



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลที่ได้จากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันของสุนัขเพื่อเป็นเซลล์ประสาท (Neuronal differentiation of canine mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue)

โดย ผศ.น.สพ.ดร. อีรวัฒน์ ธาราพานิต และคณะ

มิถุนายน ปีพ.ศ.2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลที่ได้จากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันของสุนัขเพื่อเป็นเซลล์ประสาท (Neuronal differentiation of canine mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue)

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.น.สพ.ดร. อธิวัฒน์ ธาราศานิต ภาควิชาสัตวศาสตร์ เหนือเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. สพ.ญ.ดร. นวเพ็ญ ภูติภักดิ์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ เหนือเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ศ. น.สพ. ดร. มงคล เตชะกำพุ ภาควิชาสัตวศาสตร์ เหนือเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380153

ชื่อโครงการ: การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่ได้จากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันของสุนัขเพื่อเป็นเซลล์ประสาท

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ผศ.น.สพ.ดร. วีรวัฒน์ ธาราปานิต และคณะ ภาควิชาสัตวศาสตร์ เหนือมหาวิทยาลัย และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมล: Theerawat.t@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (MSCs) เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการเจริญเพิ่มจำนวนและสามารถพัฒนาเป็นเซลล์จำเพาะหลายชนิดโดยเฉพาะเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลาง อย่างไรก็ตามมีข้อจำกัดของข้อมูลการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิด MSCs ให้เป็นเซลล์ประสาท การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด MSCs ที่เก็บจากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันของสุนัขต่อประสิทธิภาพการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ประสาท ทำการเก็บตัวอย่างจากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันจากสุนัขจำนวน 4 ตัว ทำการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน ทำการย่อยเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวและเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนจำนวน 3 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาตรวจโปรตีนบนผิวเซลล์ได้แก่ CD 34 CD 44 และ CD 90 ด้วยโฟวโฟลโวลูเมตรี ทำการตรวจคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ด้วยการกระตุ้นให้เซลล์พัฒนาเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลาง ได้แก่การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมัน นำเซลล์ไลน์จำนวน 4 เซลล์ไลน์ที่มาจากทั้งไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันมากระตุ้นให้เป็นเซลล์ประสาท โดย 7 วันแรกใส่โกรทแฟคเตอร์ ชนิดอีพีเดอร์มอล และ เบสิคไฟโบรบลาส เพื่อให้เกิดการรวมกลุ่มของเซลล์ประสาท (neurospheres) จากนั้นย่อยเซลล์ออกจาก neurosphere เป็นเซลล์เดี่ยวและเลี้ยงเซลล์ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ประสาทที่ปราศจากโกรทแฟคเตอร์นาน 5 วัน ก่อนเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจประสิทธิภาพการพัฒนาของเซลล์ประสาท การศึกษานี้พบว่าเซลล์ที่เก็บได้จากทั้งไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันแสดงออกโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD 40 และ CD 90 ในระดับสูง แต่แสดงออก CD 34 น้อย แสดงว่ามีการปนเปื้อนของเซลล์ต้นกำเนิดเล็กน้อยมาก (น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์) โดยเซลล์ที่ได้นี้มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ซึ่งตรวจได้จากคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นเซลล์ในกลุ่มเซลล์กระดูกและเนื้อเยื่อไขมันเมื่อทำการกระตุ้นในจานเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังเปลี่ยนแปลงข้ามชนิดเนื้อเยื่อให้เจริญพัฒนาเป็นเซลล์ประสาทได้ แต่มีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน เทคนิคการเปลี่ยนเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ให้เป็นเซลล์ประสาทมีแนวโน้มเจริญเป็นเซลล์แอสโตรไซต์มากกว่าจะเป็นเซลล์ประสาทชนิดอื่นๆ

คำหลัก : สุนัข เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ เซลล์ประสาท

Abstract

Project Code: MRG5380153

Project Title: Neuronal differentiation of canine mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue

Investigator: Theerawat Tharasanit et al. Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

E-mail Address: Theerawat.t@chula.ac.th

Project Period: 2 years

Abstract:

Mesenchymal stem cells (MSCs) have a unique capability to multiply and differentiate into specialized cell types especially the mesodermal lineage. However, information on differentiation of the MSCs into neurons has been limited. This study aimed at examining the capability of mesenchymal stem cells isolated either from bone marrow or from adipose tissue on neuronal differentiation. The bone marrow contents and adipose tissues were collected from 4 dogs. The putative MSCs were cultured and passaged. On passage 3, they were disaggregated and examined for cell surface proteins CD 34, CD 44 and CD 90 using flow cytometry. They were also chemically induced to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages. Two-step neuronal differentiation protocol was used in this study. The MSCs were cultured in preneuronal differentiation medium containing basic fibroblast growth factor (bFGF) and epidermal growth factor (EGF) for 7 day in order to allow the neurons to aggregate as a neurosphere. The neurospheres were trypsinized and the single cells were further cultured in neuronal medium without the two growth factors for additional 5 days.

In this study, we found that cells isolated from bone marrow and adipose tissue highly expressed mesenchymal stem cell markers (CD 44 and CD 90), while the expression of the hemopoietic stem cells were found to be rare (CD 34, less than 5 %). These MSCs irrespective the origin of cells were able to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages. In addition, they also demonstrated to transdifferentiate into neuronal lineage but the efficacy appeared to differ when compared between the bone and adipose tissue derived MSCs. By using the specific neuronal differentiation, the MSCs tended to differentiate into astrocyte rather than other neuronal lineages.

Keywords: Canine, Mesenchymal stem cells, neuron

เอกสารแนบหมายเลข 3

Executive summary

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (MSCs) เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการเจริญเพิ่มจำนวนและสามารถพัฒนาเป็นเซลล์จำเพาะหลายชนิดโดยเฉพาะเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลาง อย่างไรก็ตามมีข้อจำกัดของข้อมูลการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิด MSCs ให้เป็นเซลล์ประสาท การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด MSCs ที่เก็บจากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันของสุนัขต่อประสิทธิภาพการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ประสาท ภายหลังการเก็บของเหลวจากโพรงกระดูกสันหลังและเนื้อเยื่อไขมัน ทำการเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนและนำเซลล์ที่ได้มาตรวจโปรตีนบนผิวเซลล์ได้แก่ CD 34 CD 44 และ CD 90 ด้วยโฟลโวลูมิทรี ทำการตรวจคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ด้วยการกระตุ้นให้เซลล์พัฒนาเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลาง ได้แก่การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมัน นำเซลล์ไลน์จำนวน 4 เซลล์ไลน์ที่มาจากทั้งไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันมากระตุ้นให้เป็นเซลล์ประสาท

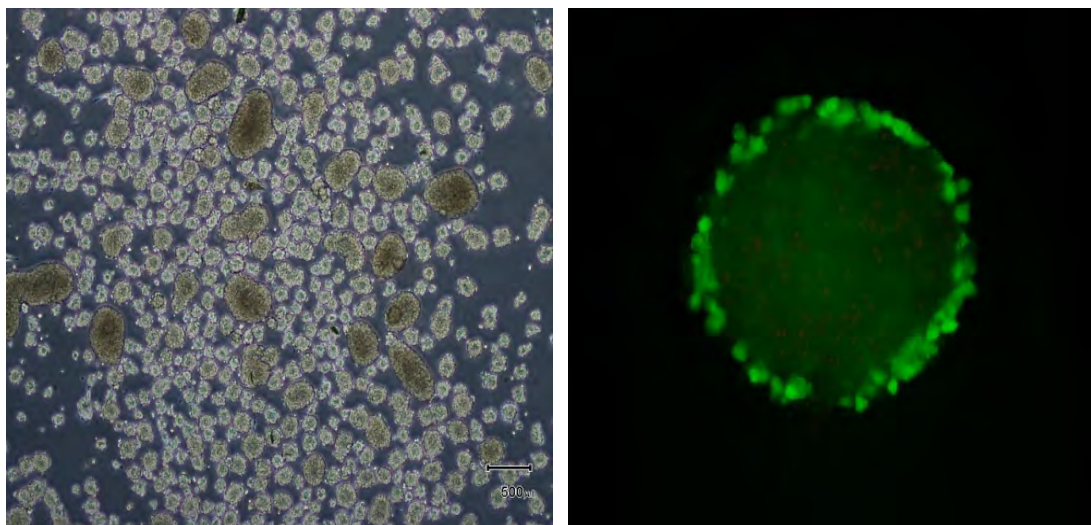
ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ที่เก็บมาทั้งจากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมัน มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ โดยตรวจสอบจากการรูปร่างที่คล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (ภาพที่ 1) แสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ชนิด CD 34 CD 44 และ CD 90 (ตารางที่ 1) และสามารถเจริญเปลี่ยนแปลงให้เป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลางได้ เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในน้ำยากระตุ้นให้เป็นเซลล์ประสาท (pre-neuronal differentiation) พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ในลักษณะของนิวโรสเฟียร์ (neurosphere) ไม่พบความแตกต่างของความหนาแน่นของเซลล์ที่เลี้ยงต่อลักษณะการเกาะกลุ่มของนิวโรสเฟียร์ และมีความคล้ายคลึงกันระหว่างเซลล์ MSC จากไขกระดูกและจากเนื้อเยื่อไขมัน เมื่อทำการย่อยเซลล์ออกจาก neurosphere เพื่อตรวจปริมาณเซลล์มีชีวิต เซลล์ของ neurosphere มีร้อยละของเซลล์มีชีวิตรอดสูง (ภาพที่ 2) โดยไม่พบความแตกต่างของปริมาณเซลล์มีชีวิตทั้งจากแหล่งที่มาของเซลล์ MSCs และความหนาแน่นของเซลล์ที่ใช้เลี้ยง เมื่อทำการกระตุ้นให้เซลล์เจริญพัฒนาให้เป็นเซลล์ประสาทด้วยน้ำยาที่มีส่วนประกอบของ ออล ทราน เรตินิล (*all-trans* retinol) และ โกรทแฟกเตอร์ ชนิด อีพีเดอร์มอล และ เบสิคไฟโบรบลาสต์ พบว่าเซลล์เปลี่ยนลักษณะรูปร่าง จากเซลล์ที่มีหัวและปลายแหลมคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ให้เป็นเซลล์ที่มีการยื่นแขนงหลายทิศทาง (multiple process) คล้ายเซลล์ประสาท จากการศึกษาเปรียบเทียบกับแสดงออกของโปรตีน beta III tubulin, NeuN และ nestin (ภาพที่ 3) พบว่าเซลล์ MSCs ที่เก็บจากไขกระดูกมีแนวโน้มที่จะประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ประสาทสูงกว่า เมื่อเทียบกับเซลล์ MSCs ที่เก็บจากเนื้อเยื่อไขมัน และเซลล์ประสาทส่วนใหญ่ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นเซลล์ประสาทชนิดแอสโตรไซต์ (ภาพที่ 4)



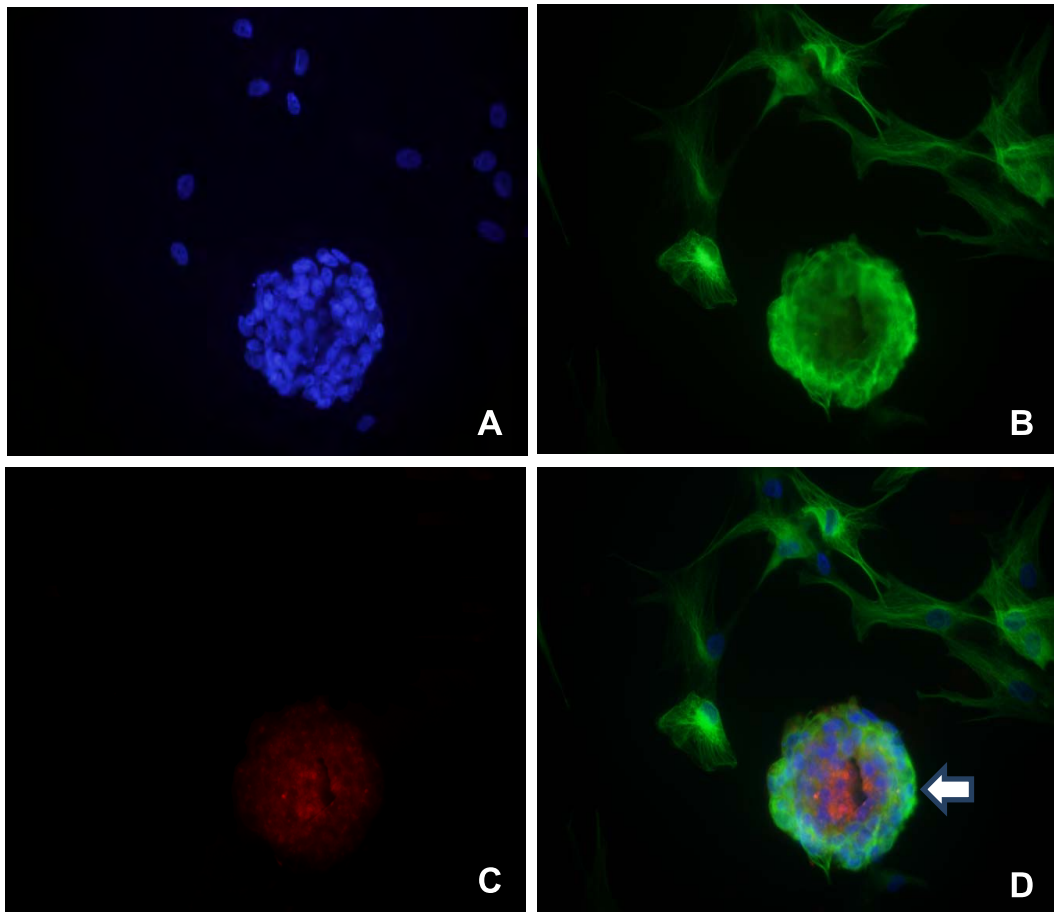
ภาพที่ 1 แสดงภาพตัวอย่างลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ มีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ตารางที่ 1 แสดงผลสรุปการตรวจการแสดงออกของโปรตีนผิวเซลล์ชนิด CD 44 และ CD 90 ด้วยโฟลว์ไซโตเมทรี (flow cytometry)

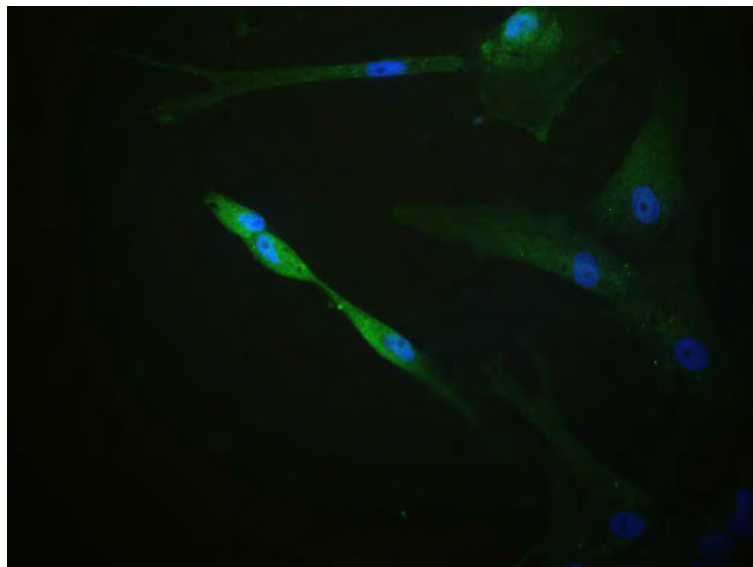
แหล่งที่มาของเซลล์	เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ให้ผลบวก ต่อ CD 44	เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ให้ผลบวก ต่อ CD 90
Bone marrow MSC dog 1	98.8	67.8
Bone marrow MSC dog 2	95.0	39.2
Bone marrow MSC dog 3	97.7	79.9
Bone marrow MSC dog 4	93.3	81.3
Adipose tissue MSC dog 1	97.4	95.1
Adipose tissue MSC dog 2	99.4	80.4
Adipose tissue MSC dog 3	99.8	82.8
Adipose tissue MSC dog 4	99.5	88.8
ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (mean $\pm$ SD)	97.6 ± 2.3	76.9 ± 17.1



ภาพที่ 2 แสดง neurosphere (ซ้าย) ภายหลังการเลี้ยงในน้ำยากระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์พัฒนาเป็นเซลล์ประสาท โดยเซลล์ที่อยู่ภายใน neurosphere (ขวา) มีจำนวนเซลล์มีชีวิตสูง (เซลล์ยังคงมีการทำงานของเอ็นไซม์ เอสเตอร์เรส)



ภาพที่ 3 แสดงการแสดงออกของโปรตีนของ neurosphere (ลูกศร) และเซลล์ประสาท ภาพ A: แสดงนิวเคลียสของ neurosphere ย้อมด้วย DAPI (สีน้ำเงิน) ภาพ B: การแสดงออกของ beta III tubulin (สีเขียว) และ nestin (สีแดง ภาพ C) ภาพ D แสดงการรวมภาพ (merged image) ของการแสดงออกโปรตีนใน neurosphere



ภาพที่ 4 แสดงการแสดงออกของโปรตีน Glial fibrillary acidic protein (GFAP) (สีเขียว) ของเซลล์ประสาทที่ผลิตจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก นิวเคลียสของเซลล์ย้อมด้วย DAPI (สีน้ำเงิน)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์พิเศษที่มีลักษณะเฉพาะในการเพิ่มจำนวน (self-renewal) และมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเซลล์เป็นเซลล์หลายๆชนิด เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนสามารถเก็บได้จากกลุ่มเซลล์ (inner cell mass) ที่อยู่ภายในตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส มีคุณสมบัติพิเศษในการเจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่จำกัด (self-renewal) และสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะเซลล์เนื้อเยื่อชั้นนอก ชั้นกลาง และชั้นในของตัวอ่อนเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อฟัตส์และสัต์ว์เต็มวัย (fetal and adult stem cells) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับการศึกษาอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีแนวโน้มที่จะถูกนำไปใช้รักษาโรคในลักษณะเซลล์หรือเนื้อเยื่อบำบัด (cell- or tissue engineering- based therapy) นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหาจริยธรรมการใช้ตัวอ่อนลดการต่อต้านเนื้อเยื่อภายหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ (tissue transplantation) และลดปัญหาที่เกิดจากการเจริญอย่างผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดจนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (tumorigenesis)

เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอล (mesenchymal stem cells: MSCs) สามารถเก็บได้จากเนื้อเยื่อหลายๆชนิด โดยเฉพาะของเหลวในโพรงกระดูกหรือไขกระดูก (bone marrow aspirate) และเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) เซลล์ MSCs สามารถเลี้ยงเพิ่มจำนวนในจานเพาะเลี้ยงและมีความสามารถในการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์หลายชนิด โดยเฉพาะเซลล์กระดูก กระดูกอ่อน และไขมันเมื่อได้รับการกระตุ้นอย่างเหมาะสม อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าเซลล์ MSCs สามารถพัฒนาข้ามกลุ่มเนื้อเยื่อ (transdifferentiation) ได้ แต่ผลที่ได้ยังไม่มีความแน่นอน เนื่องจากมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ความบริสุทธิ์ของเซลล์ MSCs ที่ใช้ และการหลอมเซลล์กับเซลล์โฮสต์ ตัวอย่างของเซลล์ที่สามารถกระตุ้นให้เจริญจากเซลล์ MSCs เช่น เซลล์กล้ามเนื้อโครงร่าง กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์ตับ และเซลล์ประสาท คุณสมบัติดังกล่าวของ MSCs ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางทั้งในมนุษย์และในสัตว์ จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์ MSCs พบว่าเซลล์ MSCs สามารถแสดงออกยีนที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการพัฒนาของเซลล์ประสาท (neuronal gene expression) ดังนั้นเซลล์ MSCs จึงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่น่าจะสามารถนำมาใช้ในการผลิตเซลล์ประสาทในจานทดลอง เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับขั้นตอนการพัฒนาของเซลล์ประสาท การใช้เซลล์ประสาทในการทดสอบยา รวมถึงการใช้ MSCs และการพัฒนาให้เป็นเซลล์ประสาทเพื่อใช้ในเซลล์บำบัด เช่นกรณีโรค Parkinson's และความผิดปกติของทางเดินประสาทด้วยสาเหตุอื่นๆ การศึกษาการพัฒนาของเซลล์ประสาทในสัตว์สามารถใช้เป็นต้นแบบการศึกษาระบบประสาทในมนุษย์ได้

