یادداشت تکنیکی

نشاندارسازی سلولهای بنیادین مزانشیمی با رادیوداروی ایندیوم–اکساین (^{111}In-Oxine) در ایران

علی غلامرضانژاد[۱]، محمد باقری[۲]، مهدی محمدنژاد[۲]، سحرمیرپور[۱]، جلیل مجد اردکانی[۳]، کامران علی مقدم[٤]، مریم بشتر[٤]، داود بیکی[۱]، کیانوش انصاری گیلانی[۱]، محسن ساغری[۱]، اردشیر قوام زاده[٤]، رضا ملک زاده[۲]

[۱] موسسه تحقیقات پزشکی هسته ای، [۲] مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد،
[۳] بخش پزشکی هسته ای مرکزقلب تهران، [٤] مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان،
دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۸٦/۹/۱ ، تاریخ اصلاح: ۸٦/۹/۱۹ ، تاریخ پذیرش: ۸٦/۱۰/۱)

نویسنده مسئول: دکتر سحر میر پور، تهران، بیمارستان شریعتی، موسسه تحقیقات پزشکی هسته ای
E-mail:mirpour@razi.tums.ac.ir

مجله پزشکی هسته ای ایران، دوره ۱۵، شماره ۲ (شماره مکرر ۲۸) سال ۱۳۸٦، صفحات ۲۷-۲۵

طی سالهای اخیراستفاده از سلولهای بنیادین در درمان بیماریهای مختلف رو به پیشرفت بوده و تحت عنوان طب رژنراتیو (Regenerative Medicine)، امیدواریهای زیادی برای بازسازی مجدد بافتها و بدین ترتیب درمان بیماریهای گوناگون نظیرانواع سرطان، پارکینسون و انفارکتوس های مغزی و قلبی ایجاد کرده است (٤-۱).

تاکنون ردیابی (tracking) سلولهای بنیادین پس از تزریق به بدن به روشهای مختلفی انجام شده است تا جایگزینی این سلولها در بخشهای مختلف بدن و نحوه توزیع آنها مشخص گردد. به طورمثال، از روشهایی نظیر نشاندارسازی با اکسید آهن (Iron oxide) و مواد فلورسنت و یا ترکیبی از این دو در ردیابی این سلولها، استفاده کرده اند (۵). همچنین MRI از روشهایی است که برای ردیابی سلولهای بنیادین استفاده شده است (٦). اما از جمله مشکلات این روشها حساسیت پایین و عدم دسترسی آسان به پروبهای مخصوص این کار است (۷). برخلاف این روشها، استفاده از متدهای رادیوایزوتوپیک به منظور ردیابی سلولهای بنیادین از حساسیت بالایی برخوردار بوده است (۸). ترکیبات رادیوایزوتوپیک مختلفی که تاکنون برای ردیابی سلولهای بنیادین بیشتر مورد استفاده قرار گرفته اند، شامل رادیوداروهای ایندیوم- اکساین (^{111}In-oxine) و ^{99m}Tc-HMPAO است (۱۰-۹). این یادداشت تکنیکی اولین گزارش نشاندار سازی سلولهای مزانشیمال بنیادین (MSC) با رادیوداروی ایندیوم- اکساین در ایران محسوب می گردد و هدف اصلی از انجام این پژوهش، بررسی امکان انجام نشاندار سازی سلول های بنیادین با رادیوداروی ^{111}In-oxine در ایران بوده است. همچنین در این پژوهش، به ارزیابی میزان زنده ماندن سلولها (Viability) و کارایی

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Monday, August 13, 2012

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Monday, August 13, 2012

نشاندارسازی (Labeling efficiency) و همچنین بررسی اکتیویته ویژه (Specific activity) هنگام نشاندار سازی سلول های بنیادین با این رادیو دارو پرداخته شده است.

آماده سازی سلولهای بنیادین مزانشیمال و کشت آنها:

میزان ۲۰ میلی لیتر مغز استخوان از ٤ مکان مختلف ایلیاک کرست در سمت راست و چپ با شیوه استاندارد و در شرایط استریل آسپیره شد. برای کشت سلولهای بنیادین ابتدا سلولهای مونونوکلئار توسط سانتریفوژ با دور g ۳۲۰ ازمغز استخوان جداسازی گردید.

سلولهای مونونوکلئار از قسمت اینترفاز جمع آوری شده و در محیط کشت زیر قرار گرفتند:

Modified Eagle's medium-low glucose (DMEM-LG;Sigma)

این محیط دارای محلول آنتی بیوتیک-آنتی میکوتیک به شرح زیر بود (۱۰):

Penicillin G sodium: 100U/ml
Streptomycin(sulfate: 100Ig/ml)
Fetal Bovine serum(FBS 10%)
Amphotericin B: 0.25Ig/ml

سپس این سوسپانسیون در فلاسک های ۷۵ cm^2 در انکوباتور قرارگرفتند و به مدت دو روز انکوبه شدند بطوریکه دی اکسیدکربن در این مدت از طریق کپسول بطور مداوم در اختیار سلولها قرار گرفت. بعد از این مدت سلولهای مزانشیمال مغز استخوان که کف فلاسک چسبیده بودند، از طریق شستشو از بقیه سلولهای سوسپانسیون جداسازی شدند

هنگامیکه جمعیت MSC به ۹۰-۸۰٪ رسید، تریپسینیزه شده وسپس کانت می شدند و با دانسیته سلولی $۱۰^٦$× ۱ بعنوان پاساژ اول با ایندیوم-اکساین نشاندار شدند (۱۲-۱۰).

