

An Investigation of the Simultaneous Effects of Bone Morphogenic Protein (BMP)-4 and Static Magnetic Field on Viability and Proliferation Rates of Rat Bone Marrow Stem Cells

Fatemeh Javani Jouni¹, Parviz Abdolmaleki^{2*}, Mansoure Movahedin³

1- Ph.D., Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Associated Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: Parviz@modares.ac.ir*

Received: 09/Apr/2013, Accepted: 08/Sep/2013

Abstract

Objectives: This study investigated the possible synergistic effect of simultaneous treatment of bone morphogenic protein (BMP)-4 as a chemical stimulator and static magnetic field (SMF) as a physical stimulator on viability percent and proliferation rate in rat bone marrow stem cells.

Methods: Passage 5 cells were trypsinized, and a cell suspension prepared after which the cells were counted and cultured in 25 cm² flasks. Cells were incubated for one day and washed with phosphate-buffered saline. We added BMP-4 at the optimum concentration of 25 ng/ml at different times (24, 48 and 96 h) into the medium. The cells were exposed at an optimum intensity of 4 mT of the SMF at different exposure times (24, 48, and 96 h). Subsequently cells were washed with phosphate-buffered saline, trypsinized, and separate cell suspensions were prepared from each flask. We investigated the viability and proliferation rates of treated cells by staining them with Trypan blue and performed cell counts with an optical microscope. The mean numbers of whole cells and living cells were considered to be the proliferation and survival rates, respectively.

Results: Increased SMF exposure and BMP-4 increased the viability percent and change in proliferation rate in the treated groups compared with their corresponding controls. The maximum increased viability was observed in the group that was treated with BMP-4 for 96 h.

Conclusion: Our results have supported the hypothesis that SMF alters the viability and proliferation rate of treated BMSCs, which was enhanced when the cells were treated simultaneously with SMF and BMP-4.

Keywords: Static magnetic field, Viability percent, Proliferation rate, Bone marrow stem cell

بررسی آثار همزمان BMP-4 و میدان مغناطیسی ایستا بر میزان بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی

فاطمه جوانی جونی^۱، پرویز عبدالمالکی^{۲*}، منصوره موحدین^۳

۱- دکتری تخصصی، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک

Email: Parviz@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۰۶/۱۷

دریافت مقاله: ۹۲/۰۱/۲۰

چکیده

هدف: در این تحقیق آثار همزمان BMP-4 به عنوان محرک شیمیایی و میدان مغناطیسی ایستا به عنوان محرک فیزیکی بر درصد سلول‌های زنده و میزان تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های مزانشیمی در واکشت پنجم تریپسینه شده و سوسپانسیون سلولی تهیه شد. سپس سلول‌ها شمارش و پس از ۲۴ ساعت کشت در محیط α -MEM با بافر نمکی فسفات شسته شدند. متعاقب افزودن BMP-4 با غلظت ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر در زمان‌های متفاوت (۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت) به محیط کشت، این سلول‌ها با میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۴ میلی‌تسلا و زمان‌های تابشی متفاوت (۲۴ و ۴۸ ساعت) تیمار شدند؛ سپس سلول‌ها با بافر نمکی فسفات شسته و تریپسینه شدند. سلول‌های تریپسینه شده با تریپان بلو رنگ‌آمیزی و به کمک میکروسکوپ نوری شمارش شدند. میانگین تعداد و افزایش سلول‌ها تحت عنوان نسبت سلول‌های زنده و تکثیر سنجش و گزارش شد.

نتایج: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که افزایش مدت زمان میدان مغناطیسی ایستا و BMP-4 باعث افزایش میانگین درصد سلول‌های زنده و تغییر میزان تکثیر سلول‌ها نسبت به گروه کنترل می‌شود. تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از شمارش سلولی با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون توکی برای ارزیابی سلول‌های زنده و تکثیر سلولی در گروه‌های مختلف انجام گرفت. بیشترین افزایش در میانگین درصد سلول‌های زنده در گروهی مشاهده شد که به مدت ۹۶ ساعت با BMP-4 تیمار شده بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق فرضیه تغییر نسبت سلول‌های زنده و تکثیر توسط میدان مغناطیسی ایستا را تأیید می‌کند. هنگامی که سلول‌ها به‌طور همزمان با میدان مغناطیسی ایستا و BMP-4 تیمار می‌شدند، این تغییرات افزایش می‌یافت.

کلیدواژگان: میدان مغناطیسی ایستا، درصد سلول‌های زنده، نرخ تکثیر، سلول بنیادی مغز استخوان

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، صفحات: ۹۵-۱۰۸

مقدمه

در جوامع پیشرفته امروزی انسان‌ها و گیاهان در معرض میدان‌های مغناطیسی (Magnetic Field) هستند، که معمولاً

پزشکان و بیماران قرار داده است [۲۰]. از جمله سلول‌های پشتیبان موجود در انواع بافت‌ها می‌توان به سلول بنیادی بزرگسالی اشاره کرد. سلول‌های بنیادی به این دلیل سلول نامتمايز نامیده می‌شوند که هنوز متعهد به ایجاد یک اندام یا بافت خاص نشده‌اند. این روند تغییر کردن سلول به انواع سلول‌های تخصصی، روند تمايز نامیده می‌شود [۲۰]. از میان سلول‌های بنیادی بزرگسالی، سلول‌های بنیادی مغز استخوان بیش از همه مطالعه شده‌اند، زیرا دسترسی آسان به این سلول‌ها و توانایی بالای آن‌ها در تمايز به انواع مختلفی از سلول‌های بالغ از جمله مزایای این سلول‌ها محسوب می‌شود [۲۱]. استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی به منظور تولید سلول‌های زیبا در محیط کشت همچنان با مشکلاتی نظیر احتمال تومورزایی بالای این سلول‌ها، مسایل اخلاقی و کمبود منابع دسترسی به این سلول‌ها مواجه است [۲۲]. در مطالعات مربوط به تمايز سلول‌های بنیادی اغلب از مکمل‌های شیمیایی خاصی برای محیط کشت استفاده شده است که با توجه به مطالعات انجام شده در شرایط طبیعی (In vivo) تنها می‌توانند در مرحله مشخصی از مراحل تمايزی سلول‌های زیبا نقش داشته باشند [۲۳]. به علاوه؛ استفاده از این القاگرهای تمايزی شیمیایی آثار جانبی مخربی بر میزان تکثیر و درصد بقای سلول‌ها دارد. اخیراً مطالعاتی برای استفاده از محرک‌های فیزیکی با کارکرد مکمل آغاز شده است [۲۴]. این تلاش‌ها مستلزم شناسایی دقیق پاسخ سلول‌های بنیادی به محرک‌های شیمیایی و فیزیکی است. بنابراین انجام مطالعاتی برای تشخیص شرایط صحیح کشت، شامل مکمل‌های تغذیه‌ای، عوامل فیزیکی نظیر میدان مغناطیسی یا ایجاد راهی برای تقویت تشکیل گامت از سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به تکامل مؤثرتر سلول‌های زیبا ضروری است. فراهم آوردن مسیری ساده‌تر برای دستیابی به سلول‌های زیبا از طریق منبع سلولی قابل دسترس و مطمئن، شانس تمايز سلولی را بالا برده و احتمال ایجاد تومور از سلول‌های پرتوان را به حداقل می‌رساند.