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นหน่วยงานที่ให้บริการรักษาสัตว์ป่วย ซึ่งในปัจจุบันมีจำนวนสัตว์ที่เข้ามารับบริการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะสุนัขและแมว สุนัขจำนวนหนึ่งมีปัญหาทางระบบประสาทเช่น สุนัขที่ประสบอุบัติเหตุและกระดูกสันหลังหัก (dislocation of spinal cord) หรือมีปัญหาของการเสื่อมของระบบประสาทเนื่องมาจากโรคติดเชื้อบางชนิด ในบางกรณีสัตวแพทย์ไม่สามารถรักษาสัตว์ป่วยดังกล่าวด้วยวิธีการรักษาแบบดั้งเดิม ดังนั้นการศึกษาวิธีการรักษาด้วยเซลล์บำบัดโดยการเพาะเลี้ยง MSCs เพื่อพัฒนาให้เป็นเซลล์ประสาทและนำมาเพื่อทดแทนเซลล์ที่เสียหาย/เสื่อมจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการรักษาโรคของระบบประสาทในสัตว์ โดยเฉพาะในกรณีที่ไม่สามารถรักษาด้วยวิธี

ปกติ (conventional treatment) หรืออาจใช้เซลล์บำบัดร่วมกับการรักษาด้วยวิธีอื่นๆ อย่างไรก็ตามวิธีการศึกษาขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ MSCs ให้เป็นเซลล์ประสาทค่อนข้างซับซ้อนเนื่องจากยังไม่ทราบปัจจัยที่จำเพาะในการกระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนแปลง ขาดความบริสุทธิ์ของเซลล์ และประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทยังอยู่ในระดับต่ำ

เซลล์ต้นกำเนิดเป็นเซลล์ที่มีการศึกษามากที่สุดในช่วงสิบปีที่ผ่านมาเนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติพิเศษกว่าเซลล์ทั่วไปในร่างกาย โดยเฉพาะคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนอย่างไม่จำกัด (self-renewal) และมีความสามารถในการคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดภายหลังการเพิ่มจำนวน (undifferentiated stage/stemness) นอกจากนี้เซลล์ดังกล่าวสามารถถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนสภาพและเจริญเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ ของร่างกายได้เมื่อได้รับการกระตุ้นและสภาพแวดล้อมการเลี้ยงเซลล์เหมาะสม (Evans and Kaufman, 1981; Thomson and Marshall, 1998) จากคุณสมบัติดังกล่าวของเซลล์ต้นกำเนิด เซลล์ชนิดนี้จึงเป็นเซลล์ที่ถูกคาดหวังว่าจะสามารถนำมาใช้เพื่อการศึกษากลไกการพัฒนาของเซลล์ชนิดต่างๆ รวมถึงการนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ในการรักษามนุษย์หรือสัตว์ป่วย (Bongso et al., 2008; Hiyama et al., 2008) เซลล์ต้นกำเนิดในปัจจุบันถูกจำแนกออกเป็น 2 ชนิดตามแหล่งที่มาของเซลล์ต้นกำเนิดได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (embryonic stem cells) และเซลล์ต้นกำเนิดจากมนุษย์/สัตว์เต็มวัย (adult stem cells) เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนและเจริญเป็นเซลล์ต่างๆ ของร่างกายได้ (pluripotency) มากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากมนุษย์หรือสัตว์เต็มวัย (adult stem cells) โดยส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการเจริญเป็นเซลล์ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (multipotency) เช่น เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ เป็นเซลล์ต้นกำเนิดในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลางสามารถเจริญเป็นเนื้อเยื่อชั้นกลางได้ดีเช่น กระดูก กระดูกอ่อน และเนื้อเยื่อไขมัน (Jiang et al., 2002; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997) อย่างไรก็ตามองค์ความรู้ในปัจจุบันพบว่า adult stem cells บางชนิดสามารถเจริญเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อที่ต่างกันได้ (transdifferentiation) ยกตัวอย่างเช่น MSCs สามารถเจริญเป็นเซลล์ประสาท (Woodbury et al., 2000) และเซลล์ตับ (Ong et al., 2006) ซึ่งเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นนอกและชั้นในตามลำดับ

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cells; MSCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้รับการศึกษาอย่างมาก เพราะนอกจากจะมีคุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดแล้ว เซลล์เหล่านี้ยังมีความสามารถในการกระตุ้นการซ่อมแซมของเซลล์/อวัยวะ รวมทั้งมีคุณสมบัติลดการอักเสบและการต่อต้านของระบบภูมิคุ้มกัน (Ganea et al., 2006; Greco and Rameshwar 2007) MSCs เป็นเซลล์ที่สามารถเก็บได้จากเนื้อเยื่อหลายชนิดเช่น สายสะดือ น้ำในข้อ (synovium) เนื้อเยื่อไขมัน เลือด โพรงฟัน โพรงกระดูก และน้ำคร่ำ (Musina et al., 2005) เซลล์ MSCs ในงานเพาะเลี้ยงมีลักษณะคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีคุณสมบัติในการสร้าง adhere molecule ทำให้สามารถเกาะจานเลี้ยงพลาสติก มีการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวเซลล์หลายชนิด โดยในปัจจุบันยังไม่ทราบโปรตีนจำเพาะต่อเซลล์ MSCs การคัดเลือกและการทำให้เซลล์ MSCs บริสุทธิ์จึงขึ้นกับการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวเซลล์หลายชนิดร่วมกัน ซึ่งโดยปกติ MSCs จะให้ผลบวกต่อ CD 29, CD 44, CD 90, CD 105, CD106, CD166, STRO-1, SSEA-1 (Jiang et al., 2002; Prockop, 1997) และให้ผลลบต่อเซลล์ในกลุ่ม hemopoietic stem cells (CD 34 และ CD 45) อย่างไรก็ตามการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวเซลล์อาจมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ความหลากหลายของโปรตีนที่ผิวเซลล์มีส่วนทำให้เซลล์ MSCs ขาดความบริสุทธิ์และลดประสิทธิภาพการนำเซลล์ไปใช้ทางคลินิก

(Gregory et al., 2005) การศึกษาการเปลี่ยนเซลล์ MSCs เป็นเซลล์ประสาทในช่วงต้นนั้นเป็นการศึกษาในลักษณะการเติมสารบางชนิดลงไปให้น้ำยาเลี้ยงเซลล์โดยเฉพาะการใช้สารที่เพิ่มปริมาณ cyclic AMP เช่น isobutylmethylxanthine (IBMX: Deng et al., 2001) หรือ Butylated hydroxyanisole (Woodbury et al., 2000) ทำให้เซลล์ MSCs มีลักษณะคล้ายเซลล์ประสาท (neuron-like cells) เซลล์เหล่านี้ยังสามารถแสดงออกโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ประสาทหลายชนิดเช่น nestin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), neurofilament heavy chain (NF-H), and β -III tubulin อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนรูปร่างของ MSCs อย่างรวดเร็วและการกลับคืนสภาพของเซลล์ MSCs ภายหลังมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ประสาททำให้ทราบว่าเทคนิคการกระตุ้นเซลล์ดังกล่าวไม่สามารถเปลี่ยน MSCs เป็นเซลล์ประสาทที่แท้จริงได้ แต่การเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์คล้ายเซลล์ประสาทเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โครงร่างหรือ แอคติน ไมโครฟิลาเมนต์ (actin microfilament) อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนเซลล์ MSCs เป็นเซลล์ประสาทมีความสำคัญอย่างยิ่ง ทั้งในทางการศึกษาวิจัยกลไกการเจริญของเซลล์ประสาท พัฒนาการของเซลล์และการนำเซลล์ประสาทมาใช้ในการรักษาเชิงเซลล์หรือเนื้อเยื่อบำบัด ในปัจจุบันมีรายงานการสร้างเซลล์ประสาทจากเซลล์ MSCs โดยเซลล์ที่ได้มีลักษณะคล้ายเซลล์ประสาท มีการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ประสาท หรือแม้กระทั่งเซลล์ที่มีการเคลื่อนที่ของประจุไฟฟ้า (action potential) รวมถึงสามารถสร้างสารสื่อประสาทบางชนิดเช่น โดพามีน (Dopamine) นอกจากนี้การย้ายฝากเซลล์ MSCs ในสัตว์ เช่น สุนัขและหนูยังให้ผลการรักษาโรคของเซลล์ประสาทที่มีแนวโน้มจะสามารถนำมาใช้รักษาโรคของมนุษย์ได้ นอกจากนี้คุณสมบัติที่เซลล์ MSCs สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ประสาทแล้ว เซลล์ MSCs เองยังมีคุณสมบัติอื่นๆที่น่าสนใจเช่น มีคุณสมบัติในการผลิต Neurotrophic factors (NTFs) ที่ช่วยในการพัฒนาและป้องกันการตายของเซลล์ประสาท ช่วยสร้างเซลล์ประสาทใหม่ (Chen et al., 2002; Mahmood and Chopp, 2004) สามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่เซลล์ประสาทเสียหาย เช่นในสมอง ซึ่งในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจนแต่คาดว่าจะเกิดจาก chemokines บางชนิดเช่น stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1a) (Li et al., 2001; Stumm et al., 2002)

การศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ในสุนัขมีอยู่อย่างจำกัด MSCs ของสุนัขสามารถเก็บได้จากเนื้อเยื่อหลายชนิด ได้แก่ สายสะดือ (Lim et al., 2008; Zucconi et al., 2009) เนื้อเยื่อไขมัน (Neupane et al., 2008; Black et al., 2008) ไชกระดูก (Arinze, 2003; Csaki et al., 2008; Hiyaama et al., 2007) โดยเซลล์ MSCs จากสุนัขมีลักษณะคล้ายเซลล์ MSCs จากสัตว์ชนิดอื่นๆ และคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงเซลล์เป็นเซลล์ต่างๆ ได้ เช่น เซลล์กระดูก (osteoblast) เซลล์ไขมัน และเซลล์กระดูกอ่อน (Csaki et al., 2007) การศึกษาเซลล์ MSCs ในสุนัขที่ผ่านมาเป็นการศึกษาเกี่ยวกับวิธีการเก็บเซลล์ MSCs การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ และการกระตุ้นให้เซลล์ MSCs เจริญเป็นเซลล์กระดูก กระดูกอ่อน เพื่อใช้ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เซลล์ดังกล่าวในการรักษาโรคของกระดูกและข้อ อย่างไรก็ตามการศึกษาโดยการย้ายฝากเซลล์ MSCs สามารถช่วยรักษาสุนัขที่มีปัญหาการบาดเจ็บไขสันหลัง (spinal cord injury) ได้ (Jung et al., 2009) อย่างไรก็ตามถึงแม้จะไม่สามารถสรุปได้ว่าเซลล์ MSCs ที่ย้ายฝากมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ MSCs เป็นเซลล์ประสาทในสุนัขได้จริง ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของเซลล์ MSCs จากไขกระดูกและไขมันสุนัข ในการถูกกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ให้เป็น

เซลล์ประสาท โดยการศึกษาครั้งนี้อาจช่วยให้ทราบถึงโอกาสการใช้เซลล์ MSCs เพื่อบำบัดโรค และอาจเป็นนวัตกรรมทางสัตวแพทย์ในการรักษาโรคทางระบบประสาทในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Arinzech, T.L., Peter, S.J., Archambault, M.P., van den Bos, C., Gordon, S., Kraus, K., Smith, A. and Kadiyala, S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am.* 2003. 85: 1927-1935.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S. et al. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. *Stem Cell.* 2001. 19: 180–192.
- Bongso, A., Fong C.Y. and Gauthaman K. Taking stem cells to the clinic: Major challenges. *J. Cell. Biochem.* 2008. 105: 1352-1360.
- Csaki, C., Matis, U., Mobasheri, A., Ye, H. and Shakibaei, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol.* 2007. 128(6): 507-520.
- Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I. and Prockop, D.J., In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Com.* 2001. 282: 148-152
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981. 292: 154–156.
- Ganea, D., Gonzalez-Rey, E. and Delgado, M. A novel mechanism for immunosuppression: from neuropeptides to regulatory T cells. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006 1: 400-409.
- Greco, S.J. and Rameshwar, P. Enhancing effect of IL-1alpha on neurogenesis from adult human mesenchymal stem cells: implication for inflammatory mediators in regenerative medicine. *J Immunol.* 2007. 179: 3342-3350.
- Gregory, C.A., Ylostalo, J. and Prockop, D.J. Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: A two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Sci STKE.* 2005: 37
- Hiyama, A., Mochida, J., Iwashina, T., Omi, H., Watanabe, T., Serigano, K., Tamura, F. and Sakai D. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res.* 2008. 26(5): 589-600.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E. and Keene, C.D.

Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2000. 418: 41–49.

Jung, D.I., Ha, J., Kang, B.T., Kim, J.W., Quan, F.S., Lee, J.H., Woo, E.J., Park, H.M. A

comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J Neurol Sci.* 2009. 285(1-2): 67-77.

Li, Y., Chen, J., Wang, L., Zhang, L., Lu, M. and Chopp, M. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2001. 316: 67-70.

Li, Y., Chen, J., Chen, X.G., Wang, L., Gautam, S.C. and Xu, Y.X. et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology.* 2002. 59: 514-523.

Lim, J.H., Byeon, Y.E., Ryu, H.H., Jeong, Y.H., Lee, Y.W., Kim, W.H., Kang, K.S. and Kweon, O.K. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *J Vet Sci.* 2007. 8(3): 275-282.

Mahmood, A., Lu, D. and Chopp, M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. *Neurosurgery.* 2004. 55: 1185-1193.

Musina, R.A., Bekchanova, E.S and Sukhikh, G.T. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med.* 2005. 139(4): 504-509.

Neupane, M., Chang, C.C., Kiupel, M. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2008 14(6):1007-1015.

Ong, S.Y., Dai, H. and Leong, K.W. Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. *Biomaterials.* 2006. 27: 4087-4097.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999. 284:143–147.

Prockop, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997: 71–74.

Stumm, R.K., Rummel, J., Junker, V., Culmsee, C., Pfeiffer, M. and Kriegelstein, J. A. et al. dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective

regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J Neurosci*. 2002 22: 5865-5878.

Thomson, J.A. and Marshall, V.S. Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev. Biol*. 1998. 38: 133–165.

Williams, J.T., Southerland, S.S., Souza, J. et al. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*. 1999. 65: 22–26.

Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. and Black, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000. 61: 364–370.

Zucconi, E., Vieira, N.M., Bueno, D.F., Secco, M., Jazedje, T., Ambrosio, C.E., Passos-Bueno, M.R., Miglino, M.A. and Zatz, M. Mesenchymal Stem Cells Derived from Canine Umbilical Cord Vein - A Novel Source for Cell Therapy Studies. *Stem Cells Dev*. 2010. 19 (3): 395-402.

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อทำการเก็บเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากของเหลวในโพรงไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันสำหรับใช้ในการศึกษาวิธีการเก็บ วิธีการเลี้ยงและการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยง
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่มาจากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ประสาท

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้สุนัข อายุระหว่าง 1-5 ปี จำนวน 3-6 ตัว โดยเป็นสุนัขที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงไม่เป็นโรคติดต่อ และได้รับการตรวจเลือดก่อนนำมาใช้ การเลี้ยงและการดูแลสุนัขในขณะที่ทำการศึกษาได้ดำเนินงานตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การเก็บตัวอย่างไขกระดูกและการคัดแยกเซลล์

เก็บตัวอย่างในกระดูกของสุนัขที่ได้รับการวางยาสลบแบบทั้งตัว แล้วทำความสะอาดบริเวณสะโพกตามขั้นตอนปราศจากเชื้อทางศัลยกรรม ใช้มีดกรีดผิวหนังบริเวณ wing of ilium เก็บตัวอย่างเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกโดยใช้เข็มสำหรับเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ (bone marrow biopsy needle) ทำการดูดเก็บของเหลวในโพรงกระดูกจำนวน 5-10 มิลลิลิตร ลงในหลอดฉีดยาที่ใส่ยาป้องกันการแข็งตัวของเลือด (heparinized syringe) นำของเหลวจากโพรงกระดูกไปแยกเซลล์ด้วย Histoplaque ® (Sigma) ที่มี

ความเข้มข้นต่างๆกัน ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 400 g นาน 30 นาที เพื่อคัดกรองเซลล์นิวเคลียสเดี่ยว (mononuclear cells) ออกจากเม็ดเลือดแดง

3.3 การเก็บเนื้อเยื่อไขมันและการคัดแยกเซลล์ Adipose-MSCs (A-MSCs)

การเก็บเนื้อเยื่อไขมันจะกระทำในสุนัขตัวเดียวกับที่ใช้สำหรับเก็บของเหลวในโพรงกระดูก ทำการตัด เนื้อเยื่อไขมันบริเวณสะโพกขนาดประมาณ 3x3 เซนติเมตร ทำการตัดย่อยไขมันด้วยกรรไกรร่วมกับการใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) ที่ความเข้มข้น 0.075 % ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-45 นาที นำของเหลวที่ได้นำมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 100 และ 40 ไมครอนตามลำดับ ทำการปั่นที่ 1500 รอบต่อนาทีเพื่อแยกเซลล์ และนำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงต่อในจานเพาะเลี้ยง

3.4 การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์

เซลล์ต้นกำเนิด MSCs จะถูกเลี้ยงในน้ำยา Delbecco's phosphate buffered saline ที่มีปริมาณ น้ำตาลกลูโคส 1 g/L, 2 mM L-glutamine, 10% (v/v) fetal calf serum และยาปฏิชีวนะ ในตู้อบชนิด 5% CO₂ อุณหภูมิ 37.0 °C ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน ทำการเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติก จนกระทั่งเซลล์แผ่กระจายประมาณ 80% confluence จึงทำการย่อยเซลล์ให้หลุดจากจานเพาะเลี้ยงด้วย 0.05% trypsin

3.5 การตรวจคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด

ทำการตรวจคุณสมบัติต่างๆ ของเซลล์ MSCs ได้แก่

- 1) คุณสมบัติในการเกาะจานเพาะเลี้ยงพลาสติก
- 2) การให้ผลบวกของโปรตีนบนผิวเซลล์ ได้แก่ CD 44 และ CD 90
- 3) การให้ผลลบของโปรตีนบนผิวเซลล์ ได้แก่ CD 34
- 4) คุณสมบัติในการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเซลล์เป็นเซลล์ในกลุ่มของเนื้อเยื่อชั้นกลาง (mesoderm) ได้แก่ เนื้อเยื่อไขมัน กระดูก และกระดูกอ่อน

3.6 การตรวจโปรตีนบนผิวเซลล์ด้วย flow cytometer

ทำการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนบนผิวเซลล์ ได้แก่ CD 34, CD 44 และ CD 90

และตรวจการเรืองแสงของเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของกลุ่มเซลล์ที่ใช้ในการวิจัย

3.7 การกระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลางและการตรวจคุณสมบัติของเซลล์ ภายหลังการเลี้ยงเซลล์ให้ได้ confluence ประมาณ 70-80% นำเซลล์ที่ได้มากระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงน้ำยาที่ใช้ในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ให้เป็นเซลล์ชนิดต่างๆ

ชนิดของเซลล์	น้ำยาสำหรับกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์
เซลล์ไขมัน	0.1 mg/ml insulin , 10mM sodium pyruvate, 1mM methyl isobutylxanthine, 1μM dexamethasone and 0.2 mM Indomethacin
เซลล์กระดูก	100 nM dexamethasone, 50 μM ascorbate-2 phosphate, 10 mM beta glycerophosphate
เซลล์กระดูกอ่อน	10 ng/ml TGF- β 1, 100 nM dexamethasone, 0.1 mM ascorbate-2 phosphate

3.8 การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ภายหลังการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์

การทดสอบคุณลักษณะของเซลล์ภายหลังการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์สามารถทำได้โดยการย้อมสีพิเศษที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อหรือเซลล์ชนิดนั้นๆ หรือใช้เทคนิคทางอนุชีวโมเลกุลในการตรวจ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 วิธีการตรวจที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อหรือเซลล์ภายหลังกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เปลี่ยนแปลง (differentiation)

