جداسازی، کشت و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سگ

داود کاظمی[1]*، کریم شمس اسنجان[2]، نیما دهدیلانی[2]، حامد پارسا[2]، علی اکبر موثق پوراکبری[2]، پروین اکبرزاده[3]

۱- گروه علوم درمانگاهی دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲- مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۳- گروه آموزشی بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: dkazemi@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۴/۱۱/۱۰ پذیرش نهایی: ۹۵/۴/۱۰)

چکیده

هدف از این مطالعه جداسازی، تکثیر و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سگ بود. بدین منظور نمونه خون مغز استخوان ۱۵ قلاده سگ نر بالغ جمع‌آوری گردید و پس از سانتریفیوژ، سلول‌های تک‌هسته‌ای جداشده در محیط استاندارد کشت داده شدند. سلول‌های چسبنده به محیط کشت جدا گردیده و پس از سه بار پاساژ ماهیت مزانشیمی آنها با استفاده از مرفولوژی سلولی، ارزیابی آنتی‌ژن‌های سطحی و تمایز به رده سلول‌های استخوانی و چربی مورد تأیید قرار گرفت. پس از ٤ روز کشت، سلول‌های دوکی شکل شبیه فیبروبلاست یا همان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ظاهر گردید و با گذشت زمان بر تعداد آنها افزوده شد و تراکم سلولی افزایش پیدا کرد. میانگین مدت زمانی که طول کشید تا سلول‌ها به تراکم بیش از ۷۵ درصد در پاساژ سوم برسند، برابر با ۲۲/۸۹±۵/۷۵ روز بود. نتایج آنالیز فلوسیتومتری نشان داد که این سلول‌ها از نظر بیان شاخص‌های CD34 و CD45 منفی بوده و در مقابل بیان شاخص‌های CD44 و CD105 آنها مثبت بود. کشت در محیط‌های القایی استئوسیتی و آدیپوسیتی به مدت یک ماه منجر به تبدیل شدن این سلول‌ها به رده‌های سلولی استخوانی و چربی گشت که نشانگر قدرت تمایز این سلول‌ها می‌باشد. افزایش بیان ژن‌های VDR، COL1A1، BGLAP و SPARC نشانگر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از مغز استخوان سگ به سلول‌های استخوانی در محیط کشت القایی می‌باشد. این یافته‌ها می‌تواند مبنایی برای انجام مطالعات بالینی آتی به‌ویژه در ارتباط با نوزایش بافت‌های استخوانی و غضروفی با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سگ باشد.

کلید واژه‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مغز استخوان، سگ.

مقدمه

سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایزنیافته‌ای هستند که خاصیت خودنوزایی و تبدیل شدن به انواع رده‌های سلولی را دارا می‌باشند. همین خصوصیات باعث شده که سلول‌های بنیادی امروزه نقش بسیار مهمی در مهندسی بافت و طب بازساختی داشته باشند. ایده سلول‌های بنیادی برای اولین بار در اواخر قرن نوزدهم میلادی هم‌زمان با ارائه فرضیاتی جهت توضیح وجود توانایی خودنوزایی دائمی در برخی از بافت‌های بدن مثل خون و پوست که از سلول‌هایی با طول عمر مشخص و کوتاه تشکیل شده‌اند، مطرح شد (Bianco *et al*., 2008).

سلول‌های بنیادی به انواع مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند که از بین آنها می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی اشاره کرد. این سلول‌ها که برای اولین بار در مغز استخوان شناسایی شدند، سلول‌های بنیادی غیر خون‌سازی هستند که توانایی تمایز به انواع سلول‌های مزودرمی را دارا می‌باشند (Krampera *et al*., 2006). سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان ذخایری از سلول‌های بازسازی‌کننده بدن محسوب می‌شوند که در صورت بروز شرایطی از قبیل آسیب، التهاب و نکروز فعال شده و تبدیل به رده‌های مختلف سلولی با ویژگی‌های خاص می‌شوند (Pountosa *et al*., 2007).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای اولین بار توسط فریدنشتاین توصیف شد. وی جمعیتی از سلول‌ها را شناسایی کرد که خاصیت چسبندگی به پلاستیک داشته و در محیط کشت ظاهری شبیه به فیبروبلاست از خود نشان می‌دادند. این سلول‌ها می‌توانستند در محیط آزمایشگاهی به غضروف، بافت چربی، استخوان، تاندون و عضله تمایز یابند. او این سلول‌ها را سلول‌های پیش‌ساز استئوژنیک نام نهاد (Friedenstein *et al*., 1968). هر چند سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان از منابع مختلف مانند بافت چربی، عضله و بافت‌های پیوندی جداسازی کرد، ولی سلول‌های اخذ شده از مغز استخوان بیشترین توانایی جهت تمایز به رده‌های مختلف سلولی را از خود نشان داده‌اند و اکثر مطالعات روی این سلول‌ها صورت گرفته است (Punwar and Khan, 2011).

سگ مدل حیوانی مناسبی برای انجام مطالعات بالینی در ارتباط با سلول‌های بنیادی مزانشیمی محسوب می‌شود. این حیوان از لحاظ کالبدشناسی، میزان و نحوه فعالیت بدنی و روند شکل‌گیری بیماری‌های مختلف شباهت‌های بسیار زیادی به انسان داشته و از این رو نتایج به‌کارگیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت درمان بیماری‌های مختلف از قبیل اختلالات استخوانی، غضروفی، عصبی و قلبی-عروقی در این حیوان به شکل دقیق‌تری قابل ارزیابی می‌باشد. از سویی دیگر بسیاری از این بیماری‌ها در خود جمعیت سگ‌سانان نیز به وفور مشاهده می‌شود. بنابراین، از دیدگاه دامپزشکی نیز انجام چنین مطالعاتی جهت یافتن روش‌های درمانی جدید با استفاده از سلول‌های بنیادی حائز اهمیت می‌باشد (Volk and Theoret, 2013; de Bakker *et al*., 2013). این درحالی است که تاکنون مطالعات اندکی در ارتباط با سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی این حیوان صورت گرفته است. اولین قدم در هر نوع مطالعه درمانی در ارتباط با سلول‌های بنیادی مزانشیمی، دسترسی به تعداد کافی از این سلول‌ها در محیط درون‌تنی می‌باشد. بنابراین هدف از این مطالعه جداسازی، تکثیر و

شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سگ با استفاده از روش‌های معمول و بویژه به‌کارگیری روش بیان ژن جهت شناسایی پتانسیل تمایزی آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از تعداد ۱۵ قلاده سگ نر بالغ از نژاد مخلوط با دامنه سنی ۲ تا ۳ سال و وزن ۱۸ تا ٤٠ کیلوگرم استفاده شد. حیوانات در قفس‌های انفرادی و در محل نگه‌داری حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز نگه‌داری می‌شدند. جهت اطمینان از سلامتی حیوانات، تمامی آنها مورد معاینه بالینی کامل قرار گرفته و آزمایش خون شامل اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، شمارش تعداد پلاکت‌ها و اندازه‌گیری میزان هموگلوبین و هماتوکریت نیز به عمل آمد. جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی انگلی، قبل از شروع مطالعه حیوانات تحت درمان با داروهای ضد انگل داخلی و خارجی قرار گرفتند، بدین ترتیب که قرص مبندازول روزانه با دوز ۲۲ mg/kg به مدت ۵ روز و ٤٨ ساعت بعد از تجویز آخرین دوز مبندازول، قرص پرازی‌کوانتل با دوز ۵ mg/kg به صورت تک‌دوز به حیوانات خورانده شد. آیورمکتین با دوز منفرد ٤٠٠ µg/kg به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. جهت پاک‌سازی بدن سگ‌ها از انگل‌های خارجی، اکتومین با دوز ۱ ml در یک لیتر آب مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور جلوگیری از آلودگی مجدد، محل نگه‌داری سگ‌ها روزانه نظافت می‌گردید.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، عمل آسپیراسیون مغز استخوان در هر یک از حیوانات صورت گرفت. در هنگام نمونه‌برداری، هر حیوان با تزریق داخل عضلانی آسه‌پرومازین به مقدار ۰/۰۵ mg/kg و تیوپنتال سدیم ۵ درصد با دوز mg/kg ۱۰ بیهوش شده و در حالت خوابیده به پهلو روی میز عمل قرار می‌گرفت. با توجه به این‌که نمونه خون مغز استخوان از قسمت ابتدایی استخوان بازو گرفته می‌شد، موضع عمل به‌صورت معمول ضدعفونی و آماده می‌شد. سپس برش کوچکی به طول ۱ سانتی‌متر روی پوست قسمت ابتدایی استخوان بازوی سمت چپ یا راست ایجاد شده و سوزن مخصوص آسپیراسیون مغز استخوان از محل برش به داخل فضای مغز استخوان بازو هدایت شده و پس از اتصال سرنگ حاوی ماده ضد انعقاد هپارین، نمونه خون از مغز استخوان حداکثر به میزان ۱۲ میلی‌لیتر گرفته می‌شد (شکل ۱). در انتها نیز سوزن آسپیراسیون از استخوان بازو خارج شده و محل برش پوست بخیه زده می‌شد.

شکل ۱- عمل آسپیراسیون مغز استخوان با استفاده از سوزن مخصوص

نمونه‌های مغز استخوان اخذشده در لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری هپارینه (۱۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط کشت ایگل تغییر یافته دالبکو (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) با گلوکز کم به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum, FBS) و ۱۰۰۰۰ واحد پنی‌سیلین/۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین به‌ازای هر میلی‌لیتر جمع‌آوری شده و طی ۲ ساعت در روی یخ جهت پردازش به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های مغز استخوان توسط محلول نمکی هانکس (Hanks Salt Solution) استریل (به میزان ۱ به ۱) رقیق شد و ۱۲ میلی‌لیتر از آن به‌روی ۳ میلی‌لیتر فایکول (Histopaque®-1077 density 1.077 g/ml) موجود در لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت. سانتریفیوژ با ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۵ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سلول‌های تک هسته‌ای از بافی‌کوت (بین سرم در بالا و گلبول‌های قرمز در پایین) توسط پیپت پاستور به آرامی جمع‌آوری شده (شکل ۲) و با حجم مساوی از بافر لیزکننده سلول‌های قرمز خون به مدت ۵ دقیقه مجاورت یافت تا بافی‌کوت عاری از سلول‌های قرمز خون شود. پس از آخرین مرحله شستشو مایع رویی دور ریخته شد و پس از هموژن کردن رسوب سلول‌های تک‌هسته‌ای در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM با گلوکز کم حاوی ۱۰ درصد FBS، ال-گلوتامین (۲ میلی‌مول)، ۱۰۰۰۰ واحد پنی‌سیلین/۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین به ازای میلی-لیتر، سوسپانسیون سلولی به تعداد 1×10^5 سلول در سانتی‌متر مربع به فلاسک کشت ۲۵ سانتی‌متر مربع انتقال یافت. بعد از ٤ روز کشت، سلول‌های غیرچسبنده توسط شستشو با سالین بافرشده با فسفات دالبکو (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS) حذف‌شده و محیط کشت هر ۲ روز یک‌بار تعویض شد تا تراکم سلول‌های چسبنده یا همان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به بیش از ۷۵ درصد برسد. جهت پاساژ، سلول‌های چسبنده دو بار با DPBS شستشو یافته و با محلول ۰/۱۲۵ درصد تریپسین در اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک‌اسید (Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) به مدت ۲ دقیقه مجاورت داده شد تا سلول‌های چسبنده از کف فلاسک کنده شده

و بـه صـورت معلـق درآینـد. جهـت غیرفعـال کـردن ترپیسین، ۵ میلی‌لیتر DMEM به همراه FBS اضافه شد. سوسپانسیون سلولی با ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مـدت ۱۰ دقیقه در ٤ درجه سـانتی‌گـراد سـانتریفیوژ شـد. تمـامی کشت‌ها در انکوبـاتور CO_2دار بـا ۵ درصـد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

جهت ارزیـابی توانـایی تکثیـر سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی مغز استخوان در محیط آزمایشگاه، سلول‌هـای بنیادی مزانشیمی پاسـاژ ۱ مشـتق از مغـز اسـتخوان بـه میـزان $۱۰^{٦}$ × ۰/۰۲۵ سـلول بـر سـانتی‌متـر مربـع در چاهک‌های ٢٤ تـایی حـاوی محـیط اسـتاندارد در روز صفر کشت داده شد. سلول‌ها بعـد از ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ سـاعت مـورد شـمارش قـرار گرفتنـد. بـرای هـر بـار شـمارش، سـلول‌هـا بـا سـالین بـافرشـده بـا فسـفات (Phosphate Buffered Saline, PBS) شسته شده و بـا ترپیسین به‌مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند تا تمامی سلول‌هـا از کف چاهک کنده شده و جمع‌آوری شوند. سلول‌های زنده با استفاده از تریپان بلو ۰/۰٤ درصـد در لام نئوبـار مورد شمارش قرار گرفتند.