آگاهی از روش‌های تمايز سلول‌های جنسی در بدن به

توسط خطوط انتقال برق فشار قوی و بسیاری از دستگاه‌های الکتریکی ایجاد می‌شود. یکی از مسائل امروز این است که آیا میدان مغناطیسی می‌تواند بر سیستم‌های زیستی اثر داشته باشد [۱، ۲]. مطالعه تأثیر میدان‌های الکتریکی، الکترومغناطیسی و میدان‌های مغناطیسی ایستا بر سلول‌ها، بافت‌های گیاهان و به ویژه بر انسان در محیط‌های شغلی و آزمایشگاهی اخیراً به طور قابل ملاحظه‌ای مورد توجه قرار گرفته است [۲]. به طور کلی منابع میدان مغناطیسی را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد:

۱- میدان‌های مغناطیسی طبیعی شامل دو میدان یکی به عنوان میدان مغناطیسی طبیعی زمین که زمین را به صورت یک آهن ربای دایمی در می‌آورد و دیگری میدان مغناطیسی کیهانی که از فعالیت‌های خورشیدی به وجود می‌آید. ۲- میدان‌های مغناطیسی مصنوعی؛ این میدان‌ها ساخته دست بشر بوده و در همه محیط‌ها و در گستره وسیعی از فرکانس‌ها و با شدت‌های میدان مختلف وجود دارد. با پیشرفت علم و تکنولوژی هر روز بر تعداد و تنوع این میدان‌ها افزوده می‌شود. وسایل خانگی، صنعتی و دستگاه‌های پزشکی از اصلی‌ترین منابع این نوع میدان‌ها است [۳].

با وجود تحقیقات و مطالعات انجام شده، ساز و کار دقیق تأثیرات میدان مغناطیسی روی موجودات زنده هنوز به روشنی مشخص نشده و مطالعات بیشتر در این خصوص ضروری به نظر می‌رسد. تأثیر میدان مغناطیسی بر بقای سلول [۴]، تمايز [۵]، تکثیر [۶]، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) [۷-۱۰]، بیان ژن [۹]، ناهنجاری‌های فنوتیپی در جنین موش [۱۱]، بر هم زدن غلظت یون‌های سدیم [۱۲] و کلسیم [۱۳]، [۱۴] در دو طرف غشا، تحریک سنتز پروتئین [۱۵] و فعالیت آنزیمی [۱۶، ۱۷] بررسی شده است. در برخی گزارش‌ها از میدان مغناطیسی برای درمان و تسکین درد نیز استفاده شده است [۱۸، ۱۹].

استفاده از سلول‌های پشتیبان موجود در بافت‌های مختلف بدن، برای درمان انواع بیماری‌ها امروزه به صورت وسیع ارزیابی شده و افق‌های روشنی را در پیش روی محققین،

محققان برای ایجاد دستورالعمل‌های تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های جنسی در محیط کشت آزمایشگاهی کمک می‌کند که این دستورالعمل‌ها می‌تواند در درمان ناباروری مردان مفید باشد. درصد بقای سلولی، میزان تکثیر و تمایز به سلول‌های زایای بدوی به BMP-4 (Bone Morphogenic Protein) بستگی دارد که عضوی از خانواده (Transforming Growth Factor beta) است و توسط بافت خارج جنینی ترشح می‌شود. در مطالعات انجام شده روی سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش و سلول‌های بنیادی جنینی، BMP-4 به‌عنوان کلید کنترل خود نوزایی و پرتوانی سلول‌های بنیادی و سلول‌های PGC (Primordial Germ Cell) معرفی شده است. دوز بهینه BMP-4 در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی و با ارزیابی ژن *Piwil2* ۵ نانوگرم در میلی‌لیتر [۲۵-۲۸] و در سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر [۲۹] معرفی شده است.

استفاده از میدان مغناطیسی و الکترومغناطیسی با شدت‌هایی در محدوده چند میلی‌تسلا روی بیان برخی ژن‌ها و پروتئین‌ها تأثیر داشته است [۳۰]. کوئتی (Coletti) و همکارانش نشان دادند که تابش میدان مغناطیسی ۸۰ میلی‌تسلا باعث تقویت تمایز و رشد حجمی سلول‌های عضلانی می‌شود [۳۱]. در این سلول‌ها تجمع اکتین و میوزین و تشکیل میوتیوب‌های چند هسته‌ای (Multinucleated Myotube) بزرگ افزایش می‌یابد. یوگه (Yuge) و همکارانش تأثیر میدان مغناطیسی بر تمایز سلول‌های استئوبلاست انسانی (Human Osteoblast Cells) را بررسی کردند [۵]. آن‌ها دریافتند که میدان مغناطیسی باعث تسریع تمایز در این سلول‌ها می‌شود. پاینه (Payne) و همکارانش کارایی سلول-درمانی با سلول‌های بنیادی و پیوند آن‌ها را توسط میدان مغناطیسی افزایش دادند [۳۲]. چن (Chen) و همکارانش برای ترمیم اعصاب محیطی از کاشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان استفاده کردند و به نتایج مطلوبی رسیدند [۳۳].