ชนิดของเซลล์	วิธีการตรวจคุณสมบัติของเซลล์
เซลล์ไขมัน	Oil Red O positive staining, PPAR γ 2 gene expression
เซลล์กระดูก	Von Kossa positive staining, osteocalcin gene expression
เซลล์กระดูกอ่อน	Alcian blue staining positive staining, collagen type II gene expression

3.9 การกระตุ้นให้เซลล์เจริญเป็นเซลล์ประสาท

นำเซลล์ MSCs ใน passage ที่ 3 มาตรวจหาความบริสุทธิ์ของเซลล์จากโปรตีนบนผิวเซลล์ และนำไปใช้ในการศึกษาการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของ MSCs ทั้งสองชนิดให้เป็นเซลล์ประสาท โดยทำการ

กระตุ้นเซลล์ MSCs ให้เป็นเซลล์ประสาทด้วยการกระตุ้นให้เจริญเป็นเซลล์ประสาท 2 รอบ (two-step neuronal differentiation) โดยการกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ประสาทครั้งที่ 1 เพื่อให้เกิดการสร้าง neurosphere และครั้งที่สอง ให้เกิดการพัฒนาสมบูรณ์ของเซลล์ประสาท ตามวิธีการของ (Shiri et al., 2009) ภายหลังจากย่อยเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยวแล้ว ทำการนับจำนวนเซลล์และใส่ในน้ำยากระตุ้นให้เกิดการสร้าง neurosphere ที่มีส่วนผสมของน้ำยา neurobasal, B27 supplement, 1% insulin-transferin-selenite (ITS), 20 ng/ml basic fibroblast growth factor และ 20 ng/ml epidermal growth factor เลี้ยงเซลล์ในน้ำยานี้เป็นเวลานาน 7 วัน นำเซลล์ที่เกาะกันเป็นก้อน neurosphere มาย่อยในเอ็นไซม์ทริปซิน (0.25%, w/v) นาน 2 นาที นำเซลล์ไปตรวจนับจำนวนเซลล์และร้อยละของเซลล์มีชีวิต เลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงที่เคลือบด้วย Poly-D-Lysine เลี้ยงเซลล์ในน้ำยาเหมือนในขั้นตอนที่ 1 แต่ไม่มีการใส่ basic fibroblast growth factor และ epidermal growth factor เพื่อให้เกิดการเจริญและพัฒนาสมบูรณ์ของเซลล์ประสาท เลี้ยงเซลล์ในน้ำยานี้ 5 วัน ในทุกกรณีทำการเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 2-3 วัน

8.10 การตรวจการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ประสาท

ทำการเลี้ยงเซลล์ประสาทตามวิธีข้างต้น ยกเว้นเลี้ยงเซลล์บนกระจกที่ผ่านการเคลือบ poly-D-Lysine ทำการตรึงเซลล์ด้วย 4% (w/v) paraformaldehyde นาน 5 นาที ก่อนการล้างด้วย phosphate buffered saline (PBS) อย่างน้อยสองครั้งก่อนทำการเก็บรักษาในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการย้อมสีเรืองแสงเพื่อแสดงการแสดงออกของโปรตีน ก่อนทำการย้อมสีทำการบล็อก non-specific binding ด้วย 0.3% bovine serum albumin ใน PBS โดยแอนติบอดีที่ใช้แสดงในตารางที่ 4

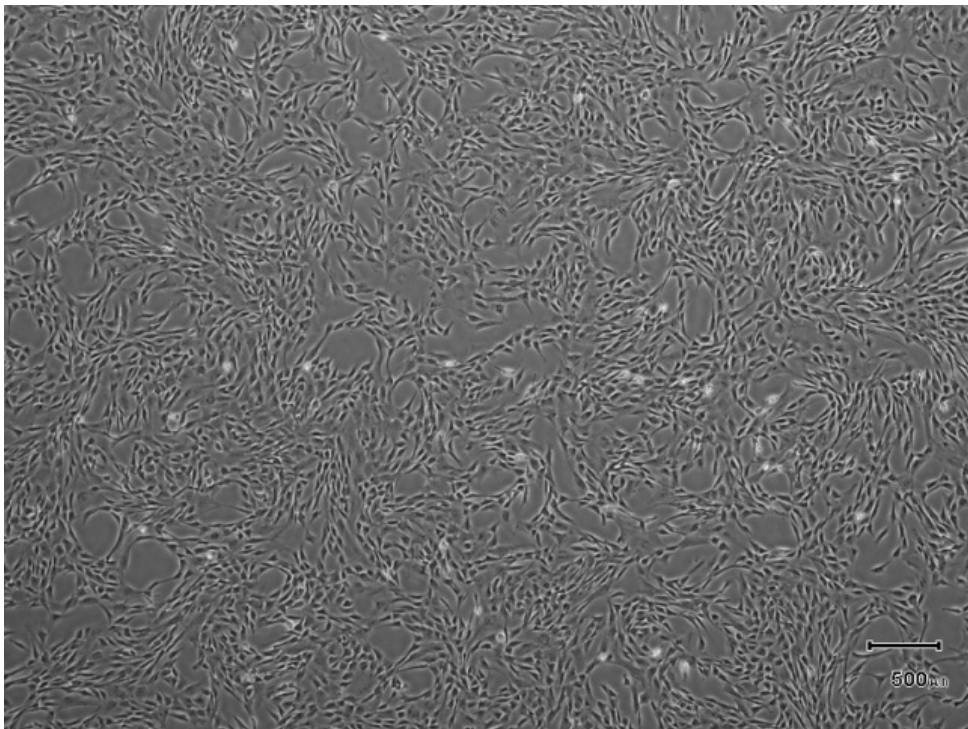
ตารางที่ 4 แสดงชนิดของแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษา

Primary antibody	Neuronal target
Nestin	an intermediate filament protein expressed by neural progenitor cells
Beta III tubulin	a neuron-specific marker that indicates the neuronal commitment
NeuN	a neuron-specific protein which is present in most neuronal cell types of vertebrates
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Astocyte marker
Oligodendrocyte Marker O1 (O1)	Oligodendrocyte marker

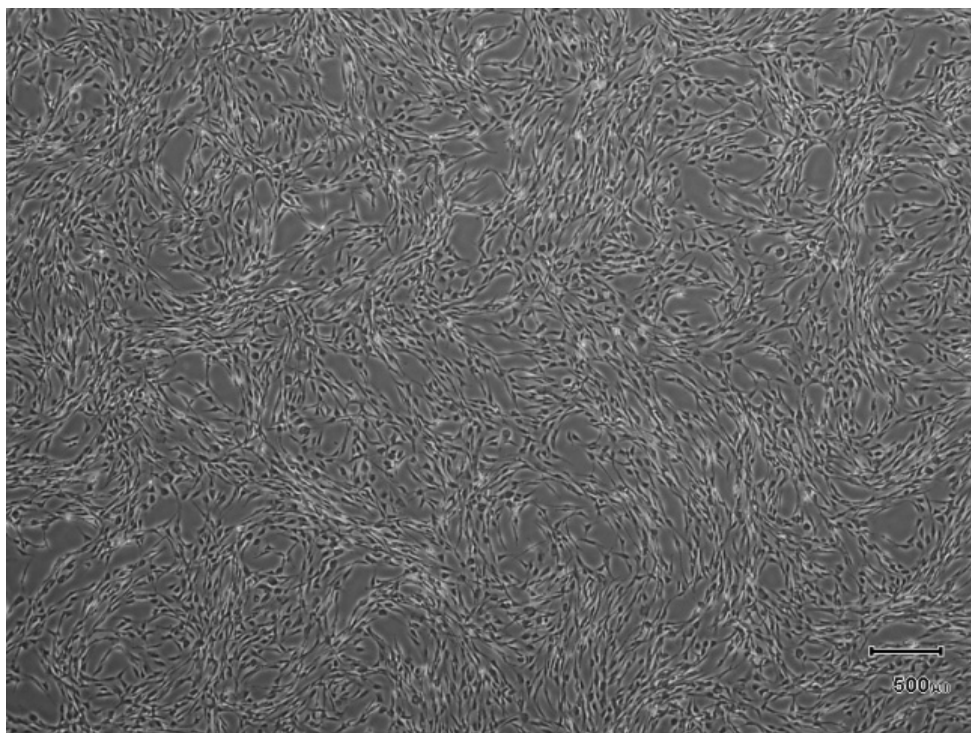
4. ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างเซลล์จากไขกระดูกของสุนัข พบว่าเทคนิคในการเพิ่มความบริสุทธิ์ของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ทำได้จากหลายวิธี ในการศึกษานี้เลือกใช้เทคนิคการเพิ่มความบริสุทธิ์ของเซลล์ด้วย

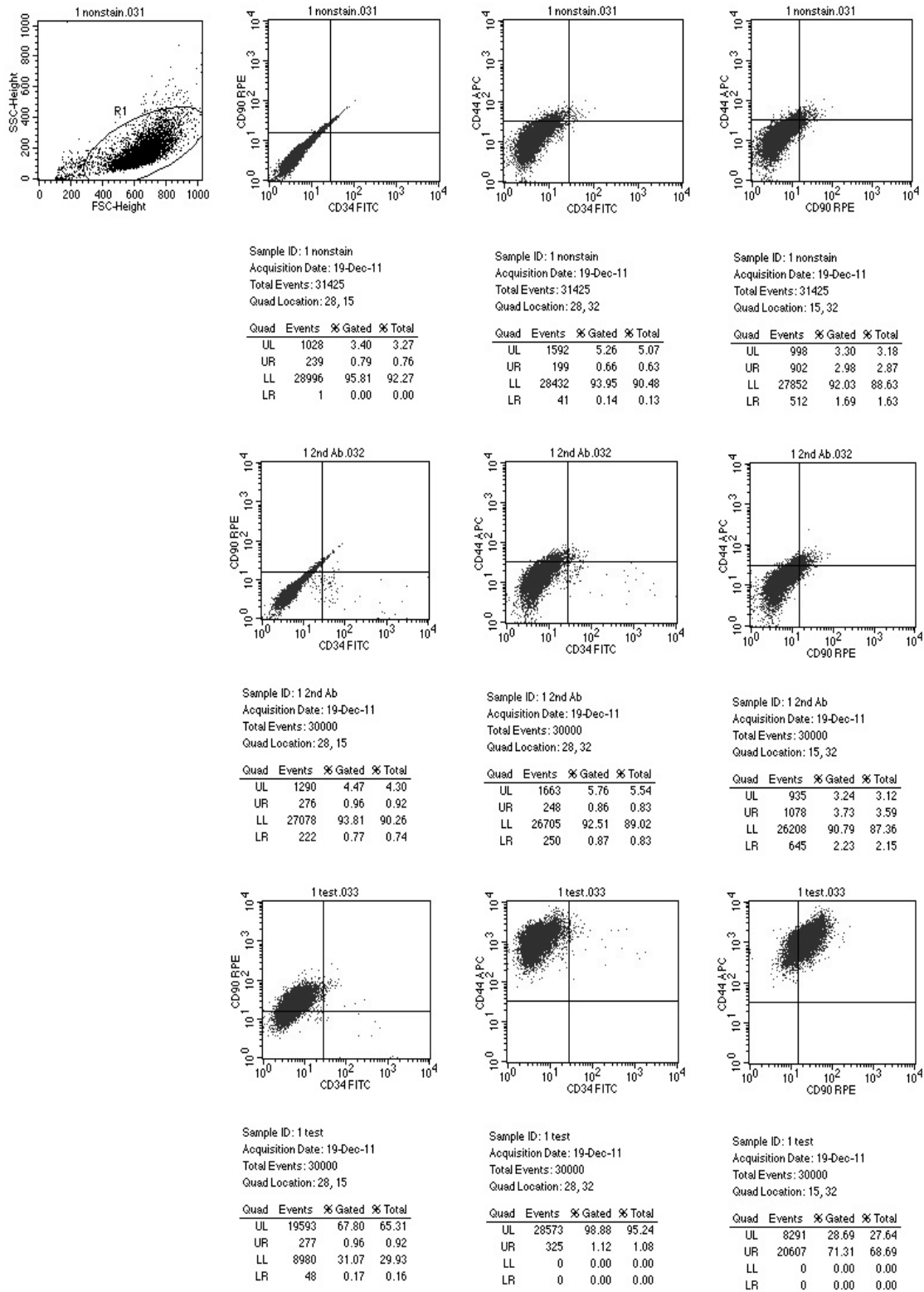
gradient density โดยสามารถให้จำนวนเซลล์สูงเมื่อทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 7 ของการเก็บตัวอย่างเซลล์ (จำนวนเซลล์ประมาณ $1.09 \pm 0.8 \times 10^6$ เซลล์) ส่วนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไขมันจากสุนัข (ตัวอย่างเก็บจากสุนัขตัวเดียวที่เก็บเซลล์จากไขกระดูก) เมื่อทำการย่อยชิ้นไขมันด้วยเอนไซม์ collagenase และทำการเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์พบว่า สามารถทำการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของเนื้อเยื่อไขมันได้ โดยเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่เก็บได้จากเนื้อเยื่อสองชนิดมีลักษณะคล้ายกัน คือมีลักษณะคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ดังภาพที่ 5 และ 6 แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากเซลล์ดังกล่าวมีลักษณะคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์จึงมีความจำเป็นต้องทำการตรวจคุณสมบัติของเซลล์ที่ได้ โดยการตรวจการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ โดยการศึกษาเลือกใช้ CD 44 และ CD 90 เพื่อเป็นมาร์คเกอร์บวก (positive markers) ของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ และใช้ CD 34 เป็น มาร์คเกอร์ลบ (negative marker) เนื่องจาก CD 34 เป็นมาร์คเกอร์ของการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดเลือด (hemopoietic stem cells) ซึ่งสามารถทำการเก็บได้จากไขกระดูกเช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์ไลน์ที่นำมาตรวจทั้งหมด มีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ในจำนวนที่สูง ผลการตรวจการแสดงออกของโปรตีน CD 34 CD 44 และ CD 90 ของเซลล์ที่เก็บได้จากไขกระดูกแสดงในภาพที่ 7, 8, 9 และ 10 และจากเนื้อเยื่อไขมัน แสดงในภาพที่ 11, 12, 13 และ 14



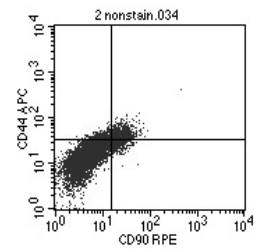
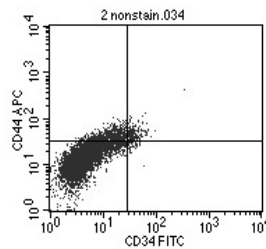
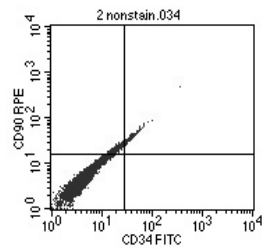
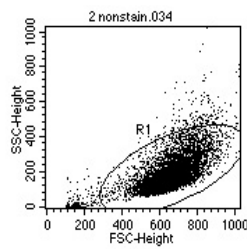
ภาพที่ 5 แสดงภาพตัวอย่างลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่เก็บจากไขกระดูกสุนัข มีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์



ภาพที่ 6 แสดงภาพตัวอย่างเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่เก็บจากเนื้อเยื่อไขมันของสุนัข



ภาพที่ 7 แสดงการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD 44 และ 90 ของเซลล์ที่เก็บจากไขกระดูกของสุนัขตัวที่ 1



Sample ID: 2 nonstain
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 15

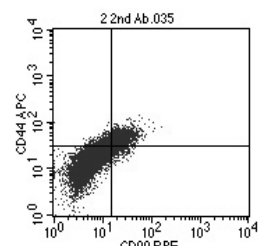
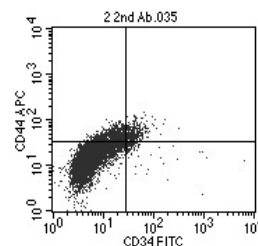
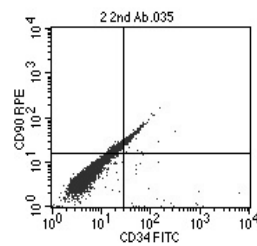
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2314	8.15	7.71
UR	1051	3.70	3.50
LL	25043	88.15	83.48
LR	0	0.00	0.00

Sample ID: 2 nonstain
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2811	9.90	9.37
UR	816	2.87	2.72
LL	24546	86.41	81.82
LR	235	0.83	0.78

Sample ID: 2 nonstain
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 15, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1475	5.19	4.92
UR	2309	8.13	7.70
LL	23362	82.24	77.87
LR	1262	4.44	4.21



Sample ID: 2 2nd Ab
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 15

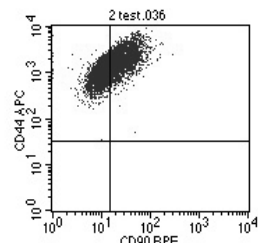
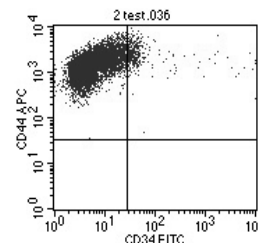
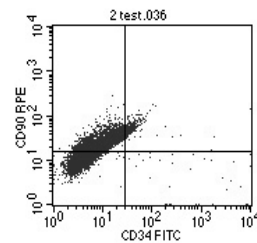
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2497	8.61	8.32
UR	1598	5.51	5.33
LL	24800	85.47	82.67
LR	121	0.42	0.40

Sample ID: 2 2nd Ab
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	3122	10.76	10.41
UR	1280	4.41	4.27
LL	24175	83.32	80.58
LR	439	1.51	1.46

Sample ID: 2 2nd Ab
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 15, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1608	5.54	5.36
UR	2953	10.18	9.84
LL	23109	79.64	77.03
LR	1346	4.64	4.49



Sample ID: 2 test
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 15

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	11404	39.24	38.01
UR	1333	4.59	4.44
LL	16219	55.81	54.06
LR	105	0.36	0.35

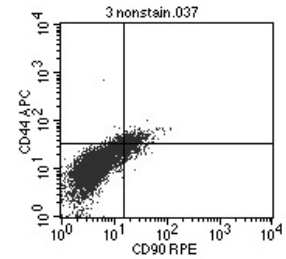
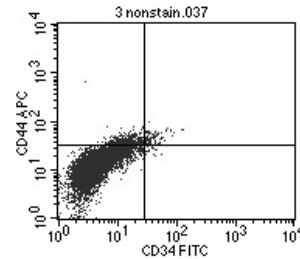
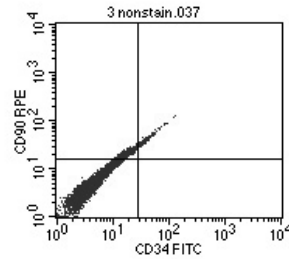
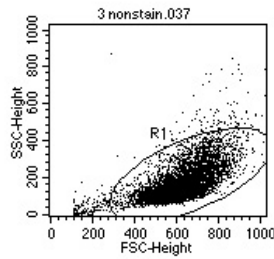
Sample ID: 2 test
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	27622	95.05	92.07
UR	1438	4.95	4.79
LL	1	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00

Sample ID: 2 test
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 15, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	15614	53.73	52.05
UR	13446	46.27	44.82
LL	1	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00

ภาพที่ 8 แสดงการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD 44 และ 90 ของเซลล์ที่เก็บจากไขกระดูกของสุนัขตัวที่ 2



Sample ID: 3 nonstain
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 15

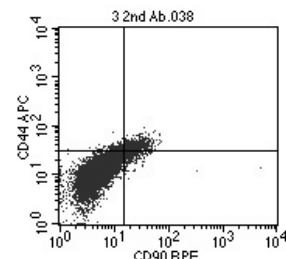
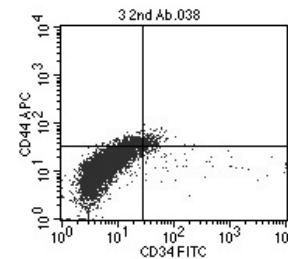
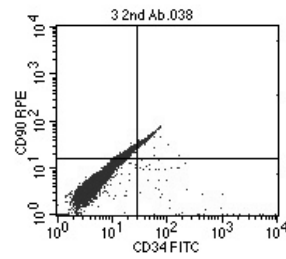
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2236	7.70	7.45
UR	578	1.99	1.93
LL	26241	90.31	87.47
LR	0	0.00	0.00

