌ها به رده سلول‌های استخوانی استفاده گردید. نتایج این مطالعه در راستای تحقیقات قبلی نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط *In vitro* به صورت کلنی‌هایی از سلول‌های دوکی شکل رشد می‌کنند و از نظر اندازه در طول کشت افزایش می‌یابند. پس از افزودن محیط تمایزی استخوان، پس از ۲ تا ۳ هفته ساختارهایی شکل می‌گیرند که این تغییرات مورفولوژی در ارتباط با بیان پروتئین‌های خاص استخوان می‌باشد (۲۰، ۱۲). این تغییرات پس از ۲۱ روز به طور کامل مشهود بودند.

نتایج ما نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان قادر است در شرایط *In vitro* پس از ۲۱ روز فنوتیپ رده استخوان را نشان دهند. از سلول‌های استخوانی تمایز یافته با منشأ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان فرد اتولوگ می‌توان در زمینه سلول درمانی نارسایی‌های استخوانی استفاده کرد که لزوم انجام مطالعات بیشتر به صورت پیش کلینیکی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

## تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم تا از عزیزانی که در مرکز تحقیقات پیوند اعضا بیمارستان نمازی شیراز ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند، صمیمانه سپاس‌گزاری نماییم.

1. Baksh, D., Song, L., Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 8(3); 301-316.
2. Bianco, P., Robey, P. G., Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts and assays. *Cell Stem Cell*, 2; 313-319.
3. Billon, N. (2007). The generation of adipocytes by the neural crest. *Development*, 134; 2283-2292.
4. Campagnoli, C., Roberts, I. A., Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, I., Fisk, N. M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and marrow. *Blood*, 98; 2396-2402.
5. Chen, F. H., Rousche, K. T., Tuan, R. S. (2006). Technology insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2: 373-382.
6. Dennis, J. E., Charbord, P. (2002). Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells*, 20; 205-214.
7. Dexter, T. M. (1982). Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol*, 1(suppl): 87-94.
8. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8: 315-317.
9. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4: 267-274.
10. Karystinou, A. (2009). Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium. *Rheumatology*, 48; 1057-1064.
11. Kon, E. (2000). Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*, 49; 328-337.
12. Makino, S. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 103; 697-705.
13. Martin, D. R., Cox, N. R., Hathcock, T. L., Niemeyer, G. P., Baker, H. J. (2002). Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol*, 30; 879-886.
14. Mimeault, M., Batra, S. K. (2008). Recent progress on normal and malignant pancreatic stem/progenitor cell research: Therapeutic implications for the treatment of type 1 or 2 diabetes mellitus and aggressive pancreatic cancer. *Gut*, 57: 1456-1468.
15. Muraglia, A., Cancedda, R., Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 113; 1161-1166.
16. O'Rahilly, R., Muller, F. (2007). The development of the neural crest in the human. *J Anat*, 211: 335-351.
17. Pittenger, M. F. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284; 143-147.
18. Prockop, D. J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276: 71-74.
19. Quarto, R. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*, 344, 385-386.
20. Saito, T., Dennis, J. E., Lennon, D. P. (1995). Myogenic expression of mesenchymal stem cells within myotubes of mdx mice in vitro and in vivo. *Tissue Eng*, 1; 327-343.
21. Van den Berk, L. (2009). Toll-like receptor triggering in cord blood mesenchymal stem cells. *J. Cell. Mol. Med.*, Epub ahead of print.
22. Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 61; 364-370.