شکل ۲- جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای از خون مغز استخوان سگ

تأیید ماهیت مزانشیمی سلول‌های بنیادی

شناسایی و تایید ماهیت مزانشیمی سلول‌های بنیادی جدا شده از مغز استخوان سگ با استفاده از ارزیابی آنتی‌ژنهای سطحی سلولی، تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی و چربی و بیان ژن‌های اختصاصی رده سلول‌های استخوانی صورت گرفت.

جهت شناسایی آنتی‌ژن‌های سطحی سلولی، ارزیابی فلوسیتومتری برای سلول‌های چسبان حاصل از مغز استخوان انجام گرفت. در ابتدا سلول‌های پاساژ ۳ چسبیده به کف فلاسک با محلول ۰/۰۲۵ درصد تریپسین در EDTA از کف فلاسک جدا شده و پس از سانتریفیوژ و شستشو رسوب سلولی به تعداد $۱۰^{٦}$ سلول در ۳۰۰ میکرولیتر از بافر PBS سوسپانسیون گردید. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال CD-105-PE مخلوط شد و به مدت یک ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. برای هر سری از آزمایشات یک لوله کنترل منفی شامل آنتی‌بادی مونوکلونال کونژوگه با ایزوتیپ IgG1 و IgG2a در نظر گرفته شد. پس از یک ساعت جهت حذف آنتی‌بادی‌های اضافی، دو مرتبه سلول‌ها با PBS شستشو داده شد و توسط دستگاه فلوسیتومتری (FACS Calibur Becton Dickinson) و نرم‌افزار Pro cellquest مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین ۳ نمونه تست‌شده مختلف تعیین شد.

به منظور تأیید ماهیت مزانشیمی و چندقوه‌ای سلول‌های جداشده از مغز استخوان سگ، این سلول‌ها در محیط کشت القایی اختصاصی رده‌های استخوانی و چربی کشت داده شدند و توانایی تمایز آن‌ها به سلول‌های استخوانی و چربی با رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاساژ سوم به میزان $۱۰^{٦}$ ×۰/۱ سلول بر سانتی‌متر مربع در چاهک‌های ۱۲ تایی در محیط DMEM به همراه ۱۰ درصد FBS کشت یافتند تا تراکم آنها به ۵۰ درصد برسد. سپس محیط کشت فوق با محیط القایی تمایز حاوی DMEM با فاکتور رشد اپیدرمی و ۱۰ درصد FBS به همراه ۱۰۰ نانومول دگزامتازون، ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر اسید اسکوربیک، ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انسولین و بی-کربنات سدیم تعویض شد. به مدت یک ماه هر ۵ روز یک‌بار محیط القایی تعویض می‌شد تا تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی رخ دهد. پس از ٤ هفته، فلاسک‌های کشت سلولی حاوی محیط تمایزی استئوژنیک را از انکوباتور خارج کرده پس از یک بار شستشوی سلول‌ها با PBS، به منظور تثبیت سلول‌ها، فرمالین محلول در بافر خنثی به پلیت سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از دو مرحله شستشو با بافر PBS، یک ویال محلول رنگ‌زا در ۵۰۰۰ میکرولیتر بافر سوبسترا کیت رنگ‌آمیزی آلکالن فسفاتاز مخلوط شده و به هر چاهک ٤۰۰ میکرولیتر از آن افزوده شد و مجدداً سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و در نهایت به‌منظور توقف واکنش با آب دیونیزه شستشو داده شدند. سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت جهت مشاهده رسوبات آبی رنگ بررسی شدند.

تمایز به سلول‌های چربی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی تک‌لایه‌ای انجام شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مجاورت محیط القایی تمایز شامل

DMEM با ۱۰ درصد FBS به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انسولین نوترکیب انسانی، ۱۰ میلی‌مول سدیم پیروات، ۱ میلی‌مول متیل‌ایزوبوتیل گزانتین، ۱ میکرومول دگزامتازون و ۰/۲ میکرومول ایندومتاسین به مدت یک ماه قرار گرفتند. محیط القایی هر ۵ روز یک-بار تعویض می‌شد. پس از ٤ هفته، فلاسک‌های کشت سلولی حاوی محیط تمایزی آدیپوسیتی را از انکوباتور خارج کرده پس از یک بار شستشوی سلول‌ها با PBS، به منظور تثبیت سلول‌ها، فرمالین محلول در بافر خنثی به پلیت سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از دو مرحله شستشو با بافر PBS، ۲ میلی‌لیتر ایزوپروپانول ٦۰ درصد به هر چاهک اضافه شده و به مدّت ۵ دقیقه انکوبه شد. پس از آن ایزوپروپانول حذف شده به جای آن ۲ میلی‌لیتر محلول کاری رنگ‌آمیزی روغن قرمز-او (Oil Red-O) اضافه شد و مجدداً به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید و در نهایت پس از حذف محلول رنگ-آمیزی، با آب شیر شستشو داده شد و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت جهت مشاهده واکوئل‌های قرمز رنگ بررسی شدند.

