2nd National
Equine Health and Diseases Congress
School of Veterinary Medicine
Shiraz University
17 - 18 April 2013

دومین کنگره ملی بهداشت و بیماری‌های اسب
دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
۲۸ و ۲۹ فروردین ۱۳۹۲

تأثیر تراکم کشت اولیه سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا شده از مغزاستخوان بر جداسازی سلول‌های بنیادی اسب

مرتضی زاهدی[1*]، عباس ابویسانی[2]، حسام دهقانی[2]، حسین کاظمی مهرجردی[3]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، بخش علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
[2]بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
[3]بخش جراحی و بیهوشی دامپزشکی، بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
Morteza.Zahedi@gmail.com

چکیده

سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های چندتوانی هستند که قادرند به انواع سلول‌های مزودرمی تمایز یابند. بنابراین جهت درمان اختلالات حرکتی کاربرد دارند. منابع مختلفی برای جداسازی این سلول‌ها در بدن وجود دارد، از جمله مغزاستخوان. تعداد سلول‌های بنیادی بدست آمده از مغزاستخوان محدود و برخی اوقات حجم مغزاستخوان بدست آمده نیز اندک است. هدف این مطالعه تعیین بهترین تراکم سلولی در کشت اولیه و تأثیر تراکم‌های مختلف کشت اولیه بروی جداسازی موفق سلول‌های بنیادی از مغزاستخوان است. بدین منظور، از ۲ اسب نمونه مغزاستخوان اخذ شد، سپس در محیط آزمایشگاه، با محیط کشت حاوی سرم رقیق شده و روی محلول شیب غلظتی قرار گرفت. سپس به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و بعد از آن لایه سلول‌های تک‌هسته‌ای که در بالای محلول شیب غلظتی قرار داشتند، جمع آوری شده با PBS شسته و با تراکم‌های مختلف در فلاسک‌های کشت سلول T_{75} کشت داده شدند (1×10^5، 2×10^5، 4×10^5، 8×10^5 و 1×10^6 در هر سانتی متر مربع). سپس بمدت ۲۱ روز بعنوان پاساژ صفر (P0) کشت داده شدند و هر سه روز محیط کشت آن‌ها تعویض شد. در روز ۷ و ۱۴ تعداد کلنی‌هایی که بیش از ۱۵ عدد سلول شمرده شدند و در روز ۲۱ تعداد سلول‌های چسبیده و درصد تقریبی کانفلوئنسی محاسبه گردید. کمترین تعداد کلنی، تعداد سلول‌های چسبیده و درصد تقریبی کانفلوئنسی مربوط به نمونه‌ی با حداقل تراکم (1×10^5) و بیشترین این اعداد مربوط به نمونه‌ی با حداکثر تراکم (1×10^6) بود. می‌توان این نتیجه را گرفت که تراکم بیشترِ کشتِ سلول‌های تک‌هسته‌ای در P0، منجر به بدست آمدن تعداد بیشتری سلول بنیادی مزانشیمی در انتهای این پاساژ می‌شود و تراکم زیاد اولیه سلولی اثر منفی بر چسبیدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کف فلاسک ندارد. با وجود اینکه با حداقل تراکم (1×10^5) هم می‌توان سلول‌های بنیادی را جدا کرد، اما تراکم حداکثر، در مواقعی که مقدار سلولی و حجم نمونه اخذ شده مناسب است توصیه می‌شود و می‌توان از این سلول‌ها برای کاربرد بالینی یا تحقیقاتی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: تراکم سلولی، کشت اولیه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اسب، مغزاستخوان.

مقدمه

مغزاستخوان قرمز (محل ساخت گلوبول‌های قرمز، پلاکت‌ها و بیشتر گلوبول‌های سفید خون)، بافت نرمی است که به طور عمده در استخوان‌های پهن از جمله لگن خاصره، جناغ، جمجمه، دنده‌ها، مهره‌ها و کتف و در بخش اسفنجی انتهای اپی‌فیزی استخوان‌های بلند مانند استخوان ران و بازو یافت می‌شود (۱۱). پارانشیم مغزاستخوان، حاوی انواع سلول‌ها (مانند سلول‌های

مگاکاریوسیت‌ها، پلاسما سل‌ها، مونوسیت‌ها) (۱۲) و سلول‌های بنیادی خون‌ساز است که هر سه رده سلول‌های خونی که در گردش خون یافت می‌شوند را می‌سازند(۸).