با مشاهده روند انجام تحقیقات در زمینه تولید سلول‌های

زایا از سلول‌های بنیادی می‌توان این نکته را استنباط کرد که مطالعاتی که در ابتدا در این زمینه انجام شده تا سال ۲۰۰۷ همگی به دنبال دسترسی به یک منبع سلولی مناسب برای تمایز به سلول‌های زایا بوده‌است. حال آن‌که مطالعات بعدی به منظور بالا بردن کارایی و به‌دست آوردن تعداد بیشتر سلول تمایز یافته انجام شده است [۳۴]. تلاش‌های اخیر نیز با توجه به تغییر شرایط محیط کشت و ایجاد شرایط بهینه برای کشت سلول‌ها تأکید دارد [۳۴]. به‌طور خلاصه درمان بیماران نابارور مستلزم دستیابی به منبع سلولی بیشتر، آسان‌تر، غیر تهاجمی با تعداد سلول‌های زایای کارآمد بیشتر است.

در این تحقیق آثار همزمان BMP-4 با غلظت ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر و زمان‌های متفاوت (۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت) به‌عنوان محرک شیمیایی و میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۴ میلی‌تسلا و زمان‌های تابشی متفاوت (۲۴ و ۴۸ ساعت) به‌عنوان محرک فیزیکی بر درصد سلول‌های زنده و میزان تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی در محیط کشت آزمایشگاهی بررسی شد. لازم به توضیح است که میدان مغناطیسی زمین بر هر دو گروه تأثیر دارد، بنابراین شرایط گروه‌ها از این بابت یکسان است.

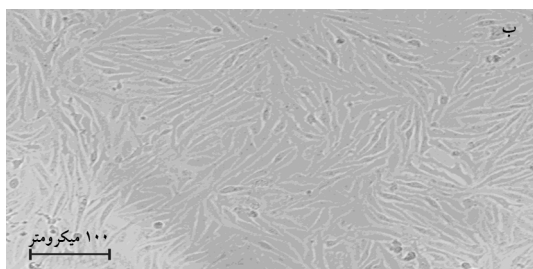
مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان

به‌منظور رعایت اصول اخلاقی، کار با حیوانات طبق اصول هلسینکی سال ۱۹۷۵ [۳۵] انجام گرفت و به‌منظور جداسازی سلول‌های استرومایی مغز استخوان از رت‌های نر ۶-۸ هفته‌ای استفاده شد. سلول‌های مغز استخوان به وسیله آسپیراسیون استخوان فمور (Femur) و تیبیای (Tibia) موش به همراه محیط کشت α -MEM (α -Minimal Essential Medium) و سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco، آمریکا) ۱۵ درصد با سرنگ شماره ۲۲ جدا شدند [۳۶].

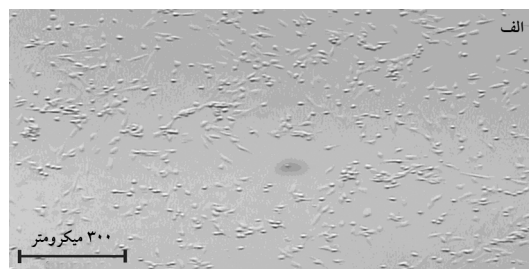
اثرات همزمان BMP-4 و میدان مغناطیسی ایستا

در واكشت پنجم به تراكم مناسب (۸۰-۹۰ درصد) رسیدند (شكل ۱). به منظور تأیید هویت مزانشیمی سلول‌های كشت داده شده، از روش فلوسایتومتری برای تعیین درصد سلول‌های مزانشیمی با ردیابی CD29، CD90 (Chemicon، آمریکا) به عنوان نشانگر سلول‌های مزانشیمی و CD45، CD11b (Chemicon، آمریکا) به عنوان نشانگر سلول‌های هموتوپوئیتیک (Hematopoietic Cells) استفاده شد. سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری مدل Bectin Dekenson بررسی شدند. تجزیه و تحلیل اطلاعات نیز با نرم افزار Win MDI 2.8 انجام شد. تمایز سلول‌های مزانشیمی به رده سلول‌های استخوانی و چربی برای تأیید ماهیت مزانشیمی سلول‌های كشت داده شده انجام شد [۲۹].



كشت سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان

سلول‌های مزانشیمی جدا شده در محیط كشت α -MEM (Sigma، آلمان) شامل ۲۰ درصد سرم FBS غیر فعال شده با حرارت، ۲/۲ گرم/لیتر بیکربنات سدیم (Sigma، آلمان)، پنی‌سیلین (Penicillin) ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و استرپتومایسین (Streptomycin) ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (Gibco، آلمان) كشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد و نیز دی اکسید کربن ۵ درصد قرار گرفته تا سلول‌های غیر چسبیده از بقیه سلول‌ها جدا و حذف شوند. بعد از این مدت محیط كشت سلول‌ها با محیط كشت تازه جایگزین شد بعد از ۳ هفته سلول‌ها



شكل ۱ كشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش صحرایی، بعد از گذشت ۴ ساعت (الف) و بعد از گذشت ۵ پاساژ (ب)

۱- گروه‌های كنترل كه میدان و BMP-4 دریافت نکردند و درصد سلول‌های زنده و نرخ تكثیر سلول‌ها در آن‌ها بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت محاسبه شد (گروه‌های ۱-۳ جدول ۱).

۲- گروه‌هایی كه فقط BMP-4 دریافت کردند و درصد سلول‌های زنده و نرخ تكثیر سلول‌ها در آن‌ها بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت از دریافت ماده مؤثره محاسبه شد (گروه‌های ۴-۶ جدول ۱).

