جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی اسب از مغز استخوان به منظور درمان بیماری‌های خاص

عباس ابویسانی*[1]، مرتضی زاهدی[2]، حسین کاظمی مهرجردی[3]، علی میرشاهی[3]

۱-استادیار بخش فیزیولوژی دانشکده دامپزشکی و عضو گروه سلول‌های بنیادی پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد

۲-دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳-استادیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

abavisania@um.ac.ir

چکیده

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، جمعیتی از سلول‌های بنیادی بالغ هستند که نوید بخش درمان‌های ترمیمی بر پایه سلول درمانی در پزشکی و دامپزشکی می‌باشند. دانش کسب شده در سال‌های اخیر در خصوص بیولوژی سلول‌های بنیادی و طب ترمیمی منجر به ره‌یافت جدیدی در بهبود بافت‌ها و اندام‌های آسیب‌دیده شده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی شبیه فیبروبلاست بوده و تکثیر بالایی دارند و قابلیت تمایز به بافت‌های مختلف از جمله استخوان، غضروف و چربی را دارا هستند. هدف این مطالعه، جداسازی و نگهداری سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان اسب، با هدف سلول‌درمانی می‌باشد. برای این منظور، از سه رأس اسب، با تجویز آرام بخش، نمونه مغز استخوان گرفته شد و در آزمایشگاه تحت شرایط استریل با محیط کشت رقیق و با استفاده از محلول جداکننده عمل سانتریفیوژ انجام گردید. سپس لایه سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از محیط کشت مناسب، کشت داده شدند و تا حدود روز ۲۱، در این شرایط نگهداری شدند. سپس برای ازدیاد جمعیت سلولی و تخلیص بیشتر، سلول‌ها تا پاساژ ۳ پاساژ داده شدند. خصوصیات ظاهری و رفتاری این سلول‌ها در محیط کشت موید این بود که این سلول‌ها در حقیقت همان سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند. در نهایت سلول‌ها در محیط مناسب منجمد شده و در داخل تانک ازت ذخیره شدند تا در آینده امکان ذوب و استفاده از آن‌ها میسر باشد. امید است در آینده از این سلول‌ها برای درمان بیماری‌های خاص، از جمله اختلالات اسکلتی-عضلانی اسب، بهره‌برداری شود.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اسب، مغز استخوان، درمان

مقدمه

سلول‌های بنیادی در موجودات پرسلولی یافت می‌شوند و قادرند از طریق میتوز و تمایز به انواع سلول‌های اختصاصی تقسیم شوند. در پستانداران، دو نوع سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغین وجود دارد. در موجودات بالغ، سلول‌های بنیادی و سلول‌های پیش‌ساز به عنوان سیستم ترمیم کننده بدن عمل می‌کنند (۷ و ۶). سلول‌های بنیادی می‌توانند تحت شرایط مصنوعی رشد و به سلول‌های اختصاصی با خصوصیات بافت‌های مختلف مانند عضله، عصب و ... از طریق کشت سلولی تمایز یابند. سلول‌های بنیادی بالغ در بسیاری از بافت‌های تخصص یافته بدن از جمله مغز، مغز استخوان، خون بند ناف و مغز استخوان یافت می‌شوند (۸ و ۴). سلول‌های بنیادی بالغ به انواع سلول‌های بنیادی خون‌ساز، سلول‌های بنیادی پستانی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های بنیادی اندوتلیال و سلول‌های بنیادی نورونی و ... تقسیم‌بندی می‌شوند (۴ و ۲).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی؛ فیبروبلاست‌مانند هستند، تکثیر بالایی دارند، قادرند به کف ظرف بچسبند و قابل تمایز به بافت‌های مختلف ازجمله استخوانی، غضروف و چربی هستند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از لحاظ ریخت‌شناسی به‌وسیله بدنه سلولی کوچک با فرآیند سلولی کم، که دراز و باریک هستند شناخته می‌شوند. بدنه سلول، حاوی هسته‌ای بزرگ و گرد با هستک برجسته است که کاملاً به وسیله ذرات نامرئی کروماتین احاطه شده است، و به هسته ظاهری شفاف می‌دهد (۶ و ۴).