نشاندار سازی با ایندیوم-اکساین:

از ۳ ساعت قبل از انفوزیون، سلولهای بنیادین به محل نشاندارسازی انتقال یافتند. حمل این سلولها در یخ صورت گرفت. سلولها در محلول ۰/۲۵٪ تریپسین- ادتا یا جیبکو [Trypsin-EDTA(Gibco)] برای مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند تا از دیواره فلاسک ها جدا گردند. نمونه سلولی که از آن استفاده شد دارای $۱۰^٦$ سلول مزانشیمال بود. به میزان ۵۰ میکروکوری رادیوداروی ایندیوم- اکساین درسرنگ انسولین کشیده شده و به این محیط سلولی تخلیه گردید. سپس سرنگ خالی مجددا توسط دوزکالیبراتور کانت شد که میزان اکتیویته باقی مانده در سرنگ ۵/۸ میکروکوری تعیین شد. بنابراین میزان اکتیویته باقی مانده در نمونه، ٤٤/۲ میکروکوری تخمین زده شد. در مرحله بعد، نمونه سلولی به مدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه شیکر قرارگرفت. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور g ۳۲۰، سانتریفوژ گردید. سلولها دو بار با نرمال سالین شستشو داده شدند تا ایندیوم- اکساین آزاد از سلولها جدا شود. بعد از این مراحل تعداد سلولها مجددا شمارش شدند که بازهم میزان آن $۱۰^٦$ سلول تخمین زده شد. همچنین نمونه سلولی مجددا توسط دوزکالیبراتور کانت گردید و کارایی نشاندارسازی (اکتیویته نهایی/ [اکتیویته سرنگ انسولین پر- اکتیویته سرنگ خالی] ×۱۰۰) و اکتیویته ویژه (µci/$۱۰^٦$cell) آنها مورد محاسبه قرار گرفت. در ضمن وایابیلیتی نمونه نیز با استفاده از رنگ به صورت exclusion method trypan blue مورد ارزیابی قرارگرفت. بعد از decay correction (حدود ۳ ساعت) نتایج این مطالعه به شرح زیر بود:

کارایی نشاندارسازی در نمونه سلولی ۷۰/٦٪ محاسبه شد.

میزان اکتیویته ویژه در نمونه سلولی µci/$۱۰^٦$ cell ۳۱/۷۰ بدست آمد.

میزان وایابیلیتی درنمونه ۱۰۰٪ تخمین زده شد.

نتایج مطالعه ما مشابه با مطالعه ای است که در سال ۲۰۰۱ توسط Gao و همکارانش انجام شده است. در این مطالعه میزان اکتیویته ویژه µci/$۱۰^٦$ cell ٤۰ گزارش شده است که در مطالعه ما نیز میزان اکتیویته ویژه تقریبا

مشابه با این رقم بوده است. کارایی نشاندارسازی در مطالعات قبلی ۸۰-۷۰٪ گزارش شده (۱۰) که این میزان با نتیجه مطالعه ما همخوانی داشته است. با توجه به این نتایج می توان امیدوار بود که از این روش برای نشاندارسازی سلولهای بنیادین، ردیابی و توزیع آنها درمطالعات آینده در ایران با موفقیت استفاده شود.

منابع

1. Steindler DA. Stem cells, regenerative medicine, and animal models of disease. ILAR J. 2007; 48(4):323-38.
2. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. N Engl J Med 2006; 355: 1210-1221
3. Mohyeddin Bonab M, Yazdanbakhsh S, Alimoghaddam K, Talebian F, Hooshmand F, Lotfi J, Ghavamzadeh A. Mesenchymal stem cell therapy for multiple sclerosis. Int J Hematol Oncol BMT 2005; 2: 10-16.
4. Snyder EY, Daley GQ, Goodell M. Taking stock and planning for the next decade: realistic prospects for stem cell therapies for the nervous system. J Neurosci Res 2004; 76: 157-168.
5. Modo M, Cash D, Mellodew K, Williams SC, Fraser SE, Meade Tj, et al. Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. Neuroimage. 2002; 17: 803–811.
6. Jendelova P, Herynek V, Urdzikova L. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. J Neurosci Res. 2004; 76(2): 232–243.
7. Adonai N, Nguyen KN, Walsh J. Ex vivo cell labeling with 64Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 3030–3035.
8. Boersma HH, Tromp SC, Hofstra L, Narula J. Stem cell tracking: reversing the silence of the lambs. J Nucl Med. 2005; 46(2): 200-3.
9. Yoon CH, Hur J, Oh IY, Park KW, Kim TY, Shin JH, et al. Intercellular adhesion molecule-1 is upregulated in ischemic muscle, which mediates trafficking of endothelial progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; 26(5):1066-72.
10. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. Cells Tissues Organs. 2001; 169(1): 12-20.
11. Lennon, D P, Haynesworth S E, Young R G, Dennis J E, Caplan A I. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. Exp Cell Res. 1995; 219: 211–222.
12. Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. Cell Transplant. 1992; 1(1): 23-32.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Monday, August 13, 2012