۳- گروه‌هایی كه میدان مغناطیسی ایستا به مدت ۲۴ ساعت و BMP-4 به مدت ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت دریافت کردند و درصد سلول‌های زنده و نرخ تكثیر سلول‌ها در آن‌ها بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت محاسبه شد. در این گروه‌ها تیمار

سلول‌های واكشت پنجم بعد از تریپسینه شدن برای چسبیدن سلول‌ها به كف پلیت در ظروف كشت ۴۸ خانه‌ای به مدت ۱ روز كشت داده شدند. در هر خانه از این ظروف 3×10^4 سلول همراه با α -MEM و سرم FBS ۲۰ درصد وجود داشت. متعاقب چسبیدن سلول‌ها ماده BMP-4 با غلظت ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر به هر خانه اضافه شد. زمان‌های تیمار سلول‌ها با ماده مؤثره ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت بود. در تعدادی از گروه‌ها همزمان با افزودن BMP-4 در زمان‌های تعریف شده این سلول‌ها با میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۴ میلی‌تسلا و زمان‌های تابشی متفاوت (۲۴ و ۴۸ ساعت) تیمار شدند. بنابراین گروه‌های آزمایش به صورت زیر تعریف شدند (جدول ۱):

میدان مغناطیسی در ۲۴ ساعت آغازین از زمان دریافت ماده مؤثره انجام شد (گروه‌های ۷-۹ جدول ۱).
 ۴- گروه‌هایی که میدان مغناطیسی ایستا به مدت ۴۸ ساعت و BMP-4 به مدت ۴۸ و ۹۶ ساعت دریافت کردند و درصد سلول‌های زنده و نرخ تکثیر سلول‌ها در آن‌ها بعد از گذشت ۴۸ و ۹۶ ساعت محاسبه شد. در این گروه‌ها تیمار میدان مغناطیسی در ۴۸ ساعت آغازین از زمان دریافت ماده مؤثره انجام شد (گروه‌های ۱۰-۱۲ جدول ۱).

جدول ۱ چگونگی طراحی گروه‌های آزمایش

گروه	مدت زمان دریافت BMP-4 (ساعت)	زمان میدان دهی با شدت ۴ میلی‌تسلا (ساعت)	شمارش سلول‌های زنده بعد از گذشت ساعت‌های مختلف
۱	۰	۰	۲۴
۲	۰	۰	۴۸
۳	۰	۰	۹۶
۴	۲۴	۰	۲۴
۵	۴۸	۰	۴۸
۶	۹۶	۰	۹۶
۷	۲۴	۲۴	۲۴
۸	۴۸	۲۴	۴۸
۹	۹۶	۲۴	۹۶
۱۰	۲۴	۴۸	۴۸
۱۱	۴۸	۴۸	۴۸
۱۲	۹۶	۴۸	۹۶

سیستم خنک کننده گازی بوده که از افزایش دمای آن جلوگیری می‌کند.

بررسی میزان تکثیر و درصد سلول‌های زنده

برای تعیین تعداد کل سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در شرایط استریل برداشته شد و هم حجم آن تریپان بلو اضافه شد. پس از گذشت چند دقیقه توسط لام نئوبار (Neobar Lam) شمارش سلولی انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از شمارش سلولی با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way Analysis of Variance: ANOVA) و به دنبال آن آزمون توکی (Tukey) برای ارزیابی درصد سلول‌های زنده و تکثیر

سپس سلول‌ها با بافر نمکی فسفات (Phosphate Buffered Saline: PBS) شسته و تریپسینه شدند. سلول‌های تریپسینه شده با تریپان بلو (Trypan Blue) رنگ‌آمیزی و شمارش شدند. میانگین تعداد و افزایش سلول‌ها تحت عنوان درصد سلول‌های زنده و تکثیر سنجش و گزارش شد.

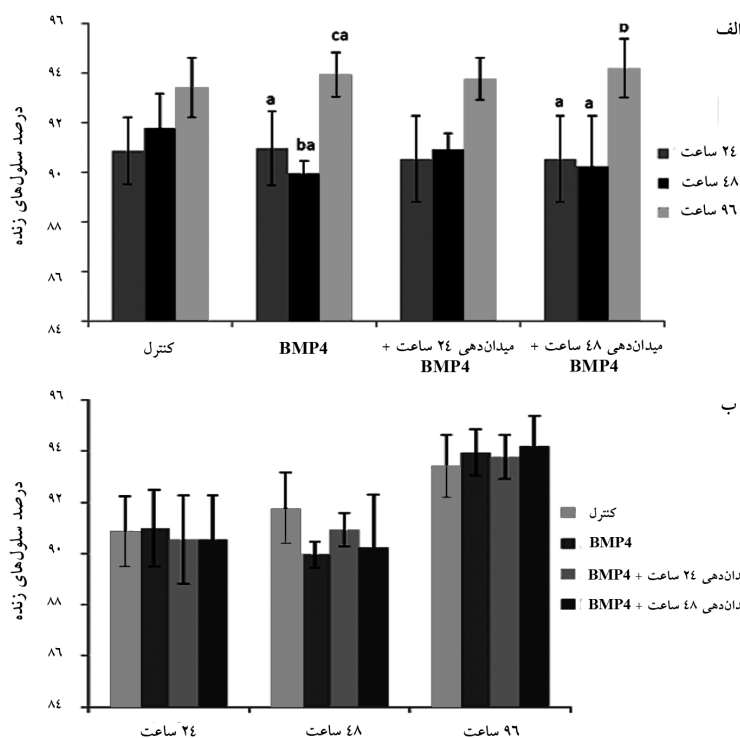
دستگاه مولد میدان مغناطیسی ایستا

دستگاه مولد میدان مغناطیسی استفاده شده در این تحقیق، همان دستگاه مورد استفاده در مطالعه قبلی محققان حاضر بود [۳۶]. این دستگاه به شکل سیم لوله و دارای انکوباتور دی اکسید کربن‌دار درون خود و مجهز به حسگرهای دمایی (مدل pt100 با حساسیت ۰/۱ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت (مدل HiH-3610 با حساسیت ۰/۱ درصد) و دی اکسید کربن (مدل NAP21A) است. همچنین دستگاه دارای یک

اثرات همزمان BMP-4 و میدان مغناطیسی ایستا

تکرارها ۱۵ مرتبه خواهد بود. تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SPSS (نسخه ۱۹) انجام گرفت. تفاوت معنی دار مابین گروه ها با حدود اطمینان ۹۵ درصد ($P \leq 0.05$) گزارش شد.

