# آزمون قابلیت تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استحصال شده از مغز استخوان اسب

**مرتضی زاهدی[1*]، عباس ابویسانی[2]، حسام دهقانی[2]، میلاد شادمان[1]، فائزه علی‌پور[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 موسسه بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[3]دانشجوی دکتری تخصصی جراحی دامپزشکی، بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

Morteza.Zahedi@gmail.com

**چکیده:**

در حال حاضر، جمعیت قابل توجهی از اسبان مسابقه به دلیل ابتلا به بیماری‌های صعب‌العلاج ناشی از ورزش از جمله ضایعات تاندونی، لیگامنتی و مفصلی حذف می‌شوند. روش‌های درمانی متعددی برای بهبود مطلوب این بیماری‌ها توصیه می‌شود که شاید استفاده از سلول‌های بنیادی به ویژه نوع مزانشیمی از مهم‌ترین و جدیدترین موارد باشد. همچنین مدل‌های حیوانی نظیر اسب می‌تواند برای مطالعه خصوصیات و پتانسیل سلول‌های بنیادی و امکان‌سنجی کاربرد آن‌ها در آینده‌ی پزشکی نیز مورد استفاده قرار گیرند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق دو مکانیسم تمایز مستقیم و ترشح فاکتورهای تغذیه‌ای مختلف، در بازسازی بافت هدف شرکت می‌کنند. در حقیقت، سلول درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به تدریج در حال تبدیل شدن به روش معمول درمان بالینی است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی جمعیتی از سلول‌های چندتوان هستند که از بافت‌های بزرگسالان جدا شده و ضمن داشتن توان خودنوزایی، ظرفیت تمایز به دودمان‌های مزودرمی، مانند استخوان، غضروف، چربی و... را دارند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند از بافت‌های مختلف بزرگسالان از جمله مغز استخوان جدا شوند؛ اما هنوز هم مغز استخوان رایج‌ترین منبع مورد استفاده برای استحصال سلول‌های بنیادی است. هدف این مطالعه، جداسازی و بررسی توان تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی جداشده از مغز استخوان اسب بود. به این منظور، از سه رأس اسب دوخون (۳، ۹ و ۱۰ سال) نمونه مغز استخوان با استفاده از سوزن جمشیدی جمع‌آوری شد. در آزمایشگاه، با استفاده از محلول شیب غلظتی، سلول‌های هسته‌دار آن جدا و در محیط پایه کشت داده شدند. پس از سه پاساژ متوالی، سلول‌های پاساژ سوم از نظر ظاهری و بیان نشانگرهای اختصاصی بررسی شدند تا مزانشیمی بودن آن‌ها تأیید شود. سپس سلول‌ها به مدت ۲۱ روز در محیط‌های القائی مناسب (به سمت سلول‌های استخوانی، چربی و غضروف) کشت داده شدند و در پایان مدت زمان القا، با روش رنگ آمیزی اختصاصی، تمایز آن‌ها به هر سه دودمان مورد تایید قرار گرفت. لذا نتایج نشان داد که با توجه به قابلیت تمایزی سلول‌های جدا شده، می‌توان از آن‌ها در درمان اختلالات اسکلتی-عضلانی اسب بهره برد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز آزمایشگاهی، اسب، مغز استخوان.

## مقدمه

سلول‌های بنیادی، سلول‌های غیرتخصصی در بدن هستند که قادرند به سلول‌های تخصصی، با عملکردهای جدید تمایز یابند. بهترین مثال، سلول‌های بنیادی مغز استخوان هستند که می‌توانند به سلول‌های خونی تمایز یابند و عملکردهای اختصاصی

جدیدی خواهند داشت. یک سلول بنیادی تا زمانیکه پیامی برای تبدیل به یک سلول تخصصی دریافت نکند، غیر متعهد باقی می‌ماند. سلول‌های بنیادی خصوصیات قابل توجهی برای تبدیل به انواع مختلف سلولی در بدن دارند. این سلول‌ها بعنوان سیستم تعمیری، بوسیله توانایی برای تقسیم بدون محدودیت جهت جایگزینی سلول‌های دیگر استفاده می‌شوند.(۴)