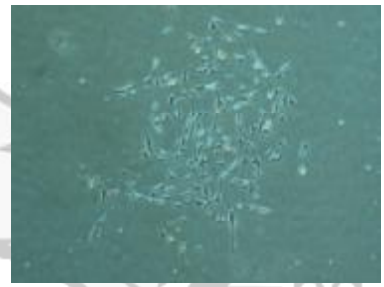
استرومای مغزاستخوان با ایجاد ریزمحیطی در مغزاستخوان، به طور غیر مستقیم در عملکرد خون‌سازی مغزاستخوان شرکت دارد و کار خون‌سازی سلول‌های پارانشیمی را تسهیل می‌کند. سلول‌هایی که استرومای مغزاستخوان را تشکیل می‌دهند شامل فیبروبلاست‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های چربی، استئوبلاست‌ها، استئوکلاست‌ها و سلول‌های اندوتلیال است. استرومای مغزاستخوان شامل سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز هست که به عنوان سلول‌های استرومائی مغزاستخوان هم شناخته می‌شوند (۸). این سلول‌های بنیادی چند توان می‌توانند به انواع مختلفی از سلول‌ها از جمله استئوبلاست، سلول‌های غضروفی، سلول‌های ماهیچه ای، سلول‌های چربی و سلول‌های بتای جزایر پانکراسی و حتی سلول‌های نورنی تمایز یابند. تا کنون از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت درمان بیماری‌های دژنراتیو، از جمله بیماری‌های سیستم عضلانی – اسکلتی مانند آرتروز (۱) و آسیب‌های تاندونی است (۵)، روماتیسم مفاصل (۶)، دیسک مهره‌ها (۶)، بازسازی استخوان (۹)، آسیب‌های نخاعی (۲) و بیماری‌های کبدی (۳) به طور موفقیت آمیزی استفاده شده است.

همانطور که گفته شد؛ مغزاستخوان نه تنها شامل سلول‌های بنیادی شبه فیبروبلاست است، بلکه حاوی مقدار زیادی سلول‌های بنیادی خون‌ساز نیز هست. سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند به راحتی از بخش سلول‌های خون‌ساز به وسیله کشت دادن و چسبیدن به ظروف پلاستیکی کشت جدا شوند. سلول‌های هسته دار استحصال شده از مغزاستخوان از لحاظ ریخت شناسی متنوعند و شامل طیف گسترده و گاهی سلول‌های چند هسته‌ای و سلول‌های تک‌هسته‌ای و دوکی شکل هستند. طی پاساژهای متوالی، درجه ناهمگنی کاهش یافته و سلول‌های شبه فیبروبلاست دوکی شکل کوچک، غالب می‌شوند (۱۰). سلول‌های بنیادی استحصال شده از مغزاستخوان را می‌توان به دفعات زیاد و دوره مدت زیادی پاساژ داد (۴). در مغزاستخوان، محصول سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدست آمده، بین گونه‌های مختلف متفاوت است: فراوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استحصال شده از مغزاستخوان سگ و گربه به ترتیب حدود ۱ سلول بنیادی در $۲/۵\times۱۰^{۴}$ و $۳/۸\times۱۰^{۵}$ عدد سلول تک‌هسته‌ای است، درحالی‌که بازه فراوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان موش، بین ۱ عدد در $۱۰/۸\times۱۰^{۳}$ و ۱ عدد در $۳/۴۵\times۱۰^{۴}$ است. در اسب، فراوانی ۱ عدد در $۴/۲\times۱۰^{۳}$ گزارش شده است (۱۰). در انسان این عدد ۱ سلول به ازا هر $۱۰^{۴}$ تا $۱۰^{۵}$ عدد سلول هسته دار است (۷). با توجه به تعداد پایین سلول‌های بنیادی در بین انواع سلول‌های موجود در مغزاستخوان، تعیین عملی تراکم، در کشت اولیه سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا شده از مغزاستخوان جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ضروری به نظر می‌رسد، زیرا این احتمال وجود دارد تراکم بیش از حد سلول‌های تک هسته در چند روز اول کشت، مانع از چسبیدن و جداسازی صحیح سلول‌های بنیادی مزانشیمی شود. در این مطالعه تراکم‌های مختلف سلولی در کشت اولیه، در شرایط معمول آزمایش (ظروف کشت عادی) انجام شد تا بهترین تراکم برای به دست آوردن بیشترین تعداد سلولی تعیین شود.