سلولی در گروه های مختلف انجام گرفت. میانگین $\pm$ انحراف معیار ($Mean \pm SD$) به دست آمده از ۳ موش مختلف است که تعداد تکرار برای هر موش ۵ مرتبه است و بر این اساس تعداد



شکل ۲ (الف و ب) میانگین درصد سلول های زنده در حضور BMP-4 با غلظت ۲۵ نانوگرم/ میلی لیتر در زمان های متفاوت (۲۴، ۴۸، ۹۶ ساعت) و میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۴ میلی تسلا و زمان های میدان دهی ۲۴ و ۴۸ ساعت؛ داده ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل است. خطوط عمودی نشان دهنده انحراف معیار است. گروه ها دو به دو مقایسه شده است، حروف یکسان نماینده عدم معنی دار بودن و حروف غیر یکسان نماینده معنی دار بودن تفاوت در سطح $P < 0.05$ است.

ارزیابی درصد سلول های زنده

افزایش مدت زمان میدان مغناطیسی ایستا و BMP-4 باعث افزایش میانگین درصد سلول های زنده نسبت به گروه کنترل شد. شکل ۲ نشان دهنده آثار همزمان BMP-4 با غلظت ۲۵ نانوگرم در میلی لیتر در زمان های متفاوت (۲۴، ۴۸، ۹۶ ساعت) و میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۴ میلی تسلا و زمان های میدان دهی متفاوت (۲۴ و ۴۸ ساعت) بر درصد سلول های زنده است. با افزایش مدت زمان تیمار سلول ها با BMP-4 در گروه هایی که ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض میدان مغناطیسی ایستا قرار گرفته اند، درصد سلول های زنده افزایش

نتایج

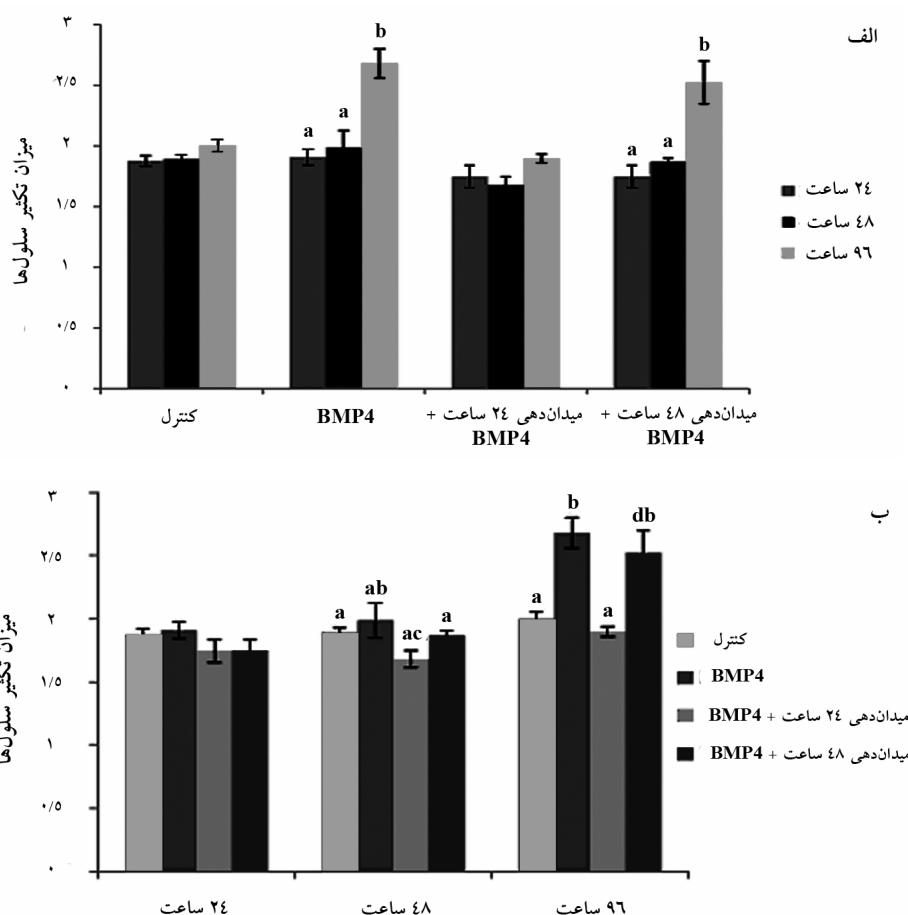
تأیید ماهیت مزانشیمی سلول ها

نتایج حاصل از تمایز سلول های مزانشیمی به رده سلول های استخوانی و چربی تأیید کننده ماهیت مزانشیمی این سلول ها بود. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلول ها حاوی تعداد معنی دار سلول های هموتوپوئیتیک نیستند و حدود ۹۰ درصد سلول ها از نظر نشانگرهای مزانشیمی (CD90 و CD29 مثبت و از نظر نشانگرهای هموپوئیتیک (CD45 و CD11b منفی بودند [۳۶].

یافت. این افزایش در گروهی که ۹۶ ساعت با BMP-4 تیمار شده بودند بیشتر بوده و دارای تفاوت معنی‌دار با سایر گروه‌ها است. این افزایش نسبت به گروه کنترل در گروه‌هایی که ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض میدان مغناطیسی ایستا قرار گرفته‌اند نیز معنی‌دار بود.

ارزیابی میزان تکثیر سلول‌ها

افزایش مدت زمان میدان‌دهی و تیمار BMP-4 باعث افزایش میزان تکثیر سلول‌ها نسبت به گروه کنترل شد. شکل ۳



شکل ۳ (الف و ب) میانگین تکثیر سلول‌ها در حضور BMP-4 با غلظت ۲۵ نانوگرم/میلی‌لیتر در زمان‌های متفاوت (۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت) و میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۴ میلی‌تسلا و زمان‌های میدان‌دهی ۲۴ و ۴۸ ساعت؛ داده‌ها حاصل میانگین حداقل سه تکرار مستقل است. خطوط عمودی نشان دهنده انحراف معیار است. گروه‌ها دو به دو مقایسه شده‌است، حروف یکسان نماینده عدم معنی‌دار بودن و حروف غیر یکسان نماینده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح $P < 0.05$ است.