جهت ارزیابی میزان بیان ژن در سلول‌های مزانشیمی و استئوبلاست‌های حاصل از تمایز آنها از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمّی به روش نسخه‌برداری معکوس (Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) استفاده شد. در ابتدا جداسازی و تخلیص RNA از سلول‌های تمایز یافته مزانشیمی به رده استئوسیتی با استفاده از کیازول (Qiazole; Qiagene, USA) انجام شد. سلول‌های چسبان تمایزیافته به استئوسیت، با استفاده از تریپسین جداسازی و جمع‌آوری شده و یک بار با PBS شستشو داده شد. مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ بیرون ریخته و به رسوب سلولی یک میلی‌لیتر محلول کیازول اضافه شد و به مدّت ۲ دقیقه در دمای اتاق به شدت هم زده شد. محلول همگن به‌دست آمده به میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتر منتقل گردید و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه شد. لوله را چند مرتبه سر و ته کرده، سپس به مدت ۲ دقیقه هم‌زده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ ۲ لایه تشکیل گردید. لایه شفاف بالائی حاوی RNA و لایه ارغوانی-رنگ پائینی حاوی DNA و پروتئین می‌باشد. فاز بالایی که حاوی RNA است با دقّت زیاد و با استفاده از سر-سمپلرهای RNase free برداشته شد و به لوله جدید عاری از RNase منتقل شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل به لوله‌های حاوی محلول RNA اضافه شد و پس از سر و ته کردن لوله‌ها، یک بار به مدت ۱۰ ثانیه همزده شده و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیده و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدّت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس به آرامی میکروتیوپ از دستگاه سانتریفیوژ خارج شده و با کج کردن آن بر روی یک تکه پنبه، مایع رویی با احتیاط خارج گردیده و رسوب RNA در ته لوله به-دست آمد. سپس، جهت شستشو و زدودن باقی‌مانده-های فنل، ۵۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۵ درصد به رسوب RNA اضافه شده و سانتریفیوژ به مدّت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی-گراد انجام می‌شد (شستشو ۲ مرتبه انجام شد). پس از خارج کردن مایع رویی به ترتیبی که توضیح داده شد

میکروتیوپ در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد تا اندکی خشک شود. در نهایت RNA به‌دست آمده در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر حاوی دی اتیل پیروکربنات (Diethylpyrocarbonate, DEPC) حل شده و پس از استخراج در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. با استفاده از دستگاه پیکودراپ (Picodrop, UK) میزان جذب RNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. بدین منظور ابتدا دستگاه پیکودراپ با آب حاوی DEPC به عنوان بلانک صفر شد، سپس میزان ۲ میکرولیتر از محلول RNA در داخل سمپلر اختصاصی دستگاه کشیده شد و میزان جذب در دستگاه خوانده شد. تمامی نمونه‌های RNA استخراج شده جذب نوری بالاتر از ۱/۸ داشتند.

سنتز cDNA از روی RNA استخراج شده انجام شد. قبل از شروع کار برای جلوگیری از ایجاد ساختار ثانویه، RNA استخراج شده به مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جهت سنتز cDNA از کیت Revert-Aid Fermentas استفاده شد. مطابق پروتکل استاندارد کیت، نسخه‌برداری معکوس انجام شد. cDNA سنتزشده با استفاده از کیت سایبرگرین مسترمیکس (Sybergreen Sunsequest, Germany Mastermix;) برای بررسی بیان ژن‌های VDR، SPARC، COL1A1 و BGLAP در مقایسه با ژن کنترل داخلی GAPDH بر اساس پروتکل استاندارد کیت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به هر ژن (جدول ۱) مورد ارزیابی قرار گرفت.

تمام مراحل کار در روی یخ انجام شد تا از شروع واکنش در دمای اتاق جلوگیری شود. سپس میکروتیوپ‌ها در دستگاه Real time-PCR (StepOne, Applied Biosystem, USA) در محل مربوطه قرار داده شد و برنامه دمایی برای انجام واکنش اعمال شد (جدول ۲). برای ارزیابی میزان بیان ژن‌ها از روش استاندارد delta CT نرم‌افزار Step one ویرایش ۲/۱ با استفاده از ژن GAPDH به عنوان کالیبراتور داخلی استفاده شد و میزان تغییرات بیان ژن بر حسب fold change با نرمال‌سازی بر اساس ژن کالیبراتور داخلی توسط نرم‌افزار محاسبه گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مورد ارزیابی واکنش RT-PCR

Gene	Primer sequence	Amplicon size (bp)	Description
q- COL1A -F q- COL1A -R	5'-CACCTCAGGAGAAGGCTCAC-3' 5'-ATGTTCTCGATCTGCTGGCT-3'	124	Canis lupus familiaris collagen, type I, alpha 1 (COL1A1), mRNA
q- SPARC -F q- SPARC -R	5'- TGAGAAGGTATGCAGCAACG -3' 5'- AGTCCAGGTGGAGTTTGTGG -3'	110	Canis lupus familiaris secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) (SPARC), mRNA
q- VDR -F q- VDR -R	5'- CCAATCTGGATCTGAGGGAA -3' 5'- TTCAGCAGCACAATCTGGTC -3'	184	Canis lupus familiaris vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor (VDR), transcript variant X1, X2 or X3, mRNA
q- BGLAP -F q- BGLAP -R	5'- GTGGTGCAACCTTCGTGTC -3' 5'- GCTCGCATACTTCCCTCTTG -3'	132	Canis lupus familiaris bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (BGLAP), mRNA
q-GAPDH-F q-GAPDH-R	5'- TCTCTGCTCCTCCTGTTC-3' 5'- GTTGACTCCGACCTTCAC-3'		

جدول ۲- شرایط دمایی واکنش RT-PCR

فاز	زمان	دما
فعّال‌سازی (Activation)	**۱۰ دقیقه**	**۹۶ درجه سلسیوس**
دناتوراسیون (Melting)	**۱۵ ثانیه (۴۰ چرخه)**	**۹۴ درجه سلسیوس**
اتصال+طویل‌سازی (Anneling+Extension)	**۶۰ ثانیه (۴۰ چرخه)**	**۶۰ درجه سلسیوس**