امروزه دانشمندان معتقدند، انواع مختلف سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان، علاوه بر آن‌که می‌توانند سلول‌های خونی و ایمنی را بسازند، قادرند انواع دیگری از سلول‌ها نظیر سلول‌های ماهیچه اسکلتی، میکروگلیا و آستروگلیا در مغز، هپاتوسیت‌های کبد (۵ و ۳) و حتی تاندون (۹) را بسازند. استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ در تحقیقات و درمان از لحاظ اخلاقی بحث برانگیز نیست (مانند سلول‌های بنیادی جنینی)، زیرا تولید سلول‌های بنیادی بالغ نیاز به تخریب رویان ندارد. به‌علاوه، به‌علت این‌که در برخی حالت‌ها سلول‌های بنیادی می‌توانند از خود دریافت کننده گرفته شوند (اتوگرفت)، بنابراین احتمال رد پیوند در این مواقع منتفی می‌شود. طب ترمیمی با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، برای درمان آسیب‌های حاد و همچنین اختلالات مزمن، به تدریج تبدیل به روش‌های معمول بالینی می‌شود. بنابراین سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت‌های خارج رویانی یا بالغ در مرکز توجه تحقیقات دامپزشکی هستند(۶،۴).

مواد و روش‌ها

از سه اسب با محدوده سنی ۹ تا ۱۰ سال استفاده شد. پس از مهار اسب و مشخص نمودن محل مناسب استخوان جناغ به وسیله دستگاه سونوگرافی برای نمونه‌گیری، مقدار ۰/۵ *mg/Kg* زایلازین به صورت *IV* به عنوان آرام‌بخش تزریق شد. سپس مقدار ۱۰ *ml* لیدوکائین همراه با آدرنالین به عنوان بی‌حسی موضعی به اطراف محل ورود سوزن بیوپسی تزریق گردید. با استفاده از تیغ جراحی برشی در سطح پوست ایجاد و به وسیله سوزن بیوپسی جمشیدی مقدار ۱۰ میلی لیتر از نمونه مغز استخوان جمع آوری شد و با مقدار ۱۰۰۰*U/ml* هپارین مخلوط شد (شکل ۱). نمونه‌ها در کمتر از ۴ ساعت و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه و در شرایط استریل، نمونه‌ها با دو برابر حجم خود با محیط کشت[1] رقیق شده و به آرامی روی محلول جدا کننده شیب غلظتی[2] () ریخته شد (۱ قسمت محلول جداکننده و ۲ قسمت نمونه). سپس نمونه‌ها با ۴۰۰g در ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند (شکل ۲). لایه سلول‌های تک هسته‌ای مابین محلول جداکننده و محیط کشت به آرامی با پیپت پاستور

[1] *DMEM-HG with L-Glutamine and10% FBS, 1% pen/strep and 0.1% Amphotricin B*
[2] *Sigma Histopaque®-1077*

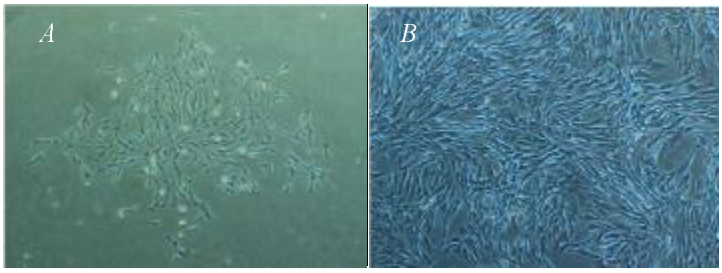
جمع‌آوری شد. جهت شستشو، این لایه دو بار با دو برابر حجم *DPBS-* (بدون کلسیم و منیزیم) رقیق و سانتریفیوژ شد (۶۰۰*g* در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه). سپس پلت سلولی بدست آمده با محیط کشت رقیق شد و با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید و سلول‌ها با تراکم ۸×۱۰۵ سلول در هر سانتی‌مترمربع در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ *CO2* کشت داده شدند (*P0*). پس از ۳ روز از کشت اولیه، محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت تازه جایگزین شد. نگهداری سلول‌ها و تعویض محیط تا ۷۰٪ کانفلوئنسی کف فلاسک انجام شد. سپس سلول‌ها پس از تریپسینه کردن، وارد پاساژ ۱ شدند (*P1*). در این مرحله سلول‌ها با تراکم ۱۰×۱۰۳ در هر سانتی‌مربع کشت داده شدند و هر سه روز محیط کشت تعویض شد تا به کانفلوئنسی ۹۰٪ رسیدند. سپس سلول‌ها تا پاساژ ۳ کشت داده شدند. سلول‌های پاساژ سوم منجمد شده و در تانک ازت ذخیره شدند.