بحث

ایده استفاده از سلول‌های بنیادی برای استفاده در اختلالات مربوط به سیستم باروری و به دنبال آن مشکلات ناباروری ایجاد شده، از آن‌جا به ذهن رسید که این سلول‌ها برای اولین بار برای ایجاد گامت‌های مربوط به نر و ماده استفاده شدند. سلول درمانی در درمان ناباروری با علل مردانه در مطالعات بالینی هنوز نتوانسته مشکل بیماران درگیر با این موضوع را برطرف کند. از دلایل عدم استفاده از روش سلول درمانی در درمان اختلالات ناباروری با وجود گذشت یک دهه، می‌توان انتخاب منبع سلول‌های بنیادی استفاده شده برای این هدف را نام برد. تاکنون از سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی سوماتیکی (Somatic Stem Cells) نظیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان برای این منظور استفاده شده است ولی به دلیل احتمال تومورزا بودن این سلول‌ها حتی پس از تمایز همچنان استفاده از این سلول‌ها در موارد بالینی مورد شک و تردید است. از طرفی دستورالعمل‌های مورد استفاده برای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های زایا نیز به دلیل مقطعی بودن و بررسی تنها یک مرحله تمایزی نتوانسته به سوالات متنوع موجود در این مسیر شامل عدم دستیابی به سلول‌های زایای کارآمد جواب دهد. بنابراین چنانچه منبع سلولی مورد استفاده نامحدود باشد و همچنین سلول نیز با روش‌های مطابق با استانداردهای سلول درمانی تولید شده باشد، می‌تواند در کاربرد بالینی آن برای انتخاب منبع سلولی مورد نیاز در آینده مفید باشد.

با گذشت تقریباً ۴ هفته از کشت سلول‌های استرومایی، جمعیت تقریباً همگن از سلول‌های مزانشیمی به‌دست آمد که با توجه به بیان بالای نشانگرهای مزانشیمی و کاهش نشانگرهای هموتوپوئیتیکی می‌توان این مورد را تأیید کرد. به‌منظور بررسی قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی مشتق شده از مغز استخوان، در این مطالعه تمایز سلول‌های مغز استخوان به رده سلول‌های چربی‌ساز و استخوان‌ساز در محیط تمایزی مناسب بررسی شد. نتایج به‌دست آمده بعد از کشت طولانی مدت ۲۱ روزه سلول‌های بنیادی غیر خونساز مغز استخوان

اثرات همزمان BMP-4 و میدان مغناطیسی ایستا

نشان داد که این سلول‌ها قادر به تمایز به رده‌های دیگر هستند. هنگ (Heng) و همکارانش [۳۷] در یک مقاله مروری به انواعی از روش‌ها و راه‌کارها برای ایجاد تمایز هدفمند اشاره کرده‌اند. میدان مغناطیسی در مقایسه با مواد شیمیایی القاگر تمایز آثار جانبی کمی دارد؛ ضمن این‌که می‌توان از آن به‌طور مستمر استفاده نمود [۳۸، ۳۹]. بنابراین میدان مغناطیسی به‌عنوان یک محرک فیزیکی برای القای تمایز مطرح است. در این مطالعه آثار همزمان BMP-4 با غلظت ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر و زمان‌های متفاوت (۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت) به‌عنوان محرک شیمیایی و میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۴ میلی‌تسلا و زمان‌های تابشی متفاوت (۲۴ و ۴۸ ساعت) به‌عنوان محرک فیزیکی بر درصد سلول‌های زنده و میزان تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی در محیط کشت آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج نشان دهنده این است که افزایش مدت زمان میدان مغناطیسی ایستا و BMP-4 باعث افزایش میانگین درصد سلول‌های زنده و میزان تکثیر سلول‌ها نسبت به گروه کنترل شده است. با افزایش مدت زمان تیمار سلول‌ها با BMP-4 در گروه‌هایی که ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض میدان مغناطیسی ایستا قرار گرفته‌اند، درصد سلول‌های زنده افزایش یافت. این افزایش در گروهی که ۹۶ ساعت با BMP-4 تیمار شده بودند بیشتر بوده و دارای تفاوت معنی‌دار با سایر گروه‌ها است. این افزایش نسبت به گروه کنترل در گروه‌هایی که ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض میدان مغناطیسی ایستا قرار گرفته‌اند نیز معنی‌دار بود. افزایش معنی‌داری در میزان تکثیر سلول‌ها در گروه‌هایی که با BMP-4 تیمار شده بودند نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در این گروه‌ها تأثیر همزمان BMP-4 و میدان مغناطیسی باعث کاهش میزان تکثیر سلول‌ها نسبت به گروهی شده بود که فقط BMP-4 دریافت نموده بودند. در مطالعات انجام شده روی سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش و سلول‌های بنیادی جنینی، BMP-4 به عنوان کلید کنترل خود نوزایی و پرتوانی سلول‌های بنیادی و سلول‌های PGC (Primordial Germ Cells) معرفی شده