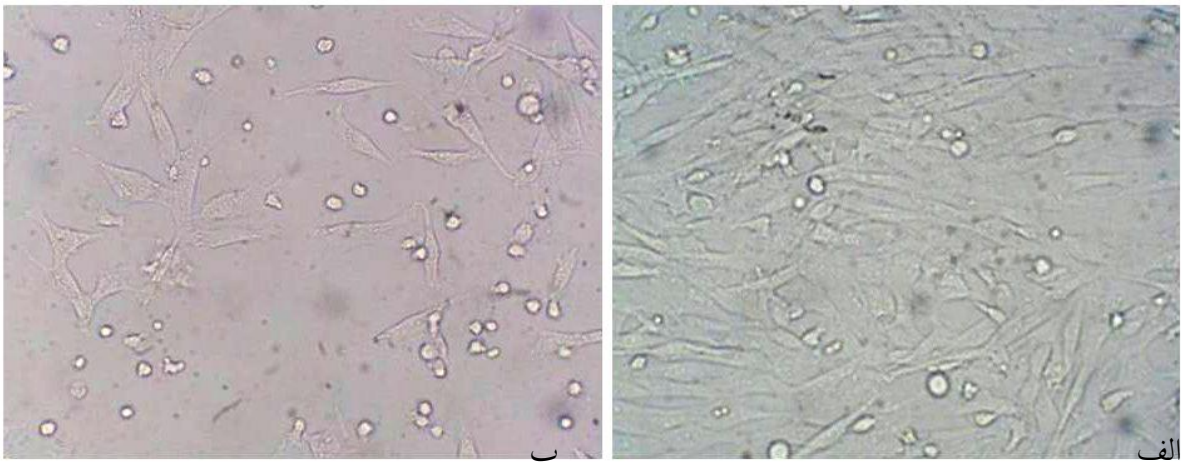
تحلیل آماری داده‌ها

جهت مقایسه میانگین تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی زنده در زمان‌های مختلف با زمان صفر، از آزمون آماری تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر (Repeated measures ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) استفاده شد. همچنین جهت مقایسه میزان بیان ژن بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایزنیافته و استئوبلاست‌های حاصل از تمایز آنها از آزمون آماری تی مستقل (Independent T-test) بهره گرفته شد. کلیه نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۶ انجام شد و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

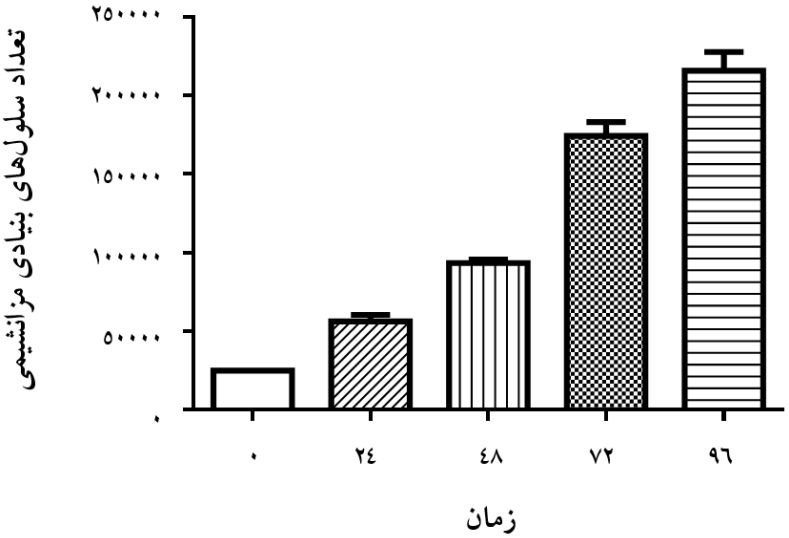
یافته‌ها

مرفولوژی سلولی و توانایی تکثیر سلول‌های بنیادی

پس از ٤ روز کشت، سلول‌های دوکی شکل یا شبیه فیبروبلاست که در واقع همان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بودند (شکل ۳-الف)، ظاهرشده و با گذشت زمان بر تعداد آنها افزوده شده و تراکم سلولی افزایش پیدا کرد. مرفولوژی دوکی شکل و شبه فیبروبلاستی سلول‌های بنیادی مغز استخوان سگ در پاساژهای ۱ تا ۳ نیز حفظ شد (شکل ۳-ب). میانگین مدت زمانی که طول کشید تا سلول‌ها به تراکم بیش از ۷۵ درصد در پاساژ سوم برسند، برابر با ۲۲/۸۹±۵/۷۵ روز بود. نتایج حاصل از تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در زمان‌های مختلف نشان داد که تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی زنده با گذشت زمان افزایش‌یافته و این افزایش از لحاظ آماری در تمام زمان‌های شمارش سلولی در مقایسه با زمان صفر معنی‌دار بود. به عبارت دیگر، اثر زمان بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط آزمایشگاه معنی‌دار بود ($F(٤، ٢٩) = ٩٠٤/١$، $p=٠/٠٠٠١$).



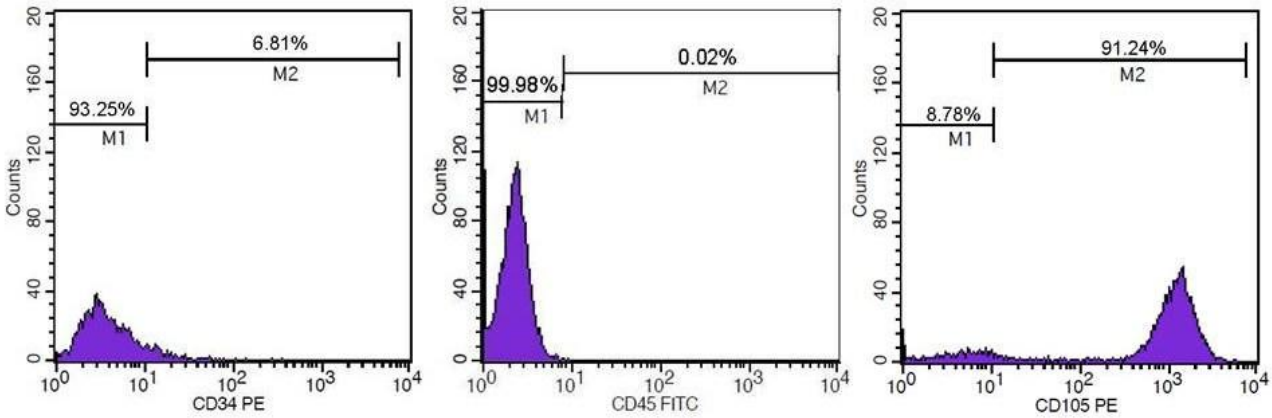
شکل ۳- سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سگ پس از ۴ روز کشت (الف) و در پاساژ سوم (ب) با درشت‌نمایی ۴۰۰×



نمودار ۱- تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی تکثیریافته در طول زمان (میانگین±انحراف معیار)