مواد و روش‌ها

از ۲ اسب با سن ۹ سال (مادیان)، نمونه مغز استخوان اخذ شد. پس از مقید کردن اسب و یافتن محدوده استخوان جناغ به کمک سونوگرافی، مقدار ۰/۵ mg/Kg زایلازین بصورت داخل وریدی به عنوان آرامبخش استفاده شد. سپس مقدار ۱۰ ml لیدوکائین همراه با آدرنالین به عنوان بی حسی موضعی به اطراف محل ورود سوزن بیوپسی تزریق شد و با استفاده از تیغ

جراحی برشی در سطح پوست ایجاد و به کمک سوزن بیوپسی جمشیدی مقدار ۱۰ ml از نمونه مغزاستخوان جمع آوری شد و با مقدار ۱۰۰۰U/ml هپارین مخلوط شد. 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 محیط کشت (DMEM-HG with L-Glutamine and 10% FBS, 1% pen/strep and 0.1% Amphotricin B)، رقیق شده و به آرامی روی محلول جدا کننده شیب غلظتی (Histopaque®- Sigma 1077) ریخته شد. سپس نمونه‌ها با ۴۰۰g در ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. لایه سلول‌های تک‌هسته‌ای مابین محلول جداکننده و محیط کشت به آرامی با پیپت پاستور جمع آوری، سپس دوبار با $DPBS^-$ شسته شد (۶۰۰g، ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه). پلت به دست آمده، در ۴ میلی لیتر محیط کشت معلق شد و با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید. سپس با تراکم‌های مختلف در فلاسک‌های معمول کشت سلول T_{75} کشت داده شدند (تراکم‌های 1×10^5، 2×10^5، 4×10^5، 8×10^5 و 1×10^6 در هر سانتی متر مربع). این سلول‌ها به مدت ۲۱ روز به عنوان پاساژ صفر (P0) کشت داده شدند و هر سه روز محیط کشت آن‌ها تعویض شد. در روز ۷ و ۱۴ تعداد کلنی‌هایی که بیش از ۱۵ عدد سلول در آن‌ها وجود داشت (شکل ۱) با میکروسکوپ معکوس شمرده شد و در روز ۲۱ درصد تقریبی کانفلوئنسی و تعداد دقیق سلول‌های چسبیده پس از تریپسینه کردن سلول‌ها، با استفاده از لام نئوبار محاسبه گردید.



شکل ۱.
یک کلنی تشکیل شده توسط سلول‌های بنیادی.