بیماری‌های سیستم عضلانی اسکلتی مانند آرتروز و آسیب‌های تاندونی دلایل اصلی بازنشستگی زودهنگام و یوتنایز اسب‌های مسابقه، بارکش و... است (۱). آرتروز خودبخودی اغلب در اسب‌های ورزشی و مسن رخ می‌دهد(۶). درمان کنونی برای آرتروز تنها قادر به کاهش درد و تورم می‌شود، نه توقف پیشرفت بیماری (۵). آرتروز، رماتیسم مفاصل و دیسک مهره‌ها می‌توانند از درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی بهره ببرند (۷).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی باید سه ویژگی داشته باشند (۲، ۳): اول: قادر به چسبیدن به کف ظروف کشت باشند؛ دوم: نشانگرهای سطحی اختصاصی را بیان کنند؛ و سوم: قادر به تمایز به حداقل سه رده سلولی مزانشیمی (استخوانی، چربی و غضروفی) را داشته باشند.

هدف از این مطالعه، بررسی قابلیت تمایز سلول‌های جدا و کشت داده شده از مغز استخوان در جهت تایید جداسازی صحیح و بنیادی بودن آن‌ها انجام شد.

## مواد و روش‌ها

**اخذ نمونه و جداسازی سلول‌ها:** از ۳ اسب با سنین ۹، ۹ و ۱۰ سال (هر سه 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 حداقل 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 کنترل (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®-1077 Sigma) 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 محیط کشت معلق و با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید. سپس با تراکم اولیه $8\times10^5$ سلول در هر سانتی متر مربع فلاسک کشت سلول $T_{75}$ کشت داده شد. و تا پاساژ سوم هر ۳ روز محیط کشت کنترل تعویض شد.

**تمایز سلول به دودمانهای مزانشیمی:** در پاساژ سوم پس از تریپسینه کردن و برداشت سلول‌ها، به منظور تمایز به غضروف، تعداد ۵۰۰ هزار سلول به فالکون‌های ml ۱۵ منتقل و با سانتریفوژ سلول‌ها به ته لوله رسوب داده شده و پلت سلولی تشکیل شد. ۲ml محیط تمایز به غضروف ( Control Medium + 0.1µM Dexamethasone, 50µM 2-Phospho-L-ascorcbic acid trisodium, 1% ITS, 1mg BSA, 10ng TGF-ß3, 10ng BMP-) بر روی پلت سلولی ریخته و به مدت ۲۱ روز سلول‌ها تحت تیمار تمایز غضروفی قرار گرفتند. (تعویض محیط تمایزی هر ۴ روز). برای تمایز سلول‌ها به استخوان و چربی، تعداد ۳۰۰ هزار سلول در هر خانه‌ی یک ظرف ۶ خانه‌ای به همراه ml ۳ محیط کشت تازه انتقال و کشت داده شد. در دو خانه

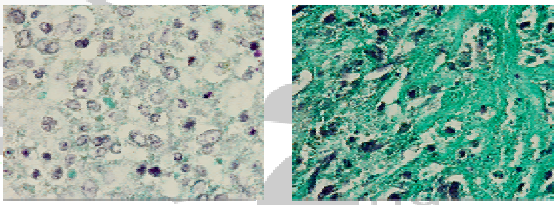
محیط کنترل، در دو خانه محیط تمایز به استخوان (Control Medium + 0.1µM Dexamethasone, 50µM 2-Phospho-L-ascorcbic acid trisodium, 10mM ß-Glycerophosphate disodium salt hydrate) و در دو خانه دیگر محیط تمایز به چربی (Control Medium + 1µM Dexamethasone, 0.5mM 3-Isobutyl-1-methylxathine, 0.1 mM Indomethacin, 1% ITS) بر روی سلول‌ها ریخته و کشت سلول‌ها تا ۲۱ روز ادامه پیدا کرد. (تعویض محیط هر ۳ روز)

**تشخیص تمایز:** برای نمونه تمایز به غضروف، از روند مقطع بافتی و رنگ آمیزی بافت‌شناسی (رنگ آمیزی ماسون) استفاده شد. برای نمونه تمایز به استخوان از رنگ آمیزی Alizarin Red S و برای نمونه تمایز به چربی از رنگ آمیزی Oil Red O استفاده گردید.

