

## نشانداری سلولهای بنیادین مزانشیمی با رادیوداروی ایندیوم-اکساین ( $^{111}\text{In-Oxine}$ ) در ایران

علی غلامرضانژاد<sup>۱</sup>، محمد باقری<sup>۲</sup>، مهدی محمدنژاد<sup>۳</sup>، سحر میرپور<sup>۱</sup>، جلیل مجد اردکانی<sup>۳</sup>، کامران علی مقدم<sup>۴</sup>،  
مریم بستر<sup>۴</sup>، داود بیکی<sup>۱</sup>، کیانوش انصاری گیلانی<sup>۱</sup>، محسن ساغری<sup>۱</sup>، اردشیر قوام زاده<sup>۴</sup>، رضا ملک زاده<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> موسسه تحقیقات پزشکی هسته ای، <sup>۲</sup> مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد،  
<sup>۳</sup> بخش پزشکی هسته ای مرکز قلب تهران، <sup>۴</sup> مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان،  
دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۸۶/۹/۱، تاریخ اصلاح: ۸۶/۹/۱۹، تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۰/۱)

نویسنده مسئول: دکتر سحر میر پور، تهران، بیمارستان شریعی، 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 ۱۳۸۶، صفحات ۲۷-۲۵

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 ( $^{111}\text{In-oxine}$ ) و  $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$  است (۹-۱۰). این یادداشت تکنیکی اولین گزارش نشانداری سازی سلولهای مزانشیمال بنیادین (MSC) با رادیوداروی ایندیوم-اکساین در ایران محسوب می گردد و هدف اصلی از انجام این پژوهش، بررسی امکان انجام نشانداری سازی سلول های بنیادین با رادیوداروی  $^{111}\text{In-oxine}$  در ایران بوده است. همچنین در این پژوهش، به ارزیابی میزان زنده ماندن سلولها (Viability) و کارایی

طی سالهای اخیر استفاده 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 نظیر انواع سرطان، پارکینسون و انفارکتوس های مغزی و قلبی ایجاد کرده است (۴-۱).

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 نشانداری سازی 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 (۶).

نشانداری (Labeling efficiency) و همچنین بررسی اکتیویته ویژه (Specific activity) هنگام نشانداری 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 ۴ مکان مختلف ایلیاک کرسرست 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 ۳۲۰ g از مغز 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  $75\text{ cm}^2$  در انکوباتور قرار گرفتند 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 و سپس کانت می شدند و با دانسیته سلولی  $1 \times 10^6$  بعنوان پاساژ اول با ایندیوم-اکساین نشانداری شدند (۱۲-۱۰).

#### نشانداری سازی با ایندیوم-اکساین:

از ۳ ساعت قبل از انفوزیون، سلولهای بنیادین به محل نشانداری 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  $10^6$  سلول مزانشیمال بود. به میزان ۵۰ میکروکوری رادیوداروی ایندیوم-اکساین در سرنگ 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، ۴۴/۲ میکروکوری تخمین زده شد. در مرحله بعد، نمونه سلولی به مدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار گرفت. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۲۰ g، 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  $10^6$  سلول تخمین زده شد. همچنین نمونه سلولی مجددا توسط دوزکالیبراتور کانت گردید و کارایی نشانداری (اکتیویته نهایی) / [اکتیویته سرنگ انسولین پر- اکتیویته سرنگ خالی]  $100 \times$  و اکتیویته ویژه ( $\mu\text{ci}/10^6\text{ cell}$ ) آنها مورد محاسبه قرار گرفت. در ضمن وایابیلیتی نمونه نیز با استفاده از رنگ به صورت exclusion method trypan blue مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از correction (حدود ۳ ساعت) نتایج این مطالعه به شرح زیر بود:

کارایی نشانداری در نمونه سلولی ۷۰/۶٪ محاسبه شد. میزان اکتیویته ویژه در نمونه سلولی  $\mu\text{ci}/10^6\text{ cell}$  ۳۱/۷۰ بدست آمد.

میزان وایابیلیتی در نمونه 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  $40\ \mu\text{ci}/10^6\text{ cell}$  گزارش شده است که در مطالعه ما نیز میزان اکتیویته ویژه تقریبا

نشانداری سلولهای بنیادین، ردیابی و توزیع آنها در مطالعات آینده در ایران با موفقیت استفاده شود.

مشابه با این رقم بوده است. کارایی نشانداری 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

## 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  $^{64}\text{Cu}$ -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.