ارزیابی آنتی‌ژن‌های سطحی سلول‌های بنیادی

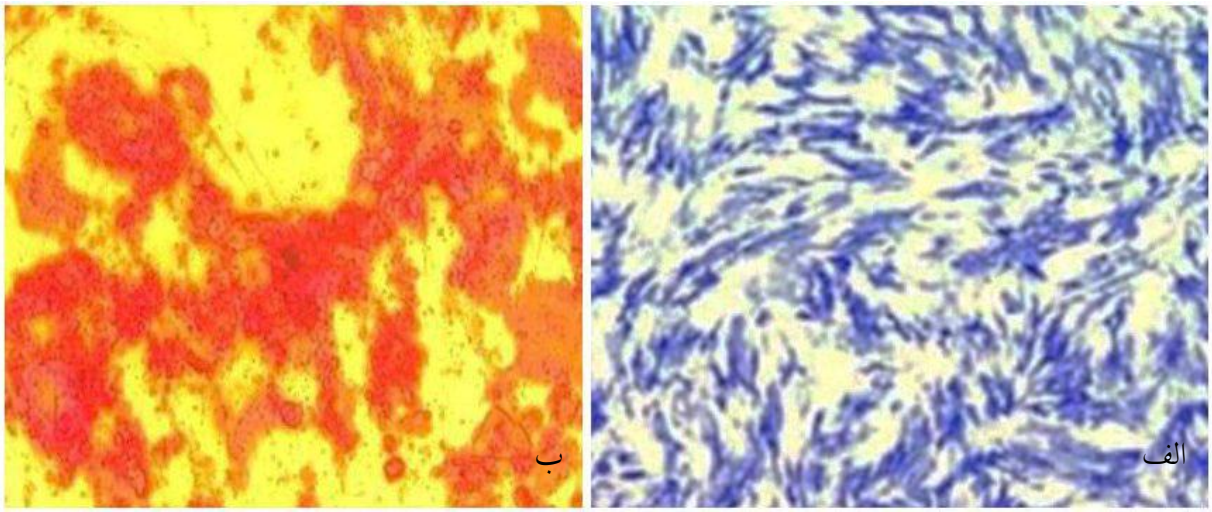
نتایج آنالیز فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده و کشت داده شده از خون مغز استخوان از نظر بیان شاخص‌های CD34 و CD45 منفی بوده و در مقابل، از نظر بیان شاخص‌های CD44 و CD105 مثبت بود (نمودار ۲).



نمودار ۲- هیستوگرام آنالیز شاخص‌های CD34، CD45 و CD105 که نشانگر منفی بودن دو شاخص اول و مثبت بودن شاخص سوم می‌باشد

تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی و چربی

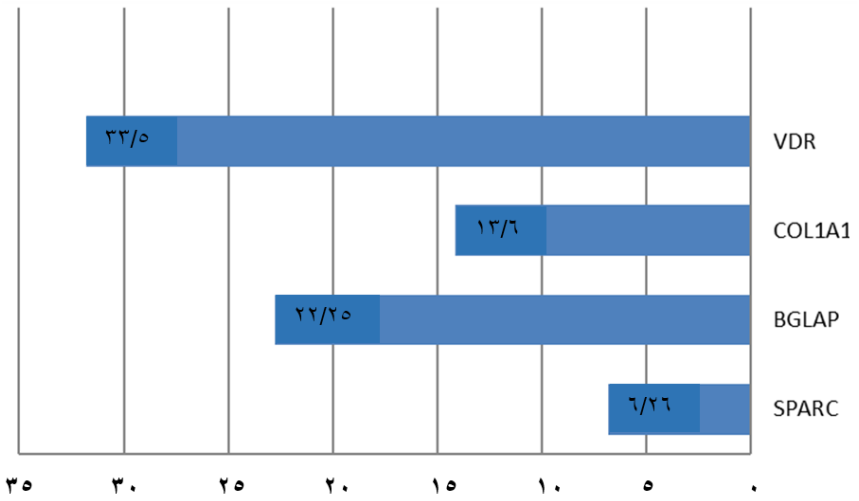
کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان سگ در محیط‌های القایی استئوسیتی و آدیپوسیتی به مدت یک ماه منجر به تبدیل شدن این سلول‌ها به رده‌های استخوانی و چربی گشت که نشانگر قدرت تمایز این سلول‌ها می‌باشد. تمایز سلولی با انجام رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی و مشاهده رسوبات آبی‌رنگ و واکوئل‌های قرمزرنگ در زیر میکروسکوپ مورد تایید قرار گرفت (شکل ٤).



شکل ۴- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از مغز استخوان سگ به سلول‌های استخوانی (الف) و چربی (ب) پس از یک ماه در محیط‌های تمایزی القایی با رنگ‌آمیزی آلکالن فسفاتاز و روغن قرمز-او (درشت‌نمایی ۲۰۰×).

بیان ژن‌های اختصاصی رده سلول‌های استخوانی

میزان بیان ژن‌های VDR، COL1A1، BGLAP و SPARC در سلول‌های مزانشیمی و استئوبلاست‌های حاصل از تمایز آن‌ها در نمودار ۳ نشان داده شده است. همان‌طوری‌که ملاحظه می‌شود، در استئوبلاست‌های حاصل از تمایز سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان میزان بیان هر یک از ژن‌های فوق به‌ترتیب ۳۳/۵±۰/۵۵، ۱۳/۶±۰/۴۹، ۲۲/۲۵±۰/۶۷ و ۶/۲۶±۰/۴۷ برابر بیان این ژن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایزنیافته بود که این مقدار اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).



نمودار ۳- میزان بیان ژن‌های VDR، COL1A1، BGLAP و SPARC در سلول‌های مزانشیمی و استئوبلاست‌های حاصل از تمایز آن‌ها

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی با موفقیت از مغز استخوان سگ جداسازی شده و پس از تکثیر، ماهیت مزانشیمی آنها مورد تأیید قرار گرفت. جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نمونه خون اخذشده از مغز استخوان که حاوی ماده ضد انعقاد می‌باشد، تحت عمل سانتریفیوژ قرار گرفته، سپس لایه سلول‌های تک‌هسته‌ای آن در محیط‌های کشت اختصاصی کشت داده می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به لایه پلاستیکی ظروف محیط کشت چسبیده و جدا می‌شوند. برخی از سلول‌های خون‌ساز نیز در کشت‌های اولیه توانایی اتصال به سطوح پلاستیکی را دارند ولی به مرور زمان این سلول‌ها شسته شده و جدا می‌شوند و تنها سلول‌های شبیه فیبروبلاست متصل به سطوح پلاستیکی باقی می‌مانند که همان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان هستند. پس از یک فاصله زمانی کوتاه، سلول‌های بنیادی به سرعت تکثیر یافته و تعدادشان افزایش پیدا می‌کند که زمان دو برابر شدن جمعیت آنها وابسته به خصوصیات میزبان یا دهنده نمونه خونی و تعداد سلول‌ها در کشت اولیه می‌باشد (Camberlain *et al.*, 2007).

تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان در محیط آزمایشگاه از ۱۰ تا ۲۰ میلی‌لیتر نمونه مغز استخوان به صدها میلیون افزایش داد (Horwitz *et al.*, 2005). این سلول‌ها می‌توانند در مدت زمان کوتاهی به سرعت تکثیر یافته و در مدت ۲ تا ۳ روز، هزار برابر شوند. همچنین آنها می‌توانند حدود ۱۹ مرتبه از لحاظ تعداد دو برابر شوند، بدون این‌که خاصیت خودشان را برای تکثیر و تمایز از دست بدهند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان به مدت طولانی کشت داد، بدون این‌که نگران از دست‌دادن ویژگی‌های فنوتیپی و عملکردی آنها باشیم (Bernardo *et al.*, 2007). مهم‌ترین بخش تکثیر موفق سلول‌های بنیادی مزانشیمی، محیط کشتی است که استفاده می‌شود. محیط کشت اختصاصی شامل گلوکز، اسیدهای آمینه و یون‌های کلسیم، منیزیم، پتاسیم، سدیم و فسفات و همچنین سرم جنین حیوانات با غلظت ۱۰ تا ۲۰ درصد می‌باشد (Pountosa *et al.*, 2007).

نحوه جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی سگ نیز مشابه روشی است که در انسان و سایر گونه‌های حیوانی انجام می‌شود. در این مطالعه نمونه‌برداری از مغز استخوان جهت جداسازی سلول‌های بنیادی، از قسمت بالایی استخوان بازوی سگ صورت گرفت. نمونه‌برداری از مغز استخوان سگ را می‌توان از قسمت بالایی استخوان‌های بازو و ران و یا از بال استخوان ایلیوم لگن انجام داد (de Bakker *et al.*, 2013). کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سگ نیز با استفاده از یک محیط کشت استاندارد صورت گرفت.

شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر اساس سه خصوصیت منحصر به فرد آنها یعنی توانایی اتصال به سطوح پلاستیکی در محیط کشت، وجود آنتی‌ژن‌ها یا مارکرهای سطحی سلولی و تمایز به رده‌های سلولی متفاوت مزودرمی صورت می‌گیرد (Dominici *et al.*, 2006; Camberlain *et al.*, 2007). یکی از ویژگی‌های شناخته‌شده سلول‌های بنیادی مزانشیمی، خاصیت چسبندگی آنها به پلاستیک در محیط کشت استاندارد می‌باشد، به‌طوری‌که در صورت عدم وجود این توانایی نمی‌توان سلول‌های جداسازی شده را سلول‌های بنیادی

مزانشیمی نامید. جداسازی اولیه و تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سگ در این مطالعه نیز با استفاده از این خصوصیت صورت گرفت. از لحاظ مرفولوژیکی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های کوچک، بلند و باریکی هستند که دارای یک هسته بزرگ کروی و هستک برجسته می‌باشند. کروماتین هسته ظریف بوده و به این سلول‌ها ظاهری شفاف می‌دهد (Wan *et al*., 2006). سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداسازی شده از مغز استخوان سگ نیز واجد چنین ویژگی‌های ظاهری بودند، به‌طوری‌که سلول‌هایی شفاف، دوکی شکل و شبیه فیبروبلاست در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده بود.

هر چند شناسایی آنتی‌ژن‌های سطحی سلولی با استفاده از روش فلوسیتومتری یکی از روش‌های تعیین ماهیت این سلول‌ها محسوب می‌شود، ولی به دلیل عدم وجود مارکرهای اختصاصی به‌خصوص در سگ، این روش دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد به‌طوری‌که، در مطالعات مختلف از حضور یا عدم حضور مارکرهای متفاوتی جهت شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بهره گرفته می‌شود. در این مطالعه نشان داده شد که سلول‌های تک‌هسته‌ای جداشده از مغز استخوان سگ دارای مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CD44 و CD105) و فاقد مارکرهای سلول‌های خون‌ساز (CD34 و CD45) می‌باشند. بیان مثبت آنتی‌ژن‌های CD44 و CD105 و بیان منفی آنتی‌ژن‌های CD34 و CD45 از خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان نیز محسوب می‌شود (Dominici *et al*., 2006; Camberlain *et al*., 2007). نتایج حاصل از این تحقیق با یافته‌های مطالعات قبلی (Takemitsu *et al*., 2012; Tharasanit *et al*., 2011; Kang and Park, 2014; Screven *et al*., 2014; Rezaei *et al*., 2013; Hodgkiss-Geere *et al*., 2012; Kisiel *et al*., 2012) هم‌خوانی داشته و نشان می‌دهد که بیان مثبت آنتی‌ژن‌های CD44 و CD105 و بیان منفی آنتی‌ژن‌های CD34 و CD45 توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سگ از ویژگی‌های این سلول‌ها محسوب می‌شود که می‌تواند در تعیین ماهیت آنها با استفاده از روش فلوسیتومتری مورد استفاده قرار گیرد.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان سگ به سلول‌های استخوانی و چربی با موفقیت در این مطالعه صورت گرفت. تمایز این سلول‌ها به رده‌های مختلف سلول‌های مزودرمی به‌خصوص سلول‌های استخوانی، چربی و غضروفی بدون هیچ شک و تردیدی ماهیت مزانشیمی آنها را به اثبات می‌رساند (Dominici *et al*., 2006). بر اساس نظر برخی از محققین، محیط القایی مورد نیاز جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی سگ به رده‌های مختلف مزودرمی به‌ویژه سلول‌های چربی، نیازمند ایجاد تغییراتی از جمله اضافه کردن سرم خرگوش می‌باشد (de Bakker *et al*., 2013). در این مطالعه تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی با استفاده از محیط القایی استاندارد و بدون اضافه کردن سرم خرگوش انجام گرفت. همچنین ارزیابی میزان بیان ژن در سلول‌های مزانشیمی و استئوبلاست‌های حاصل از تمایز آنها ماهیت مزانشیمی سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا شده از مغز استخوان سگ را به اثبات رساند. افزایش بیان ژن‌های VDR، COL1A1، BGLAP و SPARC نشانگر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان سگ به سلول‌های استخوانی در محیط کشت القایی می‌باشد. ژن‌های گیرنده ویتامین د (VDR)، کلاژن تیپ

1A1 (COL1A1)، استئوکلسین (BGLAP) و استئونکتین (SPARC) ژن‌های اختصاصی سلول‌های استخوانی هستند که افزایش بیان آنها نشانگر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی می‌باشد (Kulterer *et al*., 2007).