است. دوز بهینه BMP-4 در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی و با ارزیابی ژن *Piwi2* ۵ نانوگرم در میلی‌لیتر [۲۵-۲۸] و در سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر [۲۹] معرفی شده است. همچنین گروه تحقیقاتی حاضر در مطالعه دیگری که روی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان رت انجام شده بود، درصد حیات و نرخ تکثیر سلول‌ها در معرض شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی ایستا را بررسی و زمان‌های متفاوت میدان‌دهی را اندازه‌گیری نمودند [۴۰]. نتایج نشان دهنده این بود که افزایش شدت و مدت در معرض بودن میدان، باعث کاهش معنی‌دار درصد حیات و نرخ تکثیر سلول‌ها نسبت به گروه کنترل می‌شود و شدت بهینه با توجه به این تحقیق ۴ میلی‌تسلا انتخاب شد [۴۰]. بنابراین آثار همزمان BMP-4 با غلظت ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر و زمان‌های متفاوت (۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت) به‌عنوان محرک شیمیایی و میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۴ میلی‌تسلا و زمان‌های تابشی متفاوت (۲۴ و ۴۸ ساعت) به‌عنوان محرک فیزیکی بر درصد سلول‌های زنده و میزان تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی در محیط کشت آزمایشگاهی بررسی شد. پژوهش‌ها و گزارش‌های محققان پیشین نشان می‌دهد که میدان مغناطیسی ممکن است با تأثیر بر جریان‌های یون کلسیم از غشای سلول‌های میدان دیده و شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد درون سلول‌های میدان دیده، روی درصد حیات، نرخ تکثیر و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول تأثیر بگذارد. بعضی از گزارش‌ها نشان می‌دهد که میدان مغناطیسی احتمالاً با ایجاد تغییر در عمل پمپ یون کلسیم - ATPase یا کانال‌های اختصاص یون کلسیم یا پروتئین‌های پیوند شونده به یون کلسیم، باعث کاهش معنی‌دار این یون می‌شوند و این امر منجر به تغییر فرآیند تکثیر سلول‌ها می‌شود. بعضی از گزارش‌ها نیز بیان کرده‌اند که میدان مغناطیسی ممکن است هموستازی (Homeostasis) اتم آهن را درون بعضی از سلول‌ها تحت تأثیر قرار داده و موجب افزایش آهن آزاد در سیتوپلاسم و هسته سلول شود. افزایش آهن نیز می‌تواند از طریق واکنش فنتون (Fenton Reaction)

باعث افزایش رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل شود. حضور رادیکال‌های هیدروکسیل درون سلول موجب آسیب رسانی به مولکول‌های DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها می‌شود. آسیب لیپیدهای غشای سلولی ممکن است باعث افزایش خروج یون کلسیم از ذخایر درون سلولی شود و از این طریق موجب کاهش یون کلسیم در سلول‌های تیمار شده با میدان شود [۴۰، ۴۱]. از طرفی BMP-4 با استفاده از دو فرضیه می‌تواند بر میزان حفظ بقا و تکثیر سلولی اثر داشته باشد. اولاً پروتئین BMP-4 ممکن است پروتئین‌های Smad را در سلول‌های بنیادی جنینی فسفوریله کند و در نتیجه سبب القای فعالیت Smad های ۱، ۵ و ۸ و بیان ژن‌های هدف BMP-4 شود [۴۲]؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد که گروه‌های مختلف ژن‌های درگیر در فرآیند تکثیر و حفظ بقا در حضور BMP-4 القا شوند. ثانیاً تحریکات BMP-4 ممکن است از طریق مسیرهای غیر Smad سبب افزایش بیان ژن‌های درگیر در فرآیند تجدید خود به خودی نظیر p38 شود. بیان این ژن وابسته به فعال شدن پروتئین کینازهای موجود در مسیر Mitogen-Activated Protein (MAPK/ERK) است Kinase/Extracellular Signal-Regulated kinase است که در فرآیند میتوز شرکت دارد [۴۳].

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که افزایش مدت زمان میدان مغناطیسی ایستا و BMP-4 باعث افزایش میانگین درصد سلول‌های زنده و میزان تکثیر سلول‌ها نسبت به گروه کنترل می‌شود؛ هرچند یافتن مکانیسم دقیق این تغییرات به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج رساله دکتری است و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران نهاد ریاست جمهوری، در قالب طرح پژوهشی شماره ۹۲۰۰۷۷۳ تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از خانم دکتر زهره مظاهری و آقای شهرام پور بیرانوند کارشناس

منابع

- [1] Aladjadjiyan A. Study of the influence of magnetic field on some biological characteristics of *Zea mais*. J Central Euro Agric 2002; 3 (2): 89 - 94.
- [2] Belyavskaya NA. Biological effects due to weak magnetic field on plants. Adv Space Res 2004; 34(7): 1566-74.
- [3] WHO. Environmental health criteria 69: magnetic fields, Geneva. 1987; Available at: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc69.htm>
- [4] Tofani S, Barone D, Cintorino M, de Santi MM, Ferrara A, Orlassino R, Ossola P, Peroglio F, Rolfo K, Ronchetto F. Static and ELF magnetic fields induce tumor growth inhibition and apoptosis. Bioelectromagnetics 2001; 22(6): 419-28.
- [5] McLean M, Engström S, Holcomb R. Static magnetic fields for the treatment of pain. Epilepsy & Behavior 2001; 2(3): S74-S80.
- [6] Potenza L, Ubaldi L, De Sanctis R, De Bellis R, Cucchiari L, Dachà M. Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in *Escherichia coli*. Mutat Res 2004; 561(1-2): 53-62.
- [7] Pirozzoli MC, Marino C, Lovisolo GA, Laconi C, Mosiello L, Negroni A. Effects of 50 Hz electromagnetic field exposure on apoptosis and differentiation in a neuroblastoma cell line. Bioelectromagnetics 2003; 24(7): 510-6.
- [8] Tavasoli Z, Abdolmaleki P, Mowla SJ, Ghanati F, Sarvestani AS. Investigation of the effects of static magnetic field on apoptosis in bone marrow stem cells of rat. Environmentalist 2009; 29(2): 220-4.
- [9] Teodori L, Grabarek J, Smolewski P, Ghibelli L, Bergamaschi A, De Nicola M, Darzynkiewicz Z. Exposure of cells to static magnetic field accelerates loss of integrity of plasma membrane during apoptosis. Cytometry 2002; 49(3): 113-8.
- [10] Tofani S, Barone D, Berardelli M, Berno E, Cintorino M, Foglia L, Ossola P, Ronchetto F, Toso E, Eandi M. Static and ELF magnetic fields enhance the in vivo anti-tumor efficacy of cis-platin against lewis lung carcinoma, but not of cyclophosphamide against B16 melanotic melanoma. Pharmacol Res 2003; 48(1): 83-90.
- [11] Saito K, Suzuki H, Suzuki K. Teratogenic effects of static magnetic field on mouse fetuses. Reproductive Toxicology 2006; 22(1): 118-24.
- [12] Leszczynski D. Rapporteur report: cellular, animal and epidemiological studies of the effects of static magnetic fields relevant to human health. Prog Biophys Mol Biol 2005; 87(2-3): 247-53.
- [13] Aldinucci C, Palmi M, Sgaragli G, Benocci A, Meini A, Pessina F, Pessina GP. The effect of pulsed electromagnetic fields on the physiologic behaviour of a human astrocytoma cell line. Biochim Biophys Acta 2000; 1499(1-2): 101-108.