نتایج و بحث

همانطور که در جدول زیر مشاهده می‌شود، کمترین تعداد کلنی، تعداد سلول‌های چسبیده و درصد تقریبی کانفلوئنسی مربوط به نمونه‌ی با حداقل تراکم (1×10^5) و بیشترین این اعداد مربوط به نمونه‌ی با حداکثر تراکم (1×10^6) بود. می‌توان این نتیجه را گرفت که تراکم بیشتر در کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای در P0، منجر به بدست آمدن تعداد بیشتری سلول بنیادی مزانشیمی در انتهای این پاساژ می‌شود و همچنین تراکم زیاد اولیه سلولی اثر منفی بر چسبیدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کف فلاسک ندارد. با این وجود با حداقل تراکم (1×10^5) هم می‌توان سلول‌های بنیادی را جدا کرد، و این برای مواقعی که مقدار مغزاستخوان بدست آمده بسیار کم است، کاربرد دارد. به طور خلاصه، تراکم حداکثری کشت در مواقعی که میزان سلول و حجم نمونه اخذ شده مناسب است توصیه می‌شود (هم از نظر پرکردن سریع‌تر کف فلاسک و هم از نظر جنبه‌های اقتصادی در بکاربردن ظروف کشت و...) و می‌توان از این سلول‌ها در کاربردهای بالینی یا تحقیقاتی استفاده نمود.

جدول ۱- تعداد کلنی‌های تشکیل شده، درصد تقریبی کانفلوئنسی و تعداد سلول‌های موجود در هر فلاسک.

تعداد سلول چسبیده روز ۲۱		درصد کانفلوئنسی روز ۲۱ (تقریبی)		تعداد کلنی روز ۱۴ (کمتر از ۱۵ سلول)		تعداد کلنی روز ۱۴ (بیش از ۱۵ سلول)		تعداد کلنی روز ۷ (بیش از ۱۵ سلول)	
اسب ۲	اسب ۱	اسب ۲	اسب ۱	اسب ۲	اسب ۱	اسب ۲	اسب ۱	اسب ۲	اسب ۱
۹×۱۰^{۴}	۷×۱۰^{۴}	۵	۵	۱۲	۵	۴	۴	۲	۱
$۱/۱۹\times۱۰^{۵}$	$۲/۱\times۱۰^{۵}$	۱۰	۱۰	۹	۴	۱۳	۱۲	۳	۳
$۱/۸۹\times۱۰^{۶}$	$۱/۳۳\times۱۰^{۶}$	۱۵	۱۵	۹۵	۵۸	۹۴	۳۳	۵	۴
۴×۱۰^{۵}	۳×۱۰^{۵}	۲۵	۲۰	۴۰	۵۰	۶۶	۴۶	۵	۲
$۱/۵۲\times۱۰^{۶}$	۷×۱۰^{۵}	۴۵	۳۰	۱۵۶	۱۱۴	۱۵۹	۱۰۲	۱۳	۷

تراکم Cells/cm^2

منابع

Arnhold, S.J., Goletz, I., Klein, H., Stumpf, G., Beluche, L.A., Rohde, C., Addicks, K., Litzke, L.F., (2007). Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. American journal of veterinary research 68, 1095-1105.

Jeffery, N.D., Lakatos, A., Franklin, R.J., (2005). Autologous olfactory glial cell transplantation is reliable and safe in naturally occurring canine spinal cord injury. Journal of neurotrauma 22, 1282-1293.

Kallis, Y., Alison, M.R., Forbes, S.J., (2007). Bone marrow stem cells and liver disease. Gut 56, 716-724.

Koerner, J., Nesic, D., Romero, J.D., Brehm, W., Mainil-Varlet, P., Grogan, S.P., (2006). Equine Peripheral Blood-Derived Progenitors in Comparison to Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. Stem cells 24, 1613-1619.

Leppänen, M., Miettinen, S., Mäkinen, S., Wilpola, P., Katiskalahti, T., Heikkilä, P., Tulamo, R., (2009). Management of equine tendon and ligament injuries with expanded autologous adipose-derived mesenchymal stem cells–a clinical study. In, World Conference on Regenerative Medicine. Regen Med Suppl.

Liu, Y., Mu, R., Wang, S., Long, L., Liu, X., Li, R., Sun, J., Guo, J., Zhang, X., Guo, J., (2010). Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. Arthritis research & therapy 12, R210.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. science 284, 143-147.

Raphael Rubin, M.D., Strayer, D.S., Rubin, E., (2011). Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Richards, M., Huibregtse, B.A., Caplan, A.I., Goulet, J.A., Goldstein, S.A., (1999). Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. Journal of Orthopaedic Research 17, 900-908.