## نتایج و بحث

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های مختلف فرآیندی چند مرحله‌ای است که با فعال شدن چندین مسیر سیگنالی توسط فاکتورهای رونویسی خاصی، هورمون‌ها و فاکتورهای رشد اعمال می‌شود، همچنین ماتریکس خارج سلولی نیز در تنظیم فرآیند تمایز به چربی حائز اهمیت است (۸).

تمایز به غضروف با کاهش میزان بیان کلاژن نوع I و افزایش کلاژن نوع II، VI، IX و اگرکان می‌باشد (۹). در رنگ آمیزی با ماسون رشته‌های کلاژن به رنگ سبز یا آبی در آمده و هسته‌ها به رنگ تیره دیده می‌شوند.

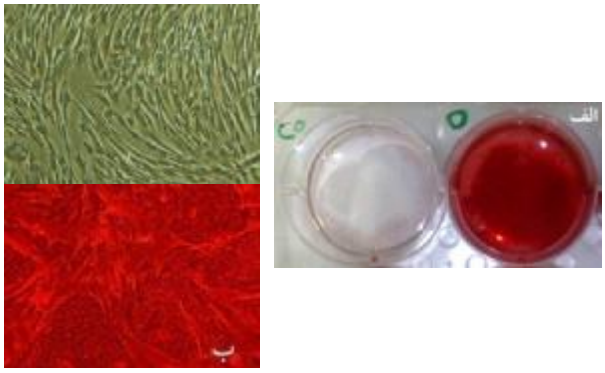


الف ب

**شکل ۱. (تمایز به غضروف)**
الف) رنگ سبز رشته های کلاژن در اثر ماسون، همراه با هسته های تیره.
ب) کنترل منفی.
(بزرگ نمایی x4)

EQUINE Health and Diseases Congress
دومین کنگره ملی بهداشت و بیماری‌های اسب

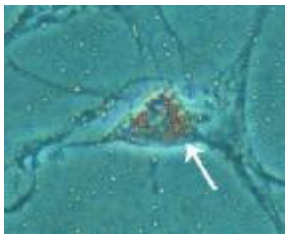
در تمایز سلول‌های بنیادی به استخوان، پروتئین‌ها و ژن‌هایی در ارتباط با فنوتیپ استئوبلاست‌ها بیان می‌شوند؛ از جمله آلکالین فسفاتاز، استئوپونین و استئوکلسین (۸). مورفولوژی استخوانی به وسیله رسوب هیدروکسی آپاتایت در ماتریکس خارج سلولی به وسیله رنگ‌آمیزی Alizarin Red S مشخص می‌شود که نتایج ما نیز آن را تایید کرد.



**شکل ۲. (تمایز به استخوان)**
الف) رسوب هیدروکسی آپاتایت در خانه‌های تمایزی در مقابل گروه کنترل.
ب) بزرگ نمایی x4

شکل الف.

همچنین پس از قرار گرفتن سلول‌ها در محیط القا کننده چربی، قطرک‌های چربی در سلول‌ها دیده شدند که با رنگ آمیزی Oil Red O به صورت قطرک‌های قرمز رنگ قابل مشاهده بودند.



الف

ب

**شکل ۳. (تمایز به چربی)**
الف) فلش قطرک‌های چربی تجمع یافته در سلول را نشان می‌دهد که توسط رنگ Oil Red O رنگ گرفته‌اند.
ب) سلول در گروه کنترل. (عدم تمایز)
(بزرگ نمایی x40)

## 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.

De Schauwer, C., Meyer, E., Van de Walle, G.R., Van Soom, A., (2011). Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. Theriogenology 75, 1431-1443.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 8, 315-317.

Elisseeff, J., (2006). Stem Cells: From Bench to Bedside. Tissue Engineering 12, 3257-3257.

Felson, D.T., (2009). Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. Arthritis Res Ther 11, 203.

Goodrich, L.R., Nixon, A.J., (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse–a review. The Veterinary Journal 171, 51-69.

Penny, J., Harris, P., Shakesheff, K., Mobasheri, A., (2012). The biology of equine mesenchymal stem cells: phenotypic characterization, cell surface markers and multilineage differentiation. Front Biosci 17, 892-908.

VIDAL, M.A., KILROY, G.E., LOPEZ, M.J., JOHNSON, J.R., MOORE, R.M., GIMBLE, J.M., (2007). Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. Veterinary surgery 36, 613-622.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M.H., (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecular biology of the cell 13, 4279-4295.