به‌طور کلی، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان به سهولت و بدون اینکه مشکلی برای حیوانات ایجاد شود از مغز استخوان سگ جداسازی، تکثیر و تعیین هویت کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سگ توانایی تبدیل شدن به رده‌های مختلف سلول‌های مزودرمی به‌ویژه سلول‌های استخوانی و چربی را دارند. با توجه به کمبود مطالعات بالینی در ارتباط با نقش سلول‌های بنیادی سگ در طب بازساختی و ترمیم بافت‌های مختلف بدن، این یافته‌ها می‌تواند مبنایی برای انجام مطالعات بالینی به‌ویژه در ارتباط با نوزایش بافت‌های استخوانی و غضروفی با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سگ شود. بدون شک انجام چنین مطالعاتی می‌تواند راه‌گشای درمان موفقیت‌آمیزتر بسیاری از بیماری‌ها و اختلالات سیستم عضلانی-اسکلتی در عرصه دامپزشکی و پزشکی شود.

سپاسگزاری

این مقاله از طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۱٦۱٥٤-٥-۱۷-۲ مورخ ۹۱/٤/۱۰ که با بودجه پژوهشی و حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به انجام رسیده است، استخراج شده است. بدین وسیله نگارندگان کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به سبب تصویب و حمایت مالی طرح پژوهشی اعلام می‌دارند.

منابع

- Bernardo, M.E., Avanzini, M.A. and Perotti, C. (2007). Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. Journal of Cellular Physiology, 211: 121-130.
- Bianco, P., Robey, P.G. and Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. Cell stem cell, 2(4): 313-319.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. and Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem cells, *25*(11): 2739-2749.
- de Bakker, E., Van Ryssen, B., De Schauwer, C. and Meyer, E. (2013). Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. Veterinary Quarterly, *33*(4): 225-233.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., *et al.* (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, *8*(4): 315-317.

- Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V. and Kurolesova, A.I. (1968). Heterotopic of bone marrow: analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation, 6: 230-247.
- Hodgkiss-Geere, H.M., Argyle, D.J., Corcoran, B.M., Whitelaw, B., Milne, E., Bennett, D., *et al*. (2012). Characterisation and differentiation potential of bone marrow derived canine mesenchymal stem cells. The Veterinary Journal, 194(3): 361-368.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K. and Dominici, M. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 7: 393-395.
- Kang, M.H. and Park, H.M. (2014). Evaluation of adverse reactions in dogs following intravenous mesenchymal stem cell transplantation. Acta Veterinaria Scandinavica, 56(1): 1-8.
- Kisiel, A.H., McDuffee, L.A., Masaoud, E., Bailey, T.R., Gonzalez, B.P.E. and Nino-Fong, R. (2012). Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. American Journal of Veterinary Research, *73*(8): 1305-1317.
- Krampera, M., Pizzolo, G., Aprili, G. and Franchini, M. (2006). Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. Bone, 39(4): 678-683.
- Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., *et al.* (2007). Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. BMC genomics, 8(1): 70.
- Pountos, I., Corscadden, D., Emery, P. and Giannoudis, P.V. (2007). Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. Injury, 38: S23-S33.
- Punwar, S. and Khan, W.S. (2011). Suppl 2: Mesenchymal Stem Cells and Articular Cartilage Repair: Clinical Studies and Future Direction. The Open Orthopaedics Journal, 5: 296-301.
- Rezaei, M., Jamshidi, S., Saffarpour, A., Ashouri, M., Sharifi, D., Zamankhan Malayeri, H., *et al.* (2013). Isolation, characterization and transduction of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells (cBM-MSCs). Iranian Journal of Veterinary Medicine, 7(3): 193-199.
- Takemitsu, H., Zhao, D., Yamamoto, I., Harada, Y., Michishita, M. and Arai, T. (2012). Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. BMC Veterinary Research, 8(1): 150.
- Tharasanit, T., Phutikanit, N., Wangdee, C., Soontornvipart, K., Tantrajak, S., Kaewamatawong, T., *et al*. (2011). Differentiation potentials of canine bone marrow mesenchymal stem cells. The Thai Journal of Veterinary Medicine, 41(1): 79-86.
- Volk, S.W. and Theoret, C. (2013). Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. Wound Repair and Regeneration, 21(3): 382-394.
- Wan, C., He, Q., McCaigue, M., Marsh, D. and Li, G. (2006). Nonadherent cell population of human marrow culture is a complementary source of mesenchymal stem cells (MSCs). Journal of Orthopaedic Research, 24(1): 21-28.

Isolation, culture expansion and characterization of canine bone marrow derived mesenchymal stem cells

Kazemi, D.[1]*, Shams Asenjan, K.[2], Dehdilani, N.[2], Parsa, H.[2], Movassagh Pour Akbari, A.A.[2], Akbarzadeh, P.[3]

1- Department of Veterinary Clinical Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
3- Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
*Corresponding author's email: dkazemi@iaut.ac.ir
(Received: 2016/1/30 Accepted: 2016/6/30)

Abstract
The purpose of the present study was to isolate, culture expand and characterize canine bone marrow derived mesenchymal stem cells. Bone marrow aspirates of 15 adult male dogs were collected to this end and their mononuclear cells isolated by centrifugation and cultured in standard media. The adherent cells were isolated and their mesenchymal origin was confirmed at 3rd passage by cellular morphology, expression of surface antigens and differentiation to osteogenic and adipogenic lineage. After 4 days, spindle shaped fibroblast like cells which were apparently bone marrow derived mesenchymal stem cells appeared in culture medium and their numbers increased over time. The cells reached 3rd passage with over 75% confluent after a mean of 22.89±5.75 days. Flow cytometric analysis revealed that the cells negatively expressed CD34 and CD45 antigens while positively expressing CD44 and CD105 antigens. Differentiation into osteogenic and adipogenic lineage had taken place after one month culture in induction medium. VDR, COL1A1, BGLAP and SPARC gene expression indicated that mesenchymal stem cells isolated from canine bone marrow had differentiated into osteogenic lineage. These findings can form the basis of any forthcoming clinical studies involving the use of canine mesenchymal stem cells particularly in the field of bone and cartilage regeneration.

Key words: Mesenchymal stem cells, Bone marrow, Dog.