Sample ID: 3 nonstain
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1605	5.52	5.35
UR	413	1.42	1.38
LL	26872	92.49	89.57
LR	165	0.57	0.55

Sample ID: 3 nonstain
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 15, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	570	1.96	1.90
UR	1574	5.42	5.25
LL	25453	87.60	84.84
LR	1458	5.02	4.86



Sample ID: 3 2nd Ab
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 15

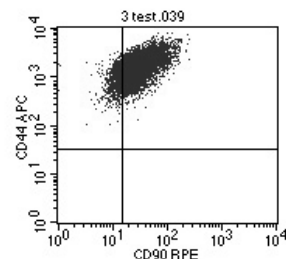
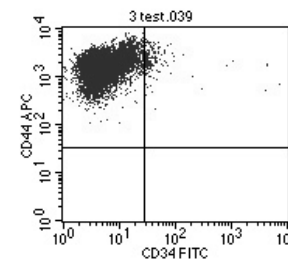
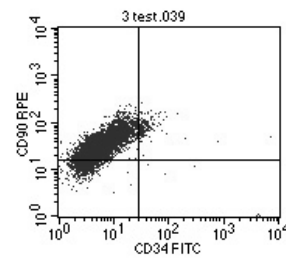
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2531	8.72	8.44
UR	762	2.63	2.54
LL	25552	88.05	85.17
LR	174	0.60	0.58

Sample ID: 3 2nd Ab
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1567	5.40	5.22
UR	584	2.01	1.95
LL	26516	91.37	89.39
LR	352	1.21	1.17

Sample ID: 3 2nd Ab
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 15, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	479	1.65	1.60
UR	1799	6.20	6.00
LL	24990	86.12	83.30
LR	1751	6.03	5.84



Sample ID: 3 test
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 15

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	23247	79.93	77.49
UR	645	2.22	2.15
LL	5161	17.75	17.20
LR	30	0.10	0.10

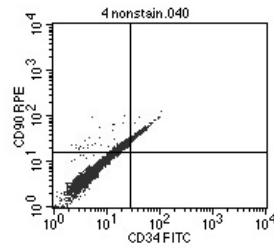
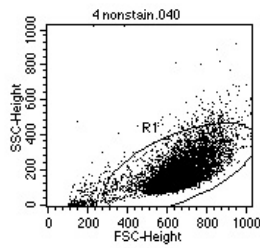
Sample ID: 3 test
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	28406	97.67	94.69
UR	675	2.32	2.25
LL	2	0.01	0.01
LR	0	0.00	0.00

Sample ID: 3 test
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 15, 32

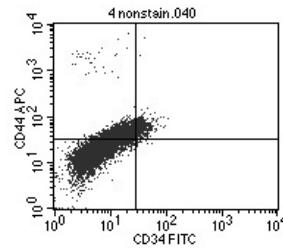
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	4610	15.85	15.37
UR	24471	84.14	81.57
LL	2	0.01	0.01
LR	0	0.00	0.00

ภาพที่ 9 แสดงการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD 44 และ 90 ของเซลล์ที่เก็บจากไขกระดูกของสุนัขตัวที่ 3



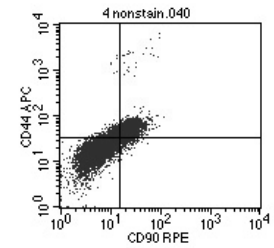
Sample ID: 4 nonstain
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 15

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	4380	15.59	14.60
UR	1623	5.78	5.41
LL	22086	78.63	73.62
LR	0	0.00	0.00



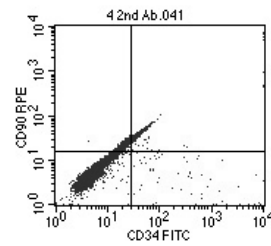
Sample ID: 4 nonstain
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	5849	20.82	19.50
UR	1514	5.39	5.05
LL	20617	73.40	68.72
LR	109	0.39	0.36



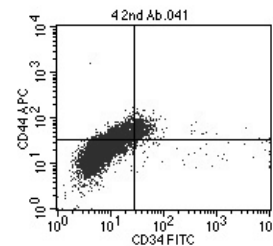
Sample ID: 4 nonstain
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 15, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2489	8.86	8.30
UR	5107	18.18	17.02
LL	19296	68.70	64.32
LR	1197	4.26	3.99



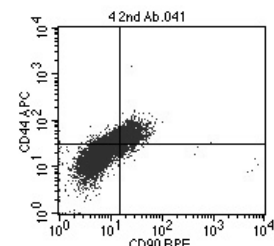
Sample ID: 4 2nd Ab
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 15

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	4171	15.01	13.90
UR	2009	7.23	6.70
LL	21320	76.73	71.07
LR	287	1.03	0.96



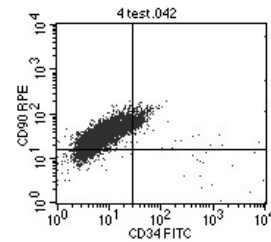
Sample ID: 4 2nd Ab
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	6243	22.47	20.81
UR	1956	7.04	6.52
LL	19248	69.27	64.16
LR	340	1.22	1.13



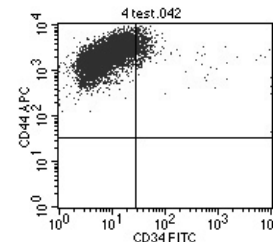
Sample ID: 4 2nd Ab
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 15, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	3079	11.08	10.26
UR	5368	19.32	17.89
LL	18237	65.63	60.79
LR	1103	3.97	3.68



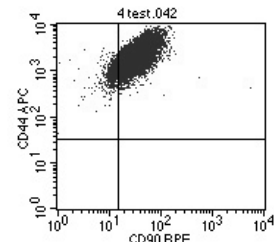
Sample ID: 4 test
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 15

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	22826	81.33	76.09
UR	1793	6.39	5.98
LL	3372	12.01	11.24
LR	74	0.26	0.25



Sample ID: 4 test
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 32

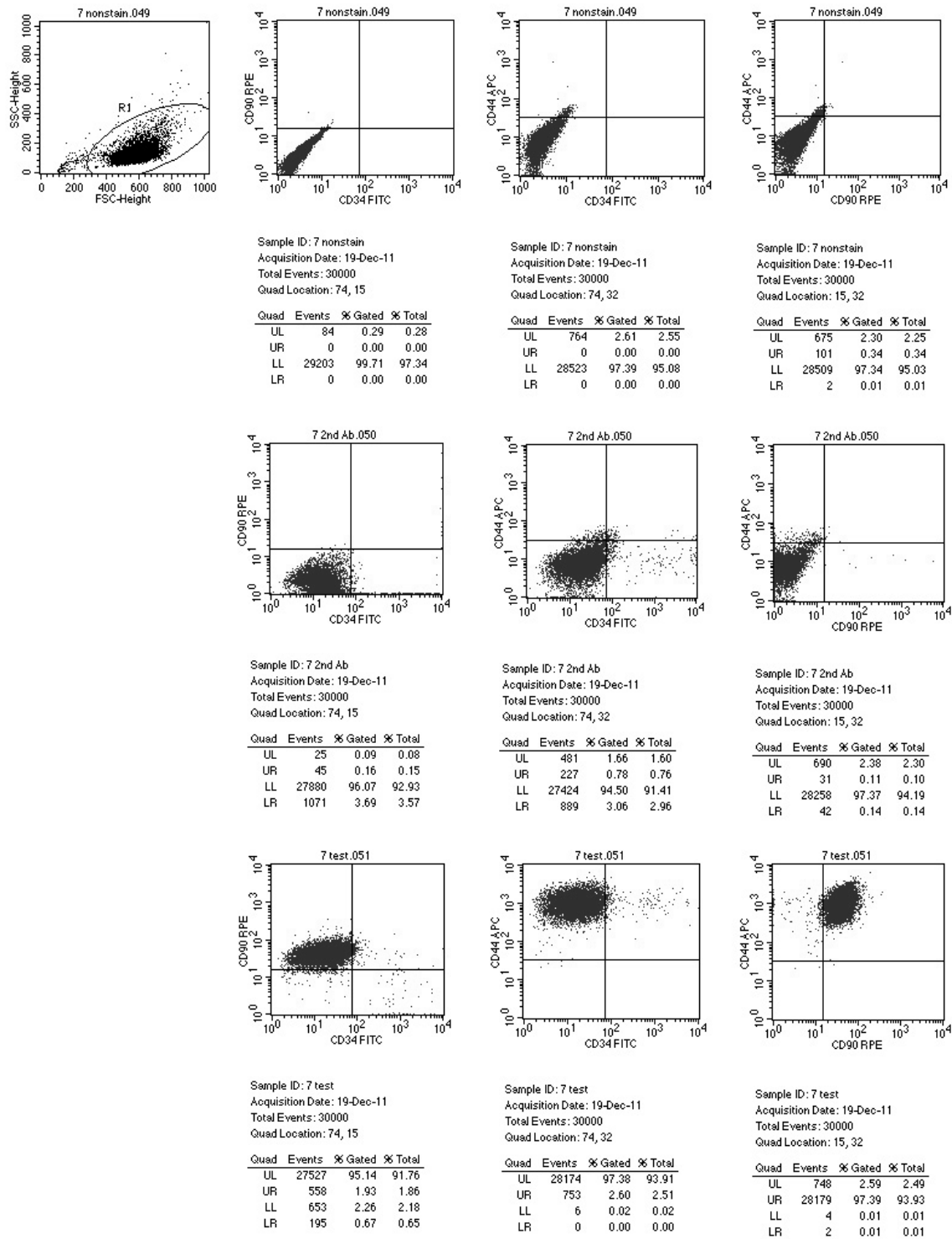
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	26196	93.34	87.32
UR	1867	6.65	6.22
LL	2	0.01	0.01
LR	0	0.00	0.00



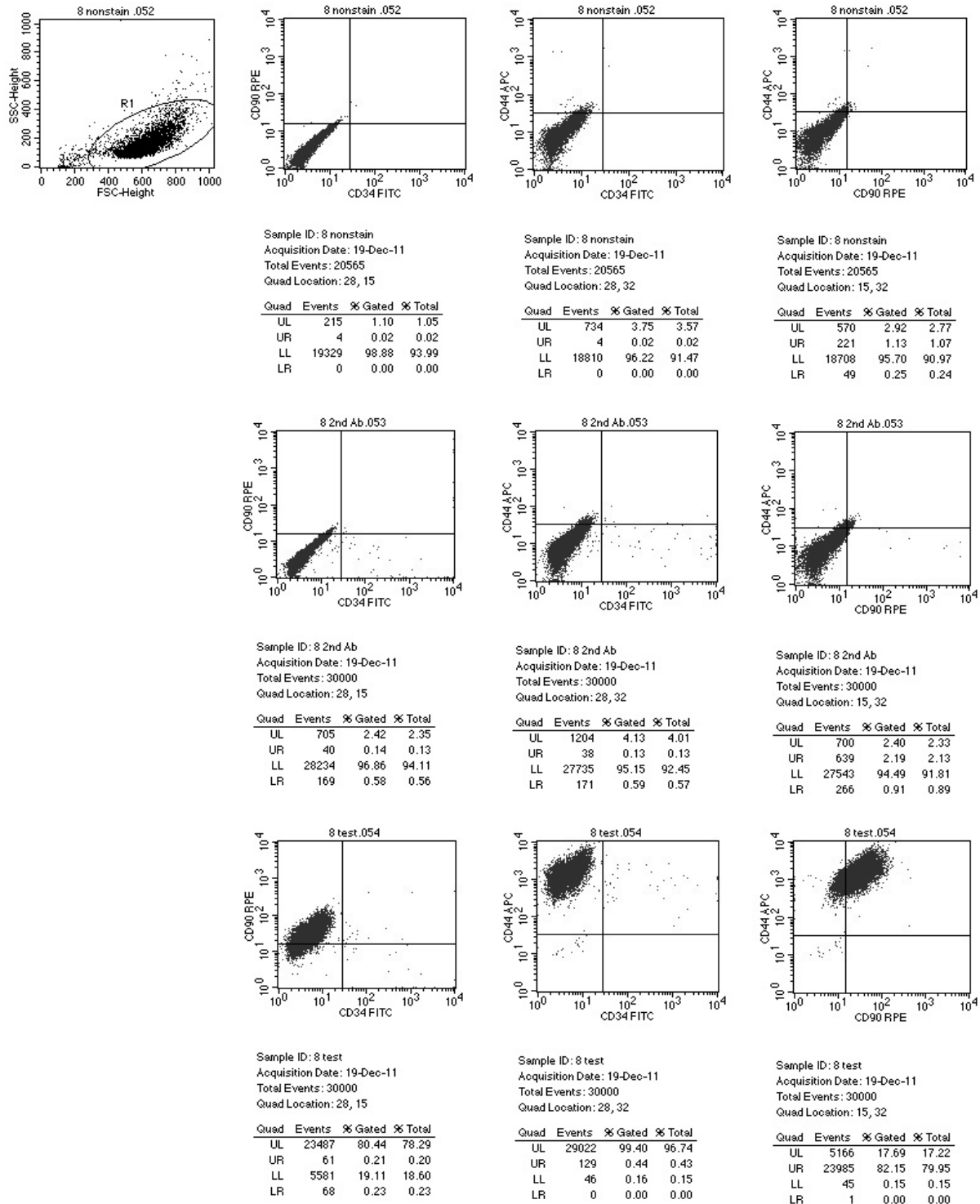
Sample ID: 4 test
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 15, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	3061	10.91	10.20
UR	25002	89.09	83.34
LL	2	0.01	0.01
LR	0	0.00	0.00

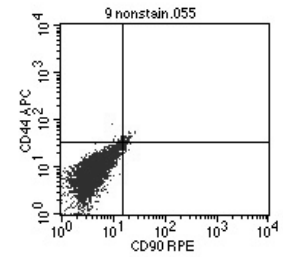
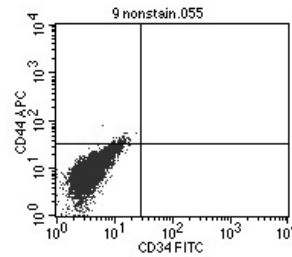
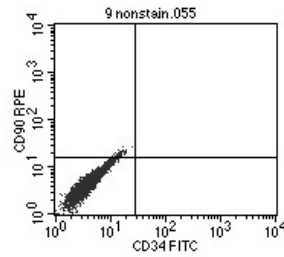
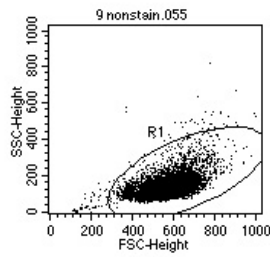
ภาพที่ 10 แสดงการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD 44 และ 90 ของเซลล์ที่เก็บจากไขกระดูกของสุนัขตัวที่ 4



ภาพที่ 11 แสดงการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD 44 และ 90 ของเซลล์ที่เก็บจากเนื้อเยื่อไขมันของสุนัขตัวที่ 1



ภาพที่ 12 แสดงการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD 44 และ 90 ของเซลล์ที่เก็บจากเนื้อเยื่อไขมันของสุนัขตัวที่ 2



Sample ID: 9 nonstain
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 15

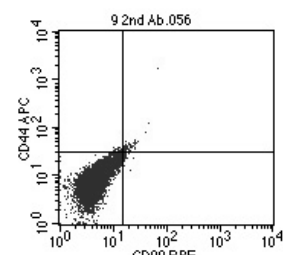
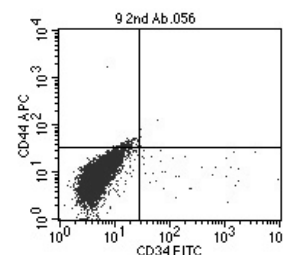
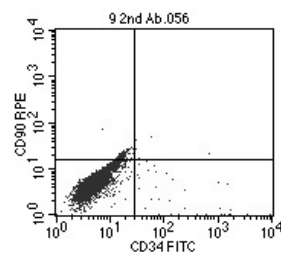
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	350	1.18	1.17
UR	3	0.01	0.01
LL	29220	98.81	97.40
LR	0	0.00	0.00

Sample ID: 9 nonstain
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	324	1.10	1.08
UR	3	0.01	0.01
LL	29246	98.89	97.49
LR	0	0.00	0.00

Sample ID: 9 nonstain
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 15, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	118	0.40	0.39
UR	243	0.82	0.81
LL	29042	98.20	96.81
LR	170	0.57	0.57



Sample ID: 9 2nd Ab
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 15

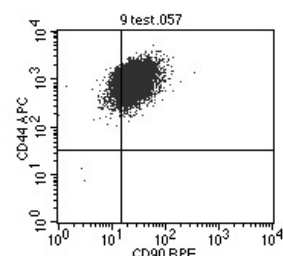
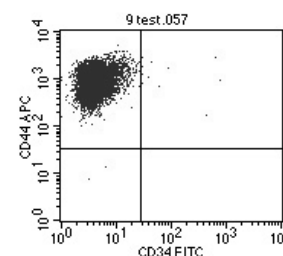
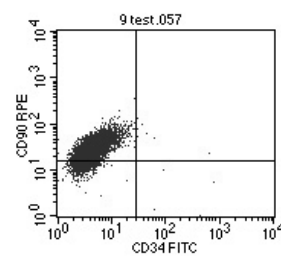
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	462	1.57	1.54
UR	17	0.06	0.06
LL	28880	97.93	96.27
LR	130	0.44	0.43

Sample ID: 9 2nd Ab
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	388	1.32	1.29
UR	12	0.04	0.04
LL	28954	98.19	96.51
LR	135	0.46	0.45

Sample ID: 9 2nd Ab
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 15, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	101	0.34	0.34
UR	332	1.13	1.11
LL	28826	97.75	96.09
LR	230	0.78	0.77



Sample ID: 9 test
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 15

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	24462	82.83	81.54
UR	28	0.09	0.09
LL	5022	17.01	16.74
LR	20	0.07	0.07

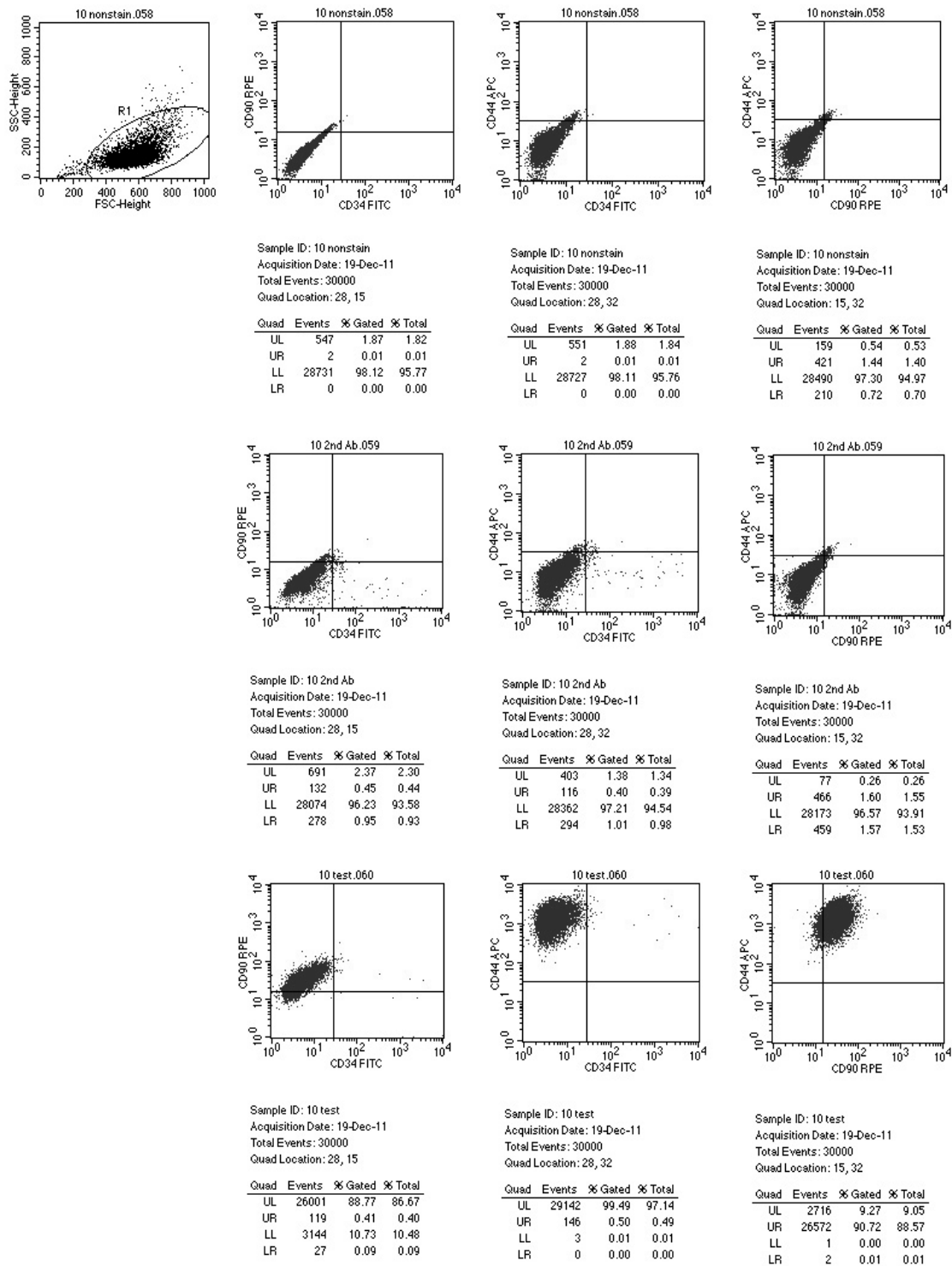
Sample ID: 9 test
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 28, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	29469	99.79	98.23
UR	48	0.16	0.16
LL	15	0.05	0.05
LR	0	0.00	0.00