- [14] Liburdy RP, Callahan DE, Harland J, Dunham E, Sloma TR, Yaswen P. Experimental evidence for 60 Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade. Effects on calcium influx and c-MYC mRNA induction. *FEBS Lett* 1993; 334(3): 301-8.
- [15] Pipkin JL, Hinson WG, Young JF, Rowland KL, Shaddock JG, Tolleson WH, Duffy PH, Casciano DA. Induction of stress proteins by electromagnetic fields in cultured HL-60 cells. *Bioelectromagnetics* 1999; 20(6): 347-57.
- [16] Javani Jouni F, Abdolmaleki P, Ghanati F. Oxidative stress in broad bean (*Vicia faba* L.) induced by static magnetic field under natural radioactivity. *Mutation Research* 2012; 741(1): 116-21.
- [17] Sahebamei H, Abdolmaleki P, Ghanati F. Effects of magnetic field on the antioxidant enzyme activities of suspension-cultured tobacco cells. *Bioelectromagnetics* 2007; 28(1): 42-7.
- [18] Holcomb RR, Worthington WB, McCullough BA, McLean MJ. Static magnetic field therapy for pain in the abdomen and genitals. *Pediatr Neurol* 2000; 23(3): 261-4.
- [19] Laurence JA, French PW, Lindner RA, Mckenzie DR. Biological effects of electromagnetic fields--mechanisms for the effects of pulsed microwave radiation on protein conformation. *J Theor Biol* 2000; 206(2): 291-8.
- [20] Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988; 10: 63-76.
- [21] 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.
- [22] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- [23] Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N, Nolte J, Wulf G, Dressel R, Gromoll J, Engel W. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest* 2006; 86(7): 654-63.
- [24] Yuge L, Okubo A, Miyashita T, Kumagai T, Nikawa T, Takeda S, Kanno M, Urabe Y, Sugiyama M, Kataoka K. Physical stress by magnetic force accelerates differentiation of human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311(1): 32-8.
- [25] Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. Effects of different doses of bone morphogenetic protein 4 on viability and proliferation rates of mouse embryonic stem cells. *Yakhteh Med J* 2009; 11(1): 29-34.
- [26] Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. Assessment of Piwil2 gene expression pattern upon germ cell development from mouse embryonic stem cell. *Iran Red Crescent Med J* 2009; 11(4): 408-13.
- [27] Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. effects of treatment with bone morphogenetic protein 4 and co-culture on expression of Piwil2 gene in mouse differentiated embryonic stem cells. *IJFS* 2009; 3(2): 78-83.
- [28] Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-

- Moghadam M. Bone morphogenetic protein 4 is an efficient inducer for mouse embryonic stem cell differentiation into primordial germ cell. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2011; 47(5-6): 391-8.
- [29] Mazaheri Z, Movahedin M, Rahbarizadeh F, Amanpour S. Different doses of bone morphogenetic protein 4 promote the expression of early germ cell-specific gene in bone marrow mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2011; 47(8): 521-5.
- [30] Dini L, Abbro L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron* 2005; 36(3): 195-217.
- [31] Coletti D, Teodori L, Albertini MC, Rocchi M, Pristerà A, Fini M, Molinaro M, Adamo S. Static magnetic fields enhance skeletal muscle differentiation in vitro by improving myoblast alignment. *Cytometry A* 2007; 71(10): 846-56.
- [32] Payne AG. Using immunomagnetic technology and other means to facilitate stem cell homing. *Med Hypotheses* 2004; 62(5): 718-20.
- [33] Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, Wang CC, Wang WY, Huang YS, Hsu SH. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol* 2007; 204(1): 443-53.
- [34] Marques-Mari AI, Lacham-Kaplan O, Medrano JV, Pellicer A, Simón C. Differentiation of germ cells and gametes from stem cells. *Hum Reprod Update* 2009; 15(3): 379-90.
- [35] Human Experimentation: Code of Ethics of W.M.A. *Br Med J* 1964; 2(5402): 177. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1816102/?page=1>
- [36] Javani Jouni F, Abdolmaleki P, Movahedin M. Investigation on the effect of static magnetic field up to 15 mT on the viability and proliferation rate of rat bone marrow stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2013; 49(3): 212-9.
- [37] Heng BC, Cao T, Haider HK, Wang DZ, Sim EK, Ng SC. An overview and synopsis of techniques for directing stem cell differentiation in vitro. *Cell Tissue Res* 2004; 315(3): 291-303.
- [38] Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2004; 190(1): 17-31.
- [39] Chen Q, Long Y, Yuan X, Zou L, Sun J, Chen S, Perez-Polo JR, Yang K. Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors. *J Neurosci Res* 2005; 80(5): 611-9.
- [40] Javani Jouni F, Abdolmaleki P, Movahedin M. Investigation on the effect of static magnetic field up to 15 mT on the viability and proliferation rate of rat bone marrow stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2013; 49(3): 212-9.
- [41] Ahmadianpour MR, Abdolmaleki P, Mowla SJ, Hosseinkhani S. Static magnetic field of 6 mT induces apoptosis and alters cell cycle in p53 mutant Jurkat cells. *Electromagn Biol Med* 2013; 32(1): 9-19.
- [42] Dudley BM, Runyan C, Takeuchi Y, Schaible K, Molyneaux K. BMP signaling regulates PGC numbers and motility in organ culture. *Mech Dev* 2007; 124(1): 68-77.
- [43] Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A.

BMP induction of Id proteins suppresses
differentiation and sustains embryonic stem

cell self-renewal in collaboration with STAT3.
Cell 2003; 115(3): 281-92.