شکل ۱- نحوه نمونه گیری از مغز استخوان

شکل ۲- لایه‌های تفکیک شده در نمونه مغز استخوان پس از سانتریفیوژ.

نتایج و بحث

تعداد سلول بدست آمده از ۱۰ میلی‌لیتر مغزاستخوان هر اسب، حدود بیشتر از $۱/۵\times۱۰^{۸}$ سلول بود که ترکیبی از انواع سلول از جمله سلول‌های پیش ساز خونی، سلول‌های پیش ساز سیستم ایمنی، سلول‌های ایمنی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. سلول‌های مزانشیمی سه روز پس از کشت دادن به کف فلاسک چسبیدند و به صورت سلول‌های پراکنده در زیر میکروسکوپ اینورت دیده می‌شدند که سه تا چهار روز بعد، کلونی‌های سلولی قابل تشخیص بودند (شکل ۳- *A*). از لحاظ ریخت شناسی، سلول‌های جدا شده ظاهر فیبروبلاست مانند داشته و به کف ظرف چسبیده بودند (شکل ۳- *B*).



شکل ۳- *A*: کلونی تشکیل شده حاصل از تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان اسب، پس از یک هفته از کشت نمونه مغز استخوان. *B*: سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ظاهر دراز و کشیده و شبیه به فیبروبلاست در پاساژ ۳.

روش مورد استفاده برای جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان اسب، روش بهینه شده منطبق بر روش فرندشتاین و همکاران (۱۹۶۶) بود. در روش آن‌ها از کشت کامل نمونه مغز استخوان استفاده شده بود ولی در این روش با استفاده از محلول شیب غلظتی جداکننده، گلبول‌های قرمز (*RBC*) جدا شده و وارد محیط کشت نشدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبنده اسب، خصوصیات ریخت شناسی مشابهی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت و انسان و همچنین اسب که قبلاً جدا شده بودند داشتند (۲، ۹ و ۱۰).

تشکر و قدردانی

از همکاری باشگاه سوارکاری رخش و جناب آقای مهندس نشاط مفیدی برای همکاری در اخذ نمونه‌ها تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. *Friedenstein AJ, Piatetzky II, Petrakova KV. 1996. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol. 16:381-390.*
2. *Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. Circ Res. 100(9):1249-1260.*
3. *Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, et al. 2004. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. J Cell Sci. 117:4411-4422.*
4. *Kolf CM, Cho E, Tuan RS. 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther. 9(1):204.*
5. *Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, et al. 2004. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. Hepatology. 40(6):1275-1284.*

6. *Ribitsch I, Burk J, Delling U, Geißler C, Gittel C, Jülke H, et al. 2010. Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine. 123:219-263.*

7. *Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. 1963. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. J Cell Physiol. 62:327-336.*

8. *Tuch BE. Stem cells--a clinical update. 2006. Aust Fam Physician. 35(9):719-721.*

9. *Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. 2009. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. BMC Cell Biology. 10(1):29.*

10. *Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, et al. 2007. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovi-um, periosteum, adipose tissue, and muscle. Cell Tissue Res. 327:449–462.*

Isolation of equine bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of special diseases

Abbas Abavisani, Morteza Zahedi, Hossein Kazemi Mehrjerdi, Ali Mirshahi

Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells which can be used for regenerative medicine in both medicine and veterinary medicine. Recent studies on biology of stem cells and regenerative medicine were resulted in a new approach (cell therapy) for treatment of injured tissues and organs. MSCs are fibroblast-like cells with high prolificacy and differentiate to bone, cartilage and adipose tissues under defined conditions. This study was designed to isolate equine MSCs from bone marrow origin. To do this, bone marrow samples of 3 horses were taken after sedation. Marrow samples were diluted with culture medium and centrifuged using special isolating solution. Then, mononuclear cells were cultured under defined condition until 21 days. Cells were passaged until passage 3 to obtain more purified cells. Finally, the isolated cells were frozen and stored in liquid nitrogen. We hope to use these cells for treatment of equine disease especially muscle-skeletal disorders in the future.

Keywords: *mesenchymal stem cells, horse, bone marrow, treatment*