Sample ID: 9 test
Acquisition Date: 19-Dec-11
Total Events: 30000
Quad Location: 15, 32

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	4450	15.07	14.83
UR	25067	84.88	83.56
LL	15	0.05	0.05
LR	0	0.00	0.00

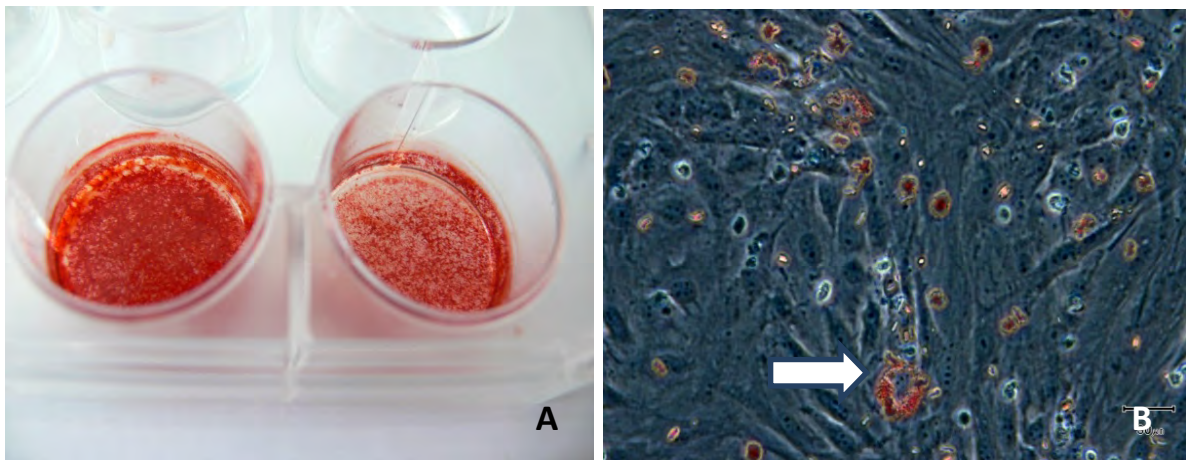
ภาพที่ 13 แสดงการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD 44 และ 90 ของเซลล์ที่เก็บจากเนื้อเยื่อไขมันของสุนัขตัวที่ 3



ภาพที่ 14 แสดงการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD 44 และ 90 ของเซลล์ที่เก็บจากเนื้อเยื่อไขมันของสุนัขตัวที่ 4

ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ด้วยการกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เจริญเป็นเซลล์ต่าง ๆ

เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในจานเพาะเลี้ยง โดยกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เจริญเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลาง(mesodermal lineage) โดยเฉพาะการพัฒนาของเซลล์เป็นเซลล์กระดูก เซลล์เนื้อเยื่อไขมัน และเซลล์กระดูกอ่อน ทำการตรวจการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ดังกล่าวด้วยวิธีตามตารางที่ 2 จากการศึกษาพบว่าเซลล์ที่เก็บได้จากทั้งไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันสามารถกระตุ้นให้เจริญเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลางได้ แต่เนื่องจากการกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ให้เป็นเซลล์กระดูกสามารถทำได้ง่าย การศึกษาครั้งนี้จึงใช้การตรวจการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เป็นเซลล์กระดูกเป็นหลัก อย่างไรก็ตามเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์อื่นๆ ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลาง เช่นเซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน ตามภาพที่ 15 การตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อยืนยันและเปรียบเทียบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ทั้งจากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันจากสุนัขทั้งสิ้น 4 ตัว พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากทั้งสองแหล่งมีคุณสมบัติคล้ายกันโดยเฉพาะคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกในจานเพาะเลี้ยง (in vitro bone differentiation)



ภาพที่ 15 แสดงตัวอย่างผลการกระตุ้นให้เซลล์ MSCs ให้เป็นเซลล์กระดูก (A, Alizaline Red staining) และ เซลล์ไขมัน (B, Oil red O staining) ลูกศรแสดง perinuclear fat droplet

ผลการกระตุ้นให้เซลล์มีเซนไคม์ให้เจริญข้ามชนิดเนื้อเยื่อ (transdifferentiation) เพื่อให้เป็นเซลล์ประสาท

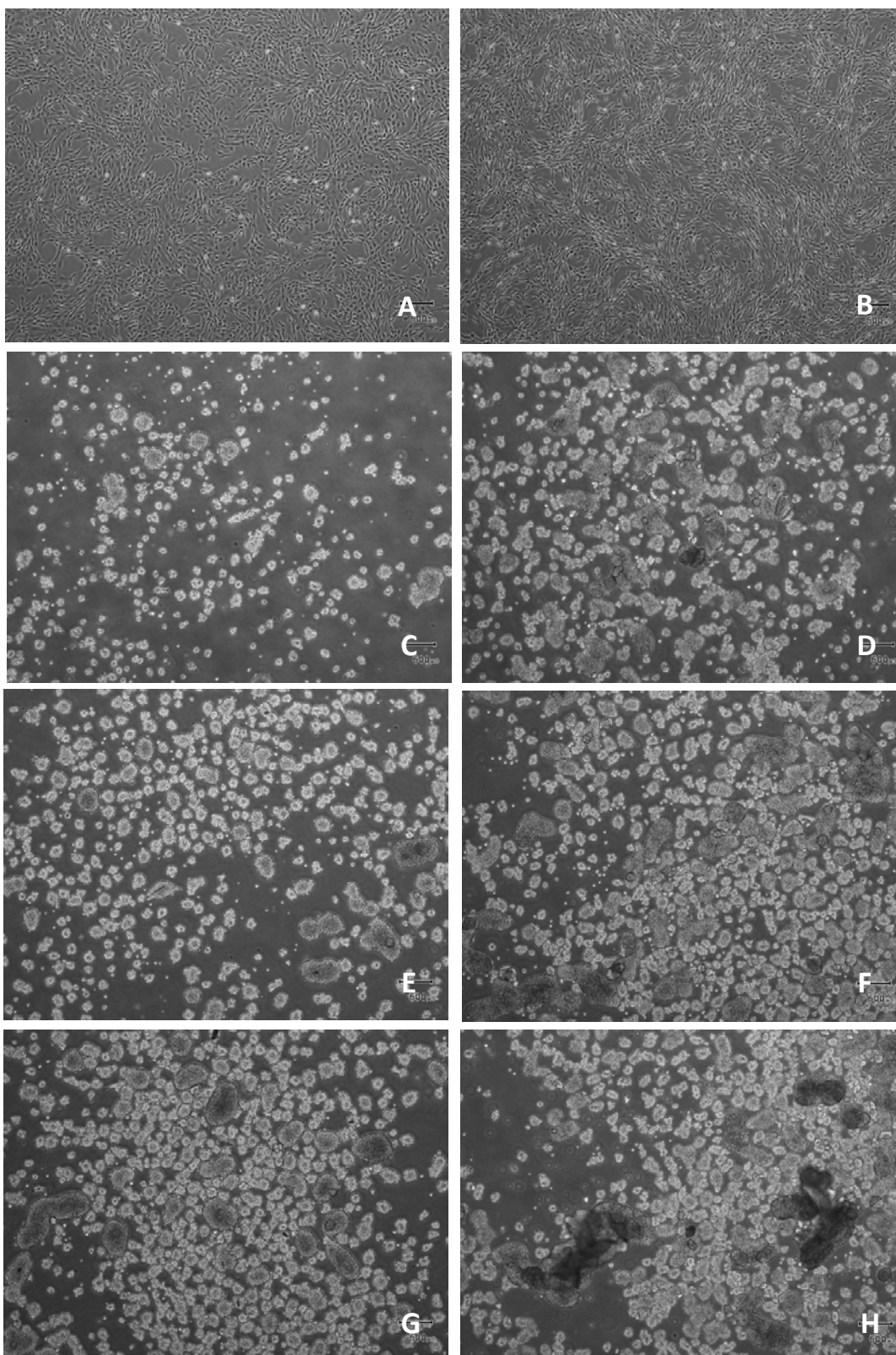
ทำการกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากสเต็มจำนวน 4 ตัว เป็นเซลล์ต้นกำเนิด MSC จากไขมัน 4 ตัวอย่าง และจากไขกระดูก จำนวน 4 ตัวอย่าง ทำการเลี้ยงเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นครั้งที่ 3 (passage 3) ย่อยเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยเอนไซม์ ทริปซิน นับจำนวนเซลล์และทำการเลี้ยงเซลล์ด้วยความหนาแน่น 3 แบบ คือ 2.5×10^5 5×10^5 และ 1×10^6 ในน้ำยากระตุ้น MSC ให้เป็นเซลล์ประสาท เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ในน้ำยากระตุ้นให้เป็นเซลล์ประสาทนาน 7 วัน เพื่อให้เซลล์เกาะกัน เป็น neurosphere (ภาพที่ 16 และ 17) จากการศึกษาพบว่า เซลล์ MSCs จากทั้งเนื้อเยื่อไขมันและไขกระดูก รวมตัวกันเป็น neurosphere โดยไม่มีผลของความหนาแน่นของเซลล์ต่อการสร้าง neurosphere เมื่อทำการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ที่เกาะกันเป็น neurosphere จะพบว่าไม่มีความแตกต่างของร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ที่เลี้ยงในความหนาแน่นที่ต่างกัน ดังตารางที่ 5 และภาพที่ 18 และ 19

การศึกษานี้พบว่า การเลี้ยงเซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงจะให้ neurosphere ปริมาณมากกว่า และขนาดใหญ่กว่า ทั้งนี้ไม่สามารถวัดขนาดเปรียบเทียบของ neurosphere จากกลุ่มการทดลองได้เนื่องจากมีการเกาะกลุ่มกันของ neurosphere ทำให้มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน โดยลักษณะ neurosphere มีหลายลักษณะบางครั้งพบเป็นก้อนเดี่ยวหรืออยู่รวมกันหลายๆ ก้อน (ภาพที่ 16)

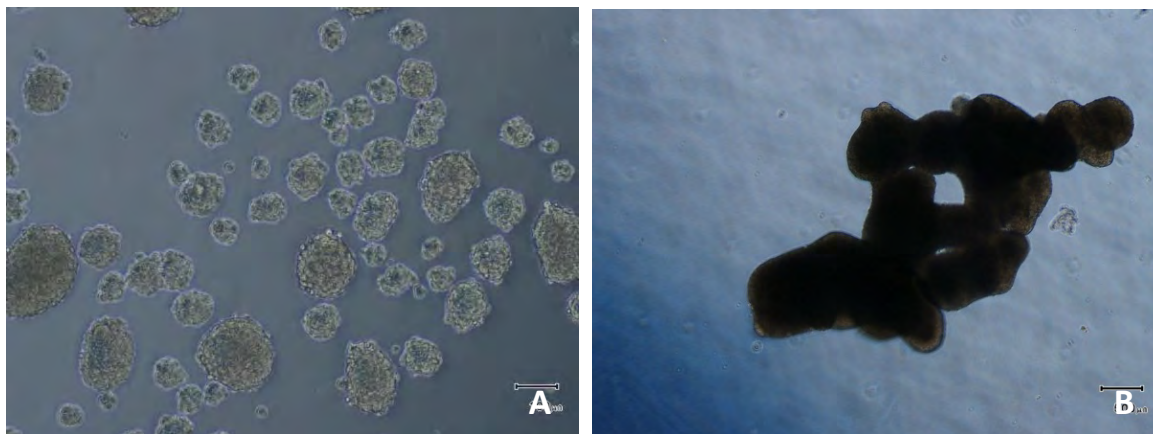
ตารางที่ 5 แสดงอัตราเซลล์รอดชีวิตของเซลล์ MSCs จากไขกระดูก (B-MSC) และจากเนื้อเยื่อไขมัน (A-MSC) ภายหลังการรวมกลุ่มเป็น neurosphere

Cell type	Total cell count	Alive cells	Dead cells	% viability
B-MSC				
Dog No. 1	209	179	30	85.6
Dog No. 2	209	172	37	82.3
Dog No. 3	201	183	18	91.0
Dog No. 4	201	194	7	96.5
A-MSC				
Dog No. 1	233	212	21	91.0
Dog No. 2	216	199	17	92.1

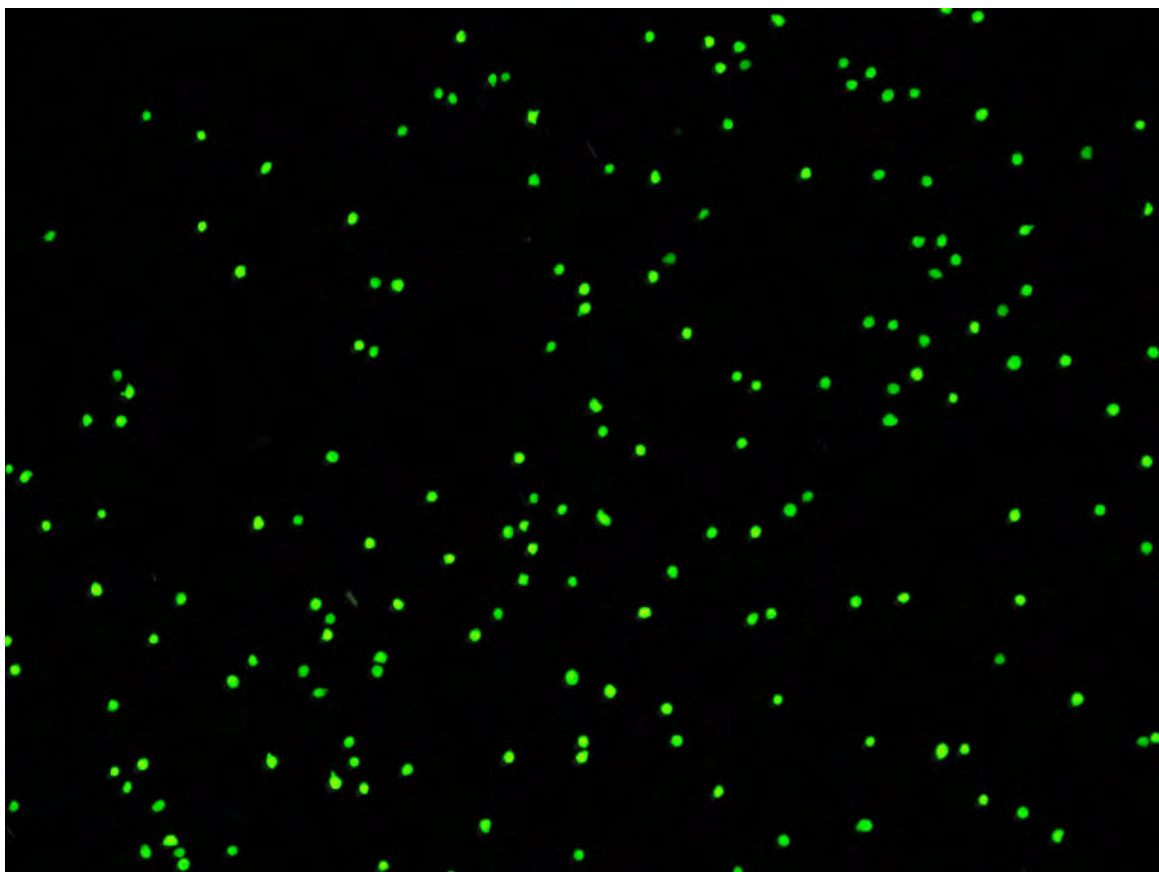
Dog No. 3	252	239	13	94.8
Dog No. 4	209	184	25	88.0



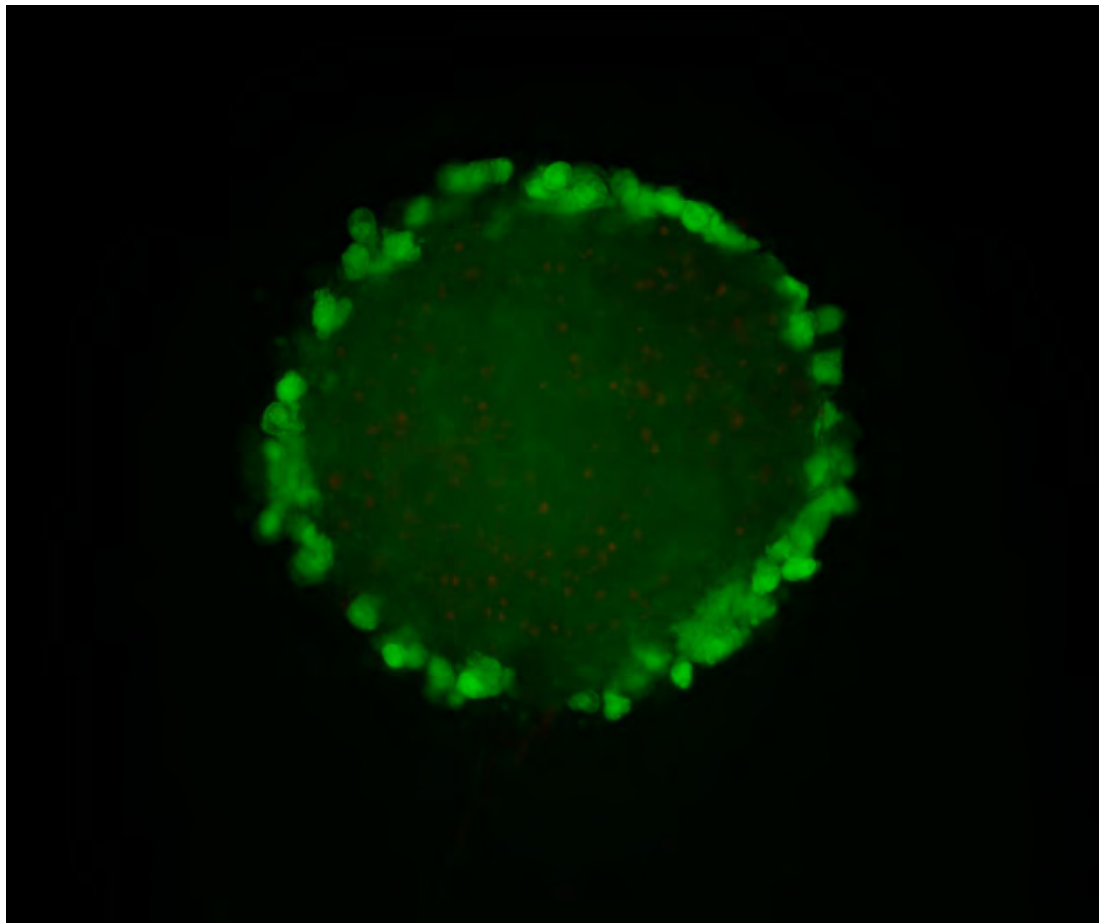
ภาพที่ 16 แสดงการเกาะกลุ่มของเซลล์ MSCs จากไขกระดูก (A, C, E, G) และเนื้อเยื่อไขมัน (B, D, F, H); A และ B แสดงเซลล์ก่อนการกระตุ้นเซลล์ให้เป็นเซลล์ประสาท; C และ D เลี้ยงด้วยความหนาแน่นเซลล์ 2.5×10^5 , E และ F เลี้ยงด้วยความหนาแน่นเซลล์ 5×10^5 ; G และ H เลี้ยงด้วยความหนาแน่นเซลล์ 1×10^6



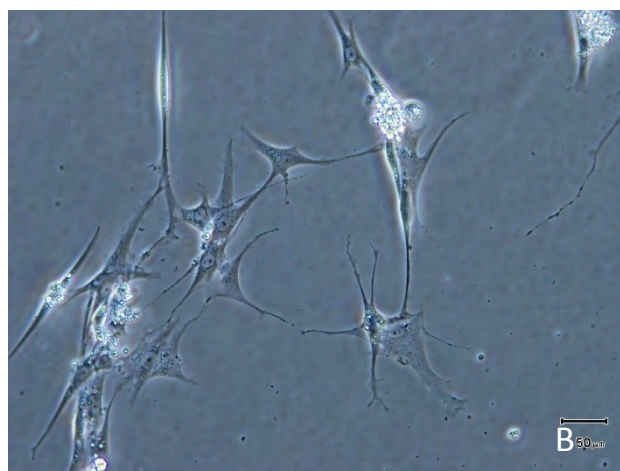
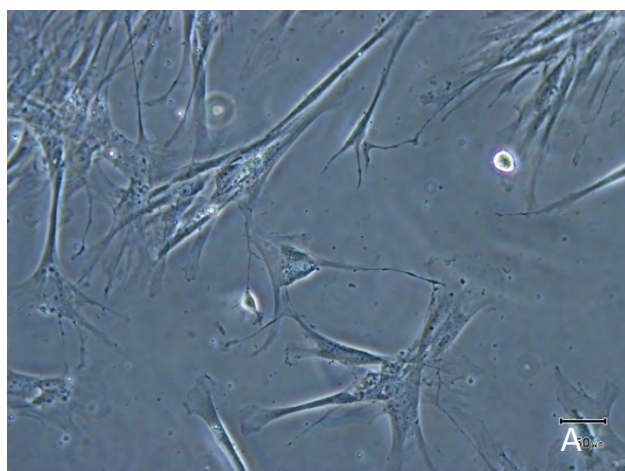
ภาพที่ 17 แสดงลักษณะของเซลล์ที่รวมตัวกันเป็น neurosphere โดยพบลักษณะ neurosphere เป็นก้อนเดี่ยว (A) และ แบบรวมกลุ่มของ neurosphere (B)



ภาพที่ 18 แสดงเซลล์ที่ย่อยจาก neurosphere ภายหลังจากย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ ชนิด calcein และ Ethidium homodimer 1 เซลล์มีชีวิตติดสีเรืองแสงสีเขียว ส่วนเซลล์ตายติดสีแดงในนิวเคลียส

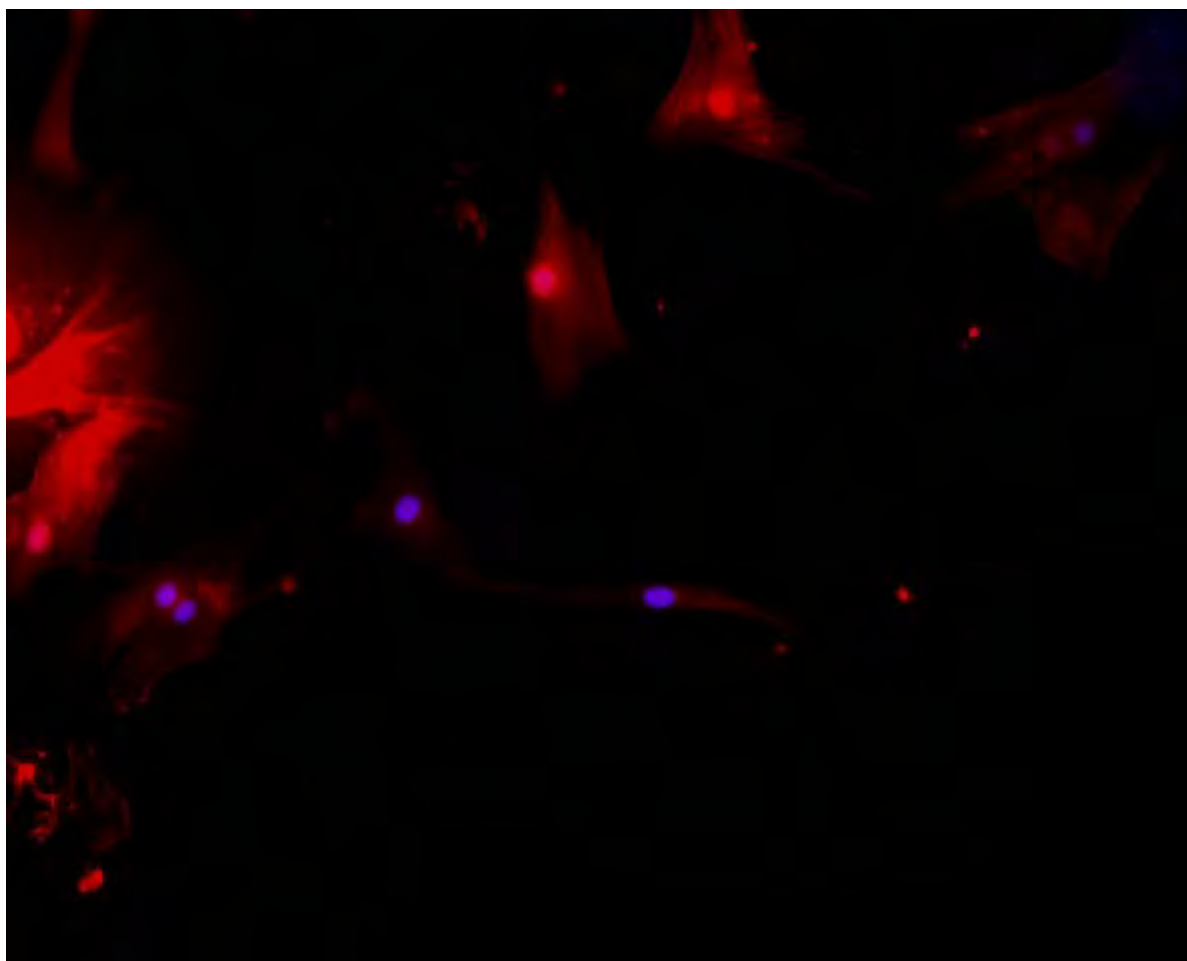


ภาพที่ 19 แสดงลักษณะและการกระจายตัวของเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายภายใน neurosphere ภายหลังจากย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ ชนิด calcein และ Ethidium homodimer 1 เซลล์มีชีวิตติดสีเรืองแสงสีเขียว ส่วนเซลล์ตายติดสีแดงในนิวเคลียส



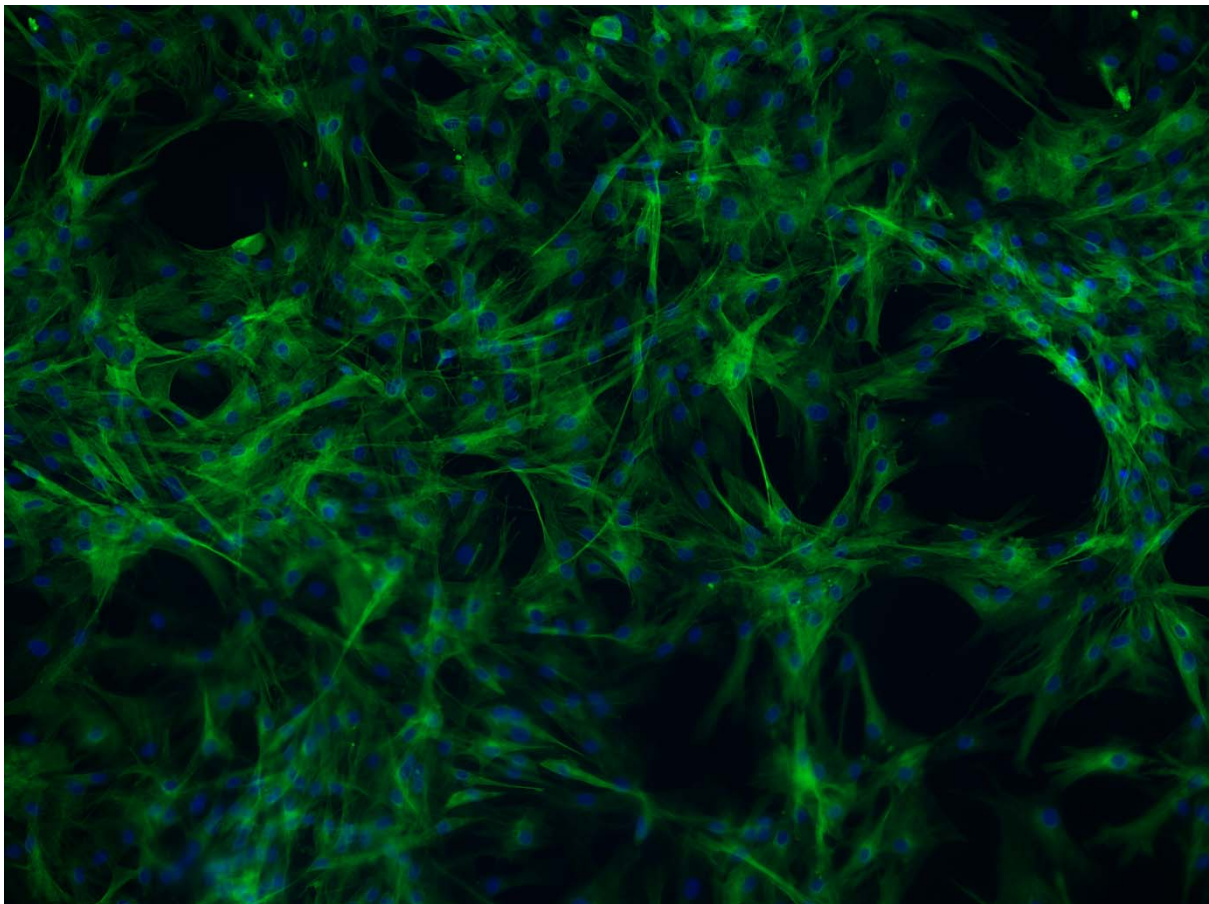
ภาพที่ 20 แสดงลักษณะเซลล์คล้ายเซลล์ประสาทภายหลังการกระตุ้นการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิด MSCs จากเนื้อเยื่อไขมัน (A) และไขกระดูก (B)

ภายหลังการย่อยเซลล์จาก neurosphere มาเลี้ยงในน้ำยา final neuron induction ที่มีส่วนประกอบของน้ำยาเหมือนกับน้ำยา neuronal preinduction ยกเว้นไม่เติม EGF, bFGF และใส่ 1 μ M all-trans retinoic acid ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกที่เคลือบด้วย poly-D-lysine นาน 5 วัน พบว่าเฉพาะเซลล์ต้นกำเนิดเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ที่มีหัวและปลายแหลมคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ให้เป็นเซลล์ที่มีการยื่นแขนงหลายทิศทาง (multiple process) คล้ายเซลล์ประสาท ดัง**ภาพที่ 20** จากการประเมินเบื้องต้นจากจำนวนเซลล์ที่รูปร่างคล้ายเซลล์ประสาท พบว่าเซลล์ MSCs ที่เก็บจากไขกระดูกมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ประสาทสูงกว่า เมื่อเทียบกับเซลล์ MSCs ที่เก็บจากเนื้อเยื่อไขมัน (**ภาพที่ 20**) เมื่อทำการย้อมสีเรืองแสงเพื่อตรวจการแสดงออกของโปรตีน nestin ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ประสาทจะพบว่า เซลล์ส่วนน้อยจะให้ผลบวกต่อการย้อม nestin ดัง**ภาพที่ 21**

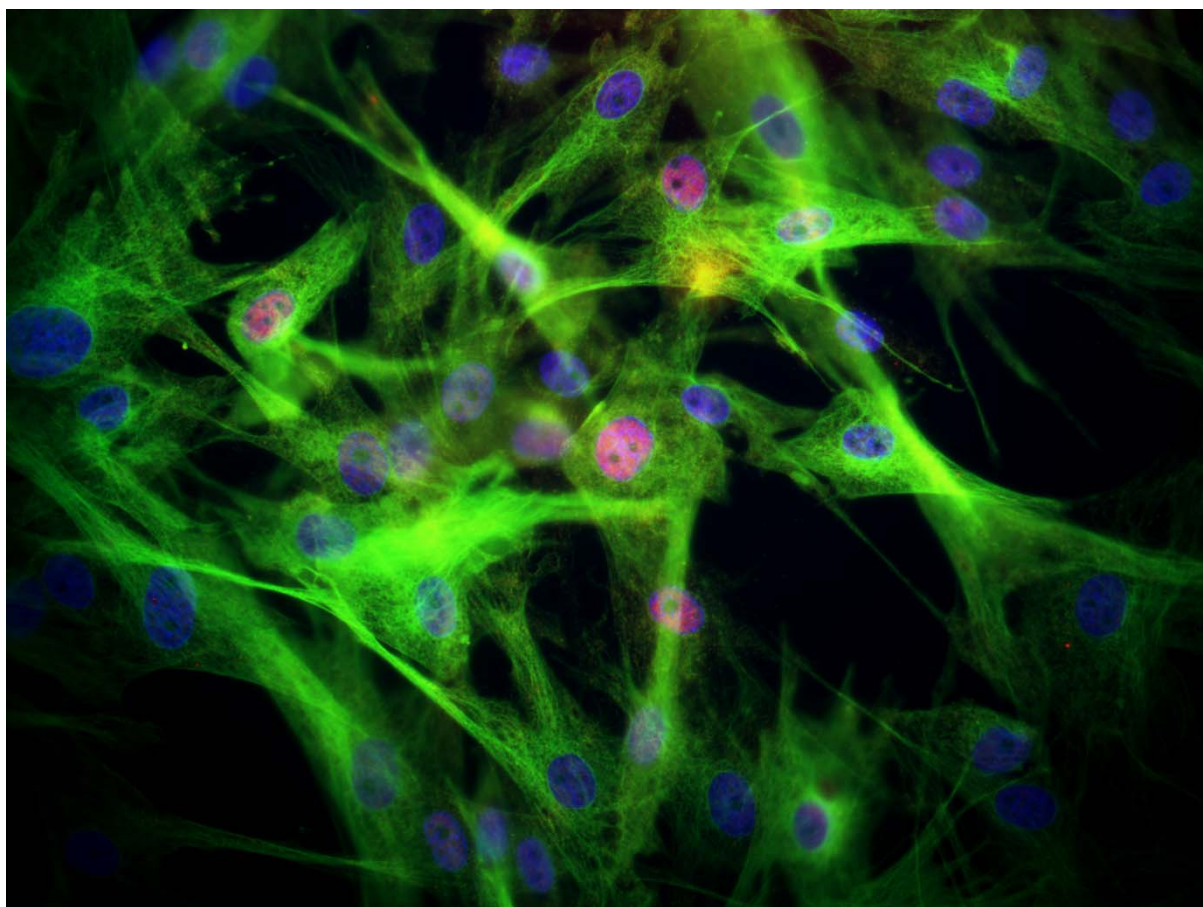


ภาพที่ 21 แสดงเซลล์คล้ายเซลล์ประสาทที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้นเซลล์ MSCs ให้เป็นเซลล์ประสาท โดยเซลล์ให้ผลบวกต่อ Nestin (สีแดง) ย้อมสี DNA ด้วย DAPI

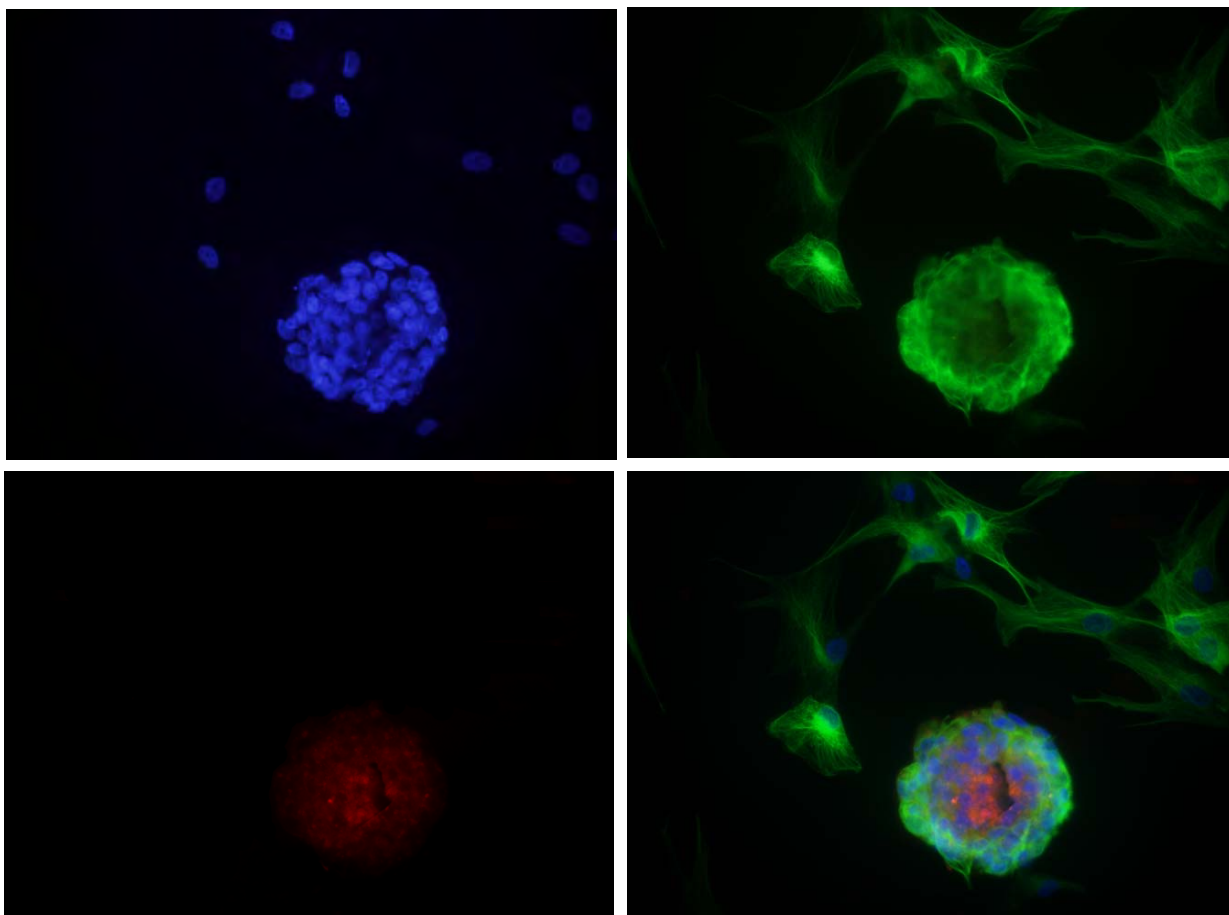
ในขณะเดียวกันเซลล์ประสาทที่เลี้ยงในการศึกษาครั้งนี้ให้ผลบวกต่อ Beta III tubulin (ภาพที่ 22) และ NeuN (ภาพที่ 23) ซึ่งเป็นมาร์คเกอร์ของเซลล์ประสาท อย่างไรก็ตามพบว่าภายหลังการเลี้ยงเซลล์ประสาทให้พัฒนาสมบูรณ์ยังคงมีเซลล์บางส่วนที่เกาะกลุ่มเป็น neurosphere ซึ่งกลุ่มของ neurosphere นี้แสดงออกโปรตีนของทั้ง beta III tubulin และ nestin ในขณะที่เซลล์เดี่ยวมักไม่ให้ผลบวกต่อ nestin (ภาพที่ 24) เมื่อทำการตรวจแยกจำแนกชนิดของเซลล์ประสาทจะพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่ให้ผลบวกกับ Glial fibrillary acidic protein (GFAP) แต่ให้ผลลบต่อ O1 แสดงว่าเซลล์ประสาทที่เลี้ยงได้เจริญเป็นเซลล์ประสาทในกลุ่ม astrocyte (ภาพที่ 25) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของเซลล์ที่ตรวจพบด้วยกล้อง phase contrast (ภาพที่ 20)



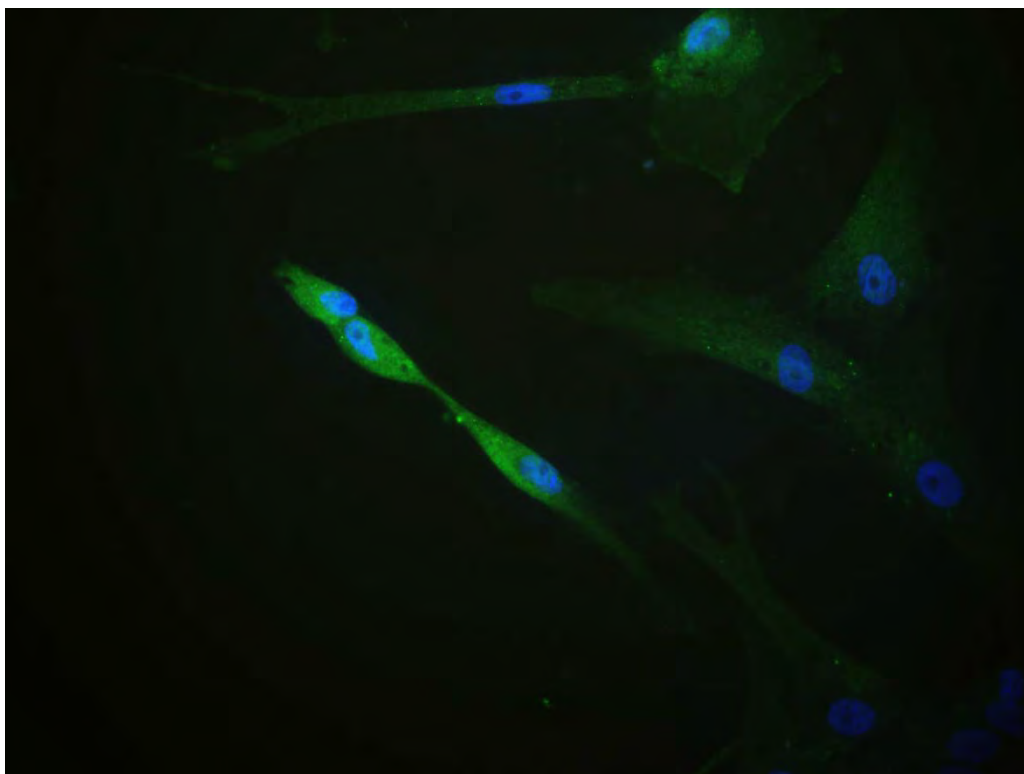
ภาพที่ 22 แสดงการแสดงออกของโปรตีน beta III tubulin (สีเขียว) ของเซลล์ประสาทที่ผลิตจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก นิวเคลียสของเซลล์ย้อมด้วย DAPI (สีน้ำเงิน)



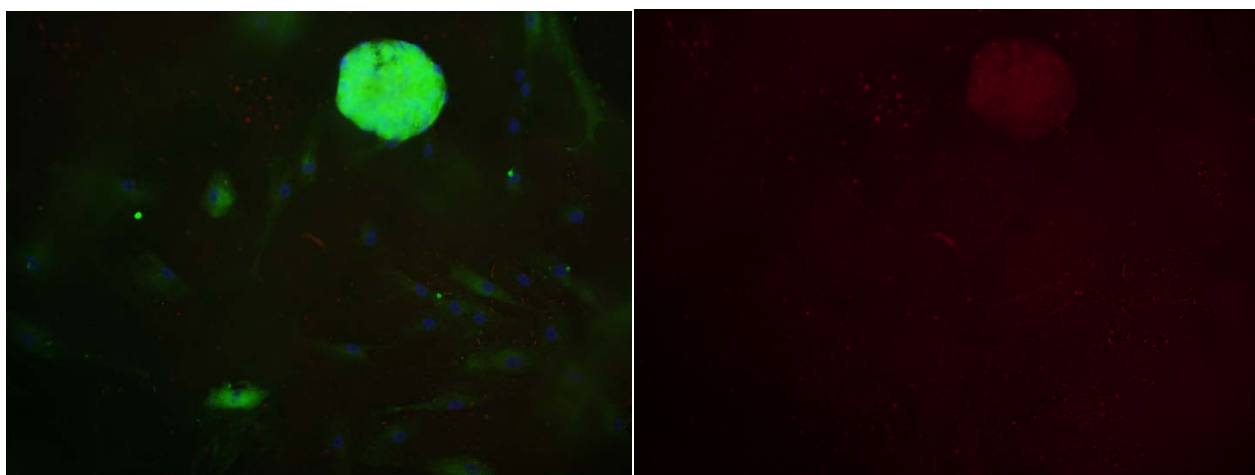
ภาพที่ 23 แสดงการแสดงออกของโปรตีน beta III tubulin (สีเขียว) ของเซลล์ประสาทที่ผลิตจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก นิวเคลียสของเซลล์ย้อมด้วย DAPI (สีน้ำเงิน) และ NeuN (สีแดง)



ภาพที่ 24 แสดงการแสดงออกของโปรตีนของ neurosphere ภาพ A แสดงนิวเคลียสของ neurosphere ย้อมด้วย DAPI (สีน้ำเงิน) ภาพ B: การแสดงออกของ beta III tubulin (สีเขียว) และ nestin (สีแดง ภาพ C) ภาพ D แสดงการรวมภาพ (merged image) ของการแสดงออกโปรตีนใน neurosphere



ภาพที่ 25 แสดงการแสดงออกของโปรตีน Glial fibrillary acidic protein (GFAP) (สีเขียว) ของเซลล์ประสาทที่ผลิตจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก นิวเคลียสของเซลล์ย้อมด้วย DAPI (สีน้ำเงิน)



ภาพที่ 26 แสดงการแสดงออกของโปรตีน beta III tubulin (สีเขียว) และ nestin (สีแดง) ของเซลล์ประสาทที่ผลิตจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมัน นิวเคลียสของเซลล์ย้อมด้วย DAPI (สีน้ำเงิน)

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สรุปได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์สามารถเก็บได้จากทั้งโพรงของกระดูกและเนื้อเยื่อไขมัน โดยเซลล์ที่เก็บได้สามารถเลี้ยงเพื่อให้เพิ่มจำนวนและแสดงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ ได้แก่ สามารถเกาะกับจานเลี้ยงพลาสติก เพิ่มจำนวนได้ แสดงออกโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ และสามารถกระตุ้นให้เจริญพัฒนาเป็นเซลล์ต่างๆได้ โดยเฉพาะเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลาง การศึกษาค้นคว้าพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากทั้งสองแหล่งนี้ยังมีคุณสมบัติในการแสดงออกโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ประสาท เช่น nestin Beta III tubulin NeuN และเซลล์ประสาทจำเพาะแอสโตรไซต์ (astrocytes) และ Oligodendrocyte

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากสัตว์เต็มวัย (adult stem cells) ที่มีแนวโน้มนำเซลล์มาใช้ในการรักษาโรคหลายโรค ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติพิเศษของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ เช่น สามารถเก็บได้จากเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น จากไขกระดูก (Wagner et al., 2005; Kern et al., 2006), เนื้อเยื่อไขมัน (Zuk et al., 2002) สายสะดือ (Lee et al., 2004; Koch et al., 2007) และ โพรงฟัน (Jo et al., 2007; Waddington et al., 2009) เซลล์เหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ง่าย และสามารถพัฒนาเป็นเซลล์ต่างๆ ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลางได้ นอกจากนี้ยังมี แนวโน้มในการใช้เซลล์เหล่านี้ในการปลูกถ่ายในสัตว์ป่วย เนื่องจากช่วยลดโอกาสเกิดการปฏิเสธเนื้อเยื่อภายหลังการปลูกถ่าย อย่างไรก็ตามในมีการศึกษาในสุนัขค่อนข้างน้อย โดยในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาการเก็บตัวอย่างเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก (Csaki et al., 2007; Jafarian et al., 2008), เนื้อเยื่อไขมัน (Neupane et al., 2008; Vieira et al., 2010) และสายสะดือ (Seo et al., 2009) ในขณะเดียวกันการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของเซลล์โดยเฉพาะคุณสมบัติในการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้มีความสำคัญในแง่ของการคัดกรองและเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ที่เก็บได้จากเนื้อเยื่อ การศึกษาค้นคว้านี้ใช้การแสดงออกของโปรตีน CD 44 CD 90 เพราะแอนติบอดีที่ให้ผลบวกกับแอนติเจนในสุนัขมีค่อนข้างน้อย ส่วนการตรวจชนิดเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ในรายงานอื่นๆ ในสัตว์ต่างๆ ใช้การแสดงออกของโปรตีน เช่น CD 29, CD 44, CD 90, CD 105 and Stro-1 (Martin et al., 2002; Bosnakovski et al., 2005; Csaki et al., 2007; Meirelles and Nardi, 2009; Rho et al., 2009)

จากการเก็บตัวอย่างเซลล์จากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันจากสุนัขจำนวน 4 ตัว พบว่าเซลล์ที่เก็บได้มีความแตกต่างกันในระดับจำนวนของเซลล์ที่แสดงออกของ CD 4 CD 90 ทั้งนี้มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัย เช่น เทคนิคการเก็บเซลล์ เทคนิคการทำเซลล์ให้บริสุทธิ์ และอายุ (Egrise et al., 1992; Dodson et al., 1996)

อย่างไรก็ตามการกระตุ้นให้เกิดการเจริญพัฒนาให้เป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลางเป็นเทคนิคที่มีความจำเป็นในการบ่งชี้ถึงคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ การศึกษาค้นคว้านี้พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่เก็บได้ทั้งจากไขกระดูกและจากเนื้อเยื่อไขมันสามารถถูกกระตุ้นให้เป็นเซลล์ต่างๆในกลุ่มของเนื้อเยื่อชั้นกลางได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจการกระตุ้นให้เป็นเซลล์ของกระดูก ทั้งนี้เนื่องจากสามารถตรวจได้ง่ายและมีค่าใช้จ่ายในการตรวจน้อยที่สุด นอกจากนี้แนวโน้มการใช้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มักเกี่ยวข้องกับการใช้เพื่อซ่อมแซมกระดูกของสัตว์หรือผู้ป่วย แต่มักจะกระทำร่วมกับการเลี้ยงเซลล์บนโครงร่าง

เทียม (scaffold) ในลักษณะของการผลิตเนื้อเยื่อวิศวกรรม (tissue engineering) อย่างไรก็ตามการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ในด้านการเจริญพัฒนาให้เป็นเซลล์ข้ามกลุ่มเนื้อเยื่อ (transdifferentiation) นั้นยังมีรายงานค่อนข้างน้อย ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมามีการเกิดเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายเซลล์ประสาทนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากการการเปลี่ยนแปลงของแอคตินไมโครฟิลาเมนต์จากผลความเป็นพิษของสารละลาย dimethyl sulphoxide (Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004) แต่เนื่องจากมีรายงานการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ประสาทในเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (Yamaguchi et al., 2006; Kamishina et al., 2006) ทำให้มีแนวโน้มที่จะสามารถกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ให้เจริญพัฒนาเป็นเซลล์ในกลุ่มเซลล์ประสาทได้ การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ในน้ำยากระตุ้นให้เจริญเป็นเซลล์ประสาท (neuronal preinduction) นาน 7 วัน จะพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เกาะกันในลักษณะของ neurosphere ดังภาพที่ 12 โดยการเกาะกลุ่มดังกล่าวไม่ขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่ใส่ลงไปในจานเพาะเลี้ยง แต่กรณีที่ใช้จำนวนเซลล์มากจะช่วยให้ได้จำนวน neurosphere มาก อย่างไรก็ตามเนื่องจากจำนวน neurosphere ที่มากเกินไปในจานเพาะเลี้ยงทำให้เกิดการเกาะกันของ neurosphere และก้อน neurpsphere ขนาดใหญ่เกินไปมีแนวโน้มทำให้เกิดการตายของเซลล์ภายใน neurosphere การศึกษาครั้งนี้พบว่ามี การกระจายตัวของเซลล์ตายภายใน neurosphere แต่จำนวนเซลล์ตายมีจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับเซลล์มีชีวิตทั้งหมด ซึ่งผลของการเกาะกันของ neurosphere อาจแสดงให้เห็นว่าปัจจัยส่วนหนึ่งในการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทอาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยที่เกิดขึ้นจากการส่งผ่านระหว่างเซลล์และเซลล์ข้างเคียง รวมถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับออกซิเจน (Wang et al., 2012) มีรายงานว่า การเกาะกันของ neurosphere ช่วยกระตุ้นให้เซลล์ใน neurosphere สร้างโปรตีน nestin ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญในระยะเริ่มต้นของเซลล์ประสาท (Bi et al., 2010; Jang et al., 2010; Qi et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบการแสดงออกของ nestin ใน neurosphere ของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่เก็บได้จากทั้งไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมัน เมื่อเลี้ยงเซลล์ใน neurosphere และเลี้ยงเพื่อให้เกิดการพัฒนาสมบูรณ์ของเซลล์ประสาทจะพบว่าเซลล์ที่ได้มีลักษณะคล้ายเซลล์ประสาท โดยพบการแสดงออกของโปรตีนของเซลล์ประสาทหลายชนิด เช่น NeuN, Beta III tubulin ทั้งจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่ได้จากไขกระดูกและจากไขมัน อย่างไรก็ตามซึ่งเมื่อเทียบจำนวนเซลล์และความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่ได้จากไขกระดูกมีระดับที่สูงกว่าเซลล์ประสาทที่ได้จากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อไขมัน ภายหลังการตรวจชนิดย่อยของเซลล์ประสาทที่ได้พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ประสาทในกลุ่ม astrocyte ซึ่งปกติทำหน้าที่ในการช่วยเซลล์ประสาท และมีบทบาทในการซ่อมแซมความเสียหายของการทำงานของระบบประสาท (Montgomery, 1994; Aschner, 1998) จึงอาจเป็นไปได้การเลี้ยงเซลล์ประสาทให้เจริญสมบูรณ์ในขั้นตอนที่สองของการเลี้ยง (final neuron differentiation) ทำให้กระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ชนิด astrocyte ซึ่งเป็น subtype ของ neuron ดังนั้นการพัฒนาและการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ประสาทยังคงมีความสำคัญก่อนนำการใช้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ไปใช้เพื่อแก้ไข ปัญหาของระบบประสาท

6. เอกสารอ้างอิง

Aschner, M. Astrocytic functions and physiological reactions to injury: the potential to induce and/or exacerbate neuronal dysfunction--a forum position paper. *Neurotoxicology*. 1998. 19(1): 7-17.

Bi, Y., Gong, M., Zhang, X., Zhang, X., Jiang, W., Zhang, Y., Chen, J., Liu, Y, He, T.C., Li, T. Pre-activation of retinoid signaling facilitates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Dev Growth Differ*. 2010. 52(5): 419-31.

Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G., Takagi, S., Okumura, M. and Fujinaga, T. 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*. 319: 243-253.

Csaki, C., Matis, U., Mobasheri, A., Ye, H. and Shakibaei, M. 2007. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: A biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem. Cell Biol*. 128: 507-520.

Dodson, S.A., Bernard, G.W., Kenney, E.B., Carranza, F.A., In vitro comparison of aged and young osteogenic and hemopoietic bone marrow stem cells and their derivative colonies. *Journal of periodontology* 1996. 67, 184-96.

Egrise, D., Martin, D., Vienne, A., Neve, P., Schoutens, A. The number of fibroblastic colonies formed from bone marrow is decreased and the in vitro proliferation rate of trabecular bone cells increased in aged rats. *Bone* 1992. 13, 355-61.

Jafarian, M., Eslaminejad, M.B., Khojasteh, A., Mashhadi Abbas, F., Dehghan, M.M., Hassanizadeh, R. and Houshmand, B. 2008. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: A comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod*. 105: 14-24.

Jang, S., Cho, H.H., Cho, Y.B., Park, J.S., Jeong, H.S. Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biol*. 2010. 16: 11:25.

Jo, Y.Y., Lee, H.J., Kook, S.Y., Choung, H.W., Park, J.Y., Chung, J.H., Choung, Y.H., Kim, E.S., Yang, H.C. and Choung, P.H. 2007. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*. 13: 767-773.

- Kamishina, H., Deng, J., Oji, T., Cheeseman, J.A. and Clemmons, R.M. 2006. Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 67: 1921-1928.
- Kim, N.R., Kang, S.K., Ahn, H.H., Kwon, S.W., Park, W.S., Kim, K.S., Kim, S.S., Jung, H.J., Choi, S.U. and Ahn, J.H. and Kim, K.R. 2009. Discovery of a new and efficient small molecule for neuronal differentiation from mesenchymal stem cell. *J. Med. Chem.* 52: 7931-7933.
- Koch, T.G., Heerkens, T., Thomsen, P.D. and Betts, D.H. 2007. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.* 7: 26.
- Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.M., Lee, K.D., Hsieh, S.L. and Chen, T.H. 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood.* 103: 1669-1675.
- Lu, P., Blesch, A. and Tuszynski, M.H. 2004. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J. Neurosci. Res.* 77: 174-191.
- Martin, D.R., Cox, N.R., Hathcock, T.L., Niemeyer, G.P. and Baker, H.J. 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp. Hematol.* 30: 879-886.
- Meirelles, Lda S. and Nardi, N.B. 2009. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front. Biosci.* 14: 4281-4298.
- Montgomery, D.L. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol.* 1994. 31(2): 145-67.
- Neuhuber, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., Mackay, A. and Fischer, I. 2004. Reevaluation of *in vitro* differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *Neurosci. Res.* 77: 192-204.
- Neupane, M., Chang, C.C., Kiupel, M. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2008. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A.* 14: 1007-1015.
- Qi, Y., Zhang, F., Song, G., Sun, X., Jiang, R., Chen, M, Ge, J. Cholinergic neuronal differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rhesus monkeys. *Sci China Life Sci.* 2010. 53(5): 573-80.

Rho, G.J., Kumar, B.M. and Balasubramanian, S.S. 2009. Porcine mesenchymal stem cells--current technological status and future perspective. *Front. Biosci.* 14: 3942-3961.

Seo, M.S., Jeong, Y.H., Park, J.R., Park, S.B., Rho, K.H., Kim, H.S., Yu, K.R, Lee, S.H., Jung, J.W., Lee, Y.S. and Kang, K.S. 2009. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *J. Vet. Sci.* 10: 181-187.

Vieira, N.M., Brandalise, V., Zucconi, E., Secco, M., Strauss, B.E. and Zatz, M. 2010. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.* 19: 279-289.

Waddington, R.J., Youde, S.J., Lee, C.P. and Sloan, A.J. 2009. Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. *Cells Tissues Organs.* 189: 268-274.

Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W. and Ho, A.D. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 33: 1402-1416.

Wang, Z, Sugano, E., Isago, H., Murayama, N., Tamai, M, Tomita, H. Notch signaling pathway regulates proliferation and differentiation of immortalized Müller cells under hypoxic conditions in vitro. *Neuroscience.* 2012. 214: 171-80.

Yamaguchi, S., Kuroda, S., Kobayashi, H., Shichinohe, H., Yano, S., Hida, K., Shinpo, K., Kikuchi, S. and Iwasaki, Y. 2006. The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells (BMSC)--a preliminary study using microarray analysis. *Brain Res.* 1087: 15-27.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. and Hedrick, M.H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4279-4295.

7. Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 Theerawat Tharasanit, Nawapen Phutikanit, Chalika Wangdee, Kumpanart Soontornvipart, Sasijaras Tantrajak, Theerayuth Kaewamatawong, Junpen Suwimonteerabutr, Pitt Supaphol, Mongkol Techakumphu. Differentiation Potentials of Canine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Thai J. Vet Med. 2011. 41(1): 79-86. (IF<1)

1.2 Chalika Wangdee, Kumpanart Soontornvipart, Wijit Bunlunara, Sasijaras Tantrajak, Mongkol Techakumphu, Prasit Pavasant, Pitt Supaphol and Theerawat Tharasanit. Comparison of isolation techniques for mesenchymal stem cells (MSCs) derived from canine bone marrow and the effects of MSCs loaded onto polycaprolactone hydroxyapatite scaffold on non-union bone healing (manuscript in preparation)

1.3 Theerawat Tharasanit et al. Neuronal differentiation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue (manuscript in preparation)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

2.1 เชิงวิชาการ มีการสร้างนักวิจัยใหม่ จำนวน 2 คน ได้แก่ สพ.ญ. ชาลิกา หวังดี และ สพ.ญ.ศศิจรัส ตันตระกูล

3. อื่นๆ

3.1 ผลงานตีพิมพ์ในวิทยานิพนธ์เรื่อง ผลของการใช้มีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ร่วมกับโครงสร้างเซลล์เชิงประกอบระหว่างโพลิคาโพรแลคโตน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ต่อการหายของวิธีการที่กระดูกอัลนาในสุนัข วิทยานิพนธ์ของ สพ.ญ.ศศิจรัส ตันตระกูล

ภาคผนวก

Differentiation Potentials of Canine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Theerawat Tharasanit^{1*} Nawapen Phutikanit¹ Chalika Wangdee²

Kumpanart Soontornvipart² Sasijaras Tantrajak² Theerayuth Kaewamatawong³

Junpen Suwimonteerabutr¹ Pitt Supaphol⁴ Mongkol Techakumphu¹

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells that have characteristics of self-renewal and differentiation into various specific cell types, in particular mesodermal lineages. This study aimed at isolating, identifying and examining the differentiation capability of canine MSCs. Bone marrow aspirates were obtained from 4 dogs. Putative MSCs were then cultured in MSC medium and subpassaged. At the 3rd to 5th passages, MSCs were examined for their morphology and doubling time. Two cell lines were examined for the expression of CD 34, CD 44 and CD 90, using flow cytometry. The *in vitro* differentiation of these MSCs into mesodermal lineages (bone, cartilage and adipose tissues) and ectodermal lineage (neuron) was performed using osteogenic, chondrogenic, adipogenic and neurogenic media, respectively. Histological examinations (Von Kossa and alcian blue staining) and mRNA expressions (GLA and COL1A1) were used to examine the bone and cartilage differentiation, while Oil red O staining was used to determine adipogenic differentiation.

Plastic-adhered MSCs had high potential for cell division, with a mean doubling time of 35.4±9.3 hours. These fibroblast-like MSCs expressed MSCs markers (CD 44 and CD 90), while fewer than 5% of these MSCs were tested positive to a hemopoietic stem cell marker (CD34). Based on the histological examinations and gene expressions, these cells demonstrated the ability to differentiate into bone, cartilage and adipose tissues. In conclusion, MSCs can be isolated from canine bone marrow and these cells are capable of *in vitro* differentiation into specific mesodermal lineages.

Keywords: bone marrow, canine, mesenchymal stem cells

¹Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, ² Department of Veterinary Surgery, ³Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁴The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Corresponding author E-mail: Theerawat.t@chula.ac.th

บทคัดย่อ

ประสิทธิภาพการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากสุนัข

ธีรวัฒน์ ธาราคานิต^{1*} นวเพ็ญ ภูติภินันท์¹ ซาลิกา หวังดี² กัมปนาท สุนทรวิภาต² ศศิกรัส ตันตระกูล²
ธีระยุทธ แก้วอมตะวงศ์³ จันเพ็ญ สุวิมลธีระบุตร¹ พิชญ์ ศุภผล⁴ มงคล เดชะกำฟู^{1*}

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (MSCs) เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการเจริญเพิ่มจำนวนได้เองและสามารถพัฒนาเป็นเซลล์จำเพาะหลายชนิดโดยเฉพาะเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลาง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาวิธีการเก็บ การพิสูจน์ และการตรวจสอบคุณสมบัติการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ของสุนัข ภายหลังการเก็บของเหลวจากโพรงกระดูกสุนัข ทำการเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนและทำการตรวจลักษณะรูปร่างและอัตราเร็วของการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า จากนั้นทำการตรวจการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD 34 CD 44 CD 90 ด้วยเทคนิคฟลูออโรไมตรี และตรวจคุณสมบัติของเซลล์ในการเจริญเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลาง (กระดูก กระดูกอ่อน และ ไขมัน) และเนื้อเยื่อชั้นนอก (เซลล์ประสาท) ใช้เทคนิคทางจุลพยาธิวิทยา ร่วมกับการย้อมสี Von Kossa และ Alcian blue รวมถึงการแสดงออกของ mRNA ต่อยีน GLA และ COL1A1 ในการตรวจวินิจฉัยกระดูกและกระดูกอ่อนตามลำดับ และใช้ Oil Red O ในการตรวจเนื้อเยื่อไขมัน

เซลล์ MSCs ที่เพาะบนจานเพาะเลี้ยงพลาสติกมีคุณสมบัติในการแบ่งตัวโดยมีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าเท่ากับ 35.4 ± 9.3 ชั่วโมง เซลล์ MSCs มีลักษณะคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ให้ผลบวกต่อการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะต่อเซลล์ MSC (CD 44 และ CD 90) ในขณะที่เซลล์จำนวนน้อยกว่าร้อยละ 5 ให้ผลบวกต่อเซลล์ต้นกำเนิดเลือด (CD 34) จากการตรวจคุณสมบัติของเซลล์ด้วยเทคนิคทางจุลพยาธิวิทยาและการแสดงออกของยีน พบว่าเซลล์เหล่านี้สามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูก กระดูกอ่อน และ เซลล์ไขมันได้ การศึกษานี้สรุปว่าเซลล์ MSCs ที่เพาะเก็บจากโพรงกระดูกสุนัขมีความสามารถในการเจริญพัฒนาในจานเพาะเลี้ยงให้เป็นเซลล์ในกลุ่มเนื้อเยื่อชั้นกลางได้

คำสำคัญ: โพรงกระดูก สุนัข เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ ² ภาควิชาสัตวศาสตร์ ³ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์

⁴ วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: Theerawatt.t@chula.ac.th

Introduction

Stem cells have been intensively studied over the past two decades because these cells have a remarkable potential to develop into various specific cell lineages upon being cultured in appropriated conditions. Because of this, they have been considered as a powerful tool for cell- or tissue-based engineering in human and veterinary medicine (Barry et al., 2004; Bongso et al., 2008; Ribitsch et al., 2010). Stem cells are different from other cell types by two important characteristics (Wobus and Boheler, 2005), as they have the capability of self-renewal, while maintaining themselves in an undifferentiated stage. In specific condition, these quiescent stem cells, however, differentiate into specific cell types or tissues with

special functions such as cardiomyocyte (Jing et al., 2008; Mayorga et al., 2009), bone (Barry and Murphy, 2004), cartilage (Kavalkovich et al., 2002) and neuron (Trzaska et al., 2007; Kim et al., 2009).

Stem cells are usually classified into three types (viz. embryonic, induced-pluripotent and adult stem cells), according to their origins and production techniques. Embryonic stem (ES) cells are pluripotent-specialized cells that are isolated from an inner cell mass of blastocyst-stage embryos (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Induced-pluripotent stem cells (iPS) are also pluripotent stem cells that can be derived from genetic modification of non-pluripotent somatic cells (Takahashi and Yamanaka, 2006). Although these two types of ES cells are capable of unlimited cell division and differentiation into all three germ layers (endoderm, ectoderm and

mesoderm), their clinical exploitation has been obscured by the possibility of tumorigenesis after transplantation *in vivo* (Arnhold et al., 2000; Reubinoff et al., 2000; Erdo et al., 2003). In contrast to the ES cells, adult stem cells have less ability of self-renewal, and their differentiation usually occurs within a cell lineage from which they originated. For example, mesenchymal stem cells (MSCs) can only differentiate into mesodermal lineages, such as bone, cartilage and adipose tissues (Zuk et al., 2002). Interestingly, although these cells have been described as multipotent stem cells as differentiation potentials are essentially restricted to only mesodermal lineages, a recent report showed that they also have a potential to differentiate into other cell lineages, such as endoderm and ectoderm origins (a process referred to as transdifferentiation) (Alaminos et al., 2010).

To date, host-specific MSCs are highly desired in regenerative medicine because they can be logically isolated and propagated from many tissue origins, such as bone marrow and adipose tissue. Canine MSCs have been demonstrated to have the potential for use in cell-based therapy, particularly for bone and soft tissue regeneration (Kraus and Kirker-Headm, 2006; Hiyama et al., 2008; Jang et al., 2008; Jung et al., 2009; Zucconi et al., 2010). It is commonly accepted that the identification of MSCs relies on the expressions of positive (Stro-1, CD 90, CD 105, CD 44, CD 73) and negative markers (i.e., markers for hemopoietic cells: CD 34 and 45). In dogs, only the attachment property of MSCs to plastic culture dishes is commonly-accepted method for the selection of canine MSCs, while the use of MSC markers for identification varies from one laboratory to the next.

The present study was aimed at evaluating the isolation and the identification techniques for canine mesenchymal stem cells (MSCs) that are derived from bone marrow aspirates and studying their differentiation potentials.

Materials and Methods

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, St Louis, USA, unless otherwise specified.

Isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow aspirates: Bone marrow aspirates were obtained from 4 healthy dogs. The procedure for obtaining these aspirates was reviewed and approved by the Ethical Committee for Animal Use, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University (Accession No. 0931055). In brief, the animals were premedicated intramuscularly with 0.1 mg/ml Acepromazine maleate (Vetranquil™; Ceva Sante animal, Libourne, France) and 0.25 mg/kg morphine sulphate (Food and Drug Administration, Bangkok, Thailand). After 15-20 min, anesthesia was induced intravenously with 4 mg/kg propofol (Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Austria). The bone marrow contents were collected from either the humerus or iliac crest into a 10-ml heparinized syringe (containing 1000 IU heparin). The bone marrow aspirates were then transported to the laboratory (at 26°C) and

processed within 4 hours after bone marrow aspiration. Upon arrival, the bone marrow aspirates were first layered onto gradient density (Histopaque®-1077 density 1.077 g/ml) and centrifuged at 26°C and 400g for 30 min. The mononuclear cells at the interface between each of the bone marrow aspirates and Histopaque® were used. Occasionally, remaining red blood cells were mixed and incubated with an equal volume of red blood cell lysis buffer for 5 min. The mixture was then centrifuged and resuspended with 1 ml of culture medium.

Culture of canine bone marrow mesenchymal stem cells: Following MSC isolation, presumptive MSCs were seeded into a 100 mm-Petri dishes (BD-Falcon™, Franklin Lake, NJ, USA), containing low glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, USA), 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Non-adherent cells were removed by washing the culture dishes with Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; Invitrogen) and the culture medium was changed every 2-3 days. Adherent cells were cultured (passage 0) until they reached approximately 70-80% confluence. To sub-passage, the adherent cells were washed twice with DPBS and then digested with 0.125% trypsin-EDTA (Gibco™, Invitrogen) for 2 min and the enzyme was inactivated with an excessive amount of fetal bovine serum in DMEM. The cell suspension was then centrifuged at 4°C and 1000 rpm for 5 min. If cryopreservation of cells were needed, a freezing medium containing 10% (v/v) dimethylsulphoxide (DMSO) and 90% (v/v) fetal bovine serum was added to the cells. The equilibrated cell suspension was added into a 1-ml cryovial (Corning, USA). The freezing rate was controlled at 1°C/min using a cryobox.

Cell morphology and population doubling time: MSCs were daily examined for cell morphology at 100 and 200x magnification using a phase contrast microscope (CKX41, Olympus, Japan). At the 3rd passage, the MSCs were plated into a 12-well plate at 20,000 cells/cm² (approximately, 40-50% confluence). The MSCs were then trypsinized with trypsin-EDTA, and the total number of cells in each culture well was counted using a hemocytometer at 24 hours interval for 3 consecutive days. The doubling time was calculated using the equation, $\ln(2)/\text{growth rate}$, whereas the growth rate referred to the number of doublings that occurred per unit of time.

Flow cytometry analysis: Canine MSCs at the 3rd passage were immunologically examined for surface markers of MSCs. Because there is no universal marker that is specific to MSCs, identification of MSCs therefore relied on both positive and negative markers. To perform flow cytometry, the MSCs were first dissociated from the Petri dishes with Trypsin-EDTA and then centrifuged. A total of 200,000 to 300,000 cells were stained with each respective antibody. Rat monoclonal anti-canine CD 34 conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (a

marker for hemopoietic stem cells) was used as the negative MSC marker. Rat monoclonal anti-canine CD 90 (AbD serotec, Kidlington, UK) with rabbit anti-rat FITC secondary antibody and monoclonal anti-canine CD44 conjugated with allophycocyanin (APC) (R&D system, Minneapolis, USA) were used as MSC positive markers. Fluorescently-labeled MSCs were finally washed once, fixed with 1% (w/v) paraformaldehyde in PBS and stored in the dark at 4°C until analysis. Non-staining MSCs and MSCs labeled with only the secondary antibody were used as controls. At least 20,000 MSCs were used to test the presence of each cell surface marker, using flow cytometry (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA).

Differentiation of MSCs: The MSCs derived from the canine bone marrow at the 3rd-5th passages from 2 dogs were used to demonstrate their differentiation potentials. MSCs were induced to differentiate into bone, cartilage and adipose tissues according to the methods as previously described (Bosch et al., 2006), with some modifications. For bone differentiation, MSCs were first sub-cultured to reach approximately 80% confluence, and the bone induction medium consisting of DMEM supplemented with 10% (v/v) FCS, 100 nM dexamethasone, 50 ng/ml ascorbic acid and 10 mM Beta-glycerophosphate was added into the Petri dishes. The bone induction medium was changed every 2-3 days. A three-dimensional culture system was used to induce cartilage differentiation. MSCs were dissociated and then transferred to a 15-ml conical tube (BD-Falcon™, Franklin Lake, NJ, USA). After centrifugation, aggregated cells were re-suspended with the cartilage induction medium containing DMEM, 10 ng/ml TGF-β1, 100 nM dexamethasone and 50 ng/ml ascorbic acid 2-phosphate. The medium was changed every 2-3 days. The adipose tissue differentiation was performed with monolayer MSCs, as previously described (Zuk et al., 2002). The MSCs were treated with 4 cycles of adipogenic induction and maintenance (each cycle consisted of 3 days of adipogenic induction and 2 days of adipogenic maintenance). The adipogenic induction medium consisted of DMEM 10% (v/v) FCS, 0.1 mg/ml human recombinant insulin, 10 mM sodium pyruvate, 1 mM methyl isobutylxanthine (IBMX), 0.2 mM indomethacin and 1 μM dexamethasone. Adipogenic maintenance was prepared in a similar manner to adipogenic induction, but without IBMX, dexamethasone and indomethacin. Neurogenic induction was performed with DMEM supplemented with 200 μM butylated hydroxyanisole, 25 mM KCl, 2mM valproic acid, 10 μM forskolin, 1 μM hydrocortisone, 5 μg/ml Insulin and 2% (v/v) DMSO.

Assessment of MSC differentiation: After the fixation of MSC-derived bone tissues in 4% (w/v) paraformaldehyde, the tissues were embedded in paraffin for histological analysis. The histological sections of the tissues were stained with Von Kossa

and alcian blue to detect the deposition of calcium phosphate and glycosaminoglycans enriched-matrix, indicating the successful differentiation of MSCs into bone and cartilage tissues, respectively. The presence of adipogenesis was confirmed by oil red O staining which detects intracellular neutral triglycerides and lipids.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR): Total RNA was extracted from undifferentiated MSCs that were cultured in monolayer and differentiated cell pellets collected on D9 and D21 of differentiation using Absolutely RNA® Nanoprep Kit (Stratagene, Agilent Technologies, USA). The contaminating genomic DNA was removed during the purification steps by DNase I treatment according to the manufacturer's instructions. Total RNA was eluted from the purification column with sterile distilled water and was quantified using a NanoDrop® 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Gene-specific oligonucleotide primers were synthesized by BioDesign Co., Ltd. (Bangkok, Thailand). Two target genes reported to be involved in osteogenic lineage differentiation, i.e., collagen type I alpha I (COL1A1) and bone γ-carboxyglutamate protein (GLA), were selected for this experiment. A housekeeping gene, i.e., glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), was included as the internal control and reference. Oligonucleotide sequences, PCR product size, Genbank accession number and references of primers are shown in Table 1.

cDNA was synthesized from an aliquot of 150 to 200 ng of total RNA using random hexamer primers and Omniscript® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). One microliter of RT reaction was mixed with 12.5 μl of GoTaq® Green Master Mix (Promega, WI, USA), 6.25 μM each of forward- and reverse primers, and sterile distilled water to reach the final volume of 25 μl. PCR was carried out on an Amplitrone™ thermocycler machine (Nyxtechnik, CA, USA). The suitable cycle condition was determined and applied for each primer pair as follows: GAPDH, 94°C for 2 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 45 sec, plus the final extension at 72°C for 5 min; COL1A1 and GLA, 94°C for 1 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 1 min, plus the final extension at 72°C for 10 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% ethidium bromide incorporated-agarose gels in Tris-Boric-EDTA (TBE) buffer. The images of agarose gels were taken using GeneFlash Gel Documentation (Syngene, Synoptic Ltd., Frederick, USA) and the calculation of relative intensity of target gene mRNA expression signal utilizing the expression intensity of GAPDH as the reference was carried out using the Scion Imaging program (Beta 4.0.3; Scion Corporation, MD).

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

Gene	Sequences	Size (bp)	Accession number	References
COL1A1	(F) 5'-CAC CTC AGGAGA AGG CTC AC-3'	123	NM_001003090.1	Seo et al. (2009)
	(R) 5'-ATG TTC TCG ATC TGC TGG CT-3'			
GLA	(F) 5'-GTG GTG CAA CCT TCG TGT C-3'	131	XM_547536.2	Seo et al. (2009)
	(R) 5'-GCT CGC ATA CTT CCC TCT TG-3'			
GAPDH	(F) 5'-GGA GAA AGC TGC CAA ATA TG-3'	191	AB038241	Sano et al. (2005)
	(R) 5'-CAG GAA ATG AGC TTG ACA AAG TGG-3'			

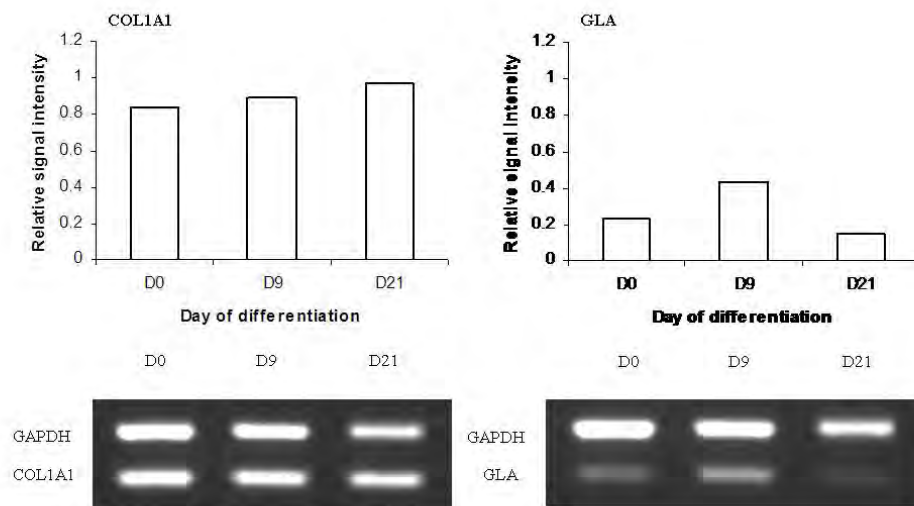


Figure 4 Relative signal intensity of COL1A1 and GLA expression compared with GAPDH expression on D0, D9 and D21 of dog MSCs bone differentiation *in vitro*.

Results

Fibroblastic-like cells were isolated from canine bone marrow (Fig 1). These cells adhered to the culture dish by 24 hours of culture. At passage 3, putative MSCs were cultured and analyzed for expression of MSC surface markers and population doubling time. These MSCs were expressed mesenchymal stem cells markers (CD 44 and CD 90) and also negative to hemopoietic stem cells marker (CD 34). Two canine MSCs (dog 3 and dog 4) strongly expressed CD 44 (99.9% and 86.7%) and CD 90 (92.5%, and 95.3%), respectively (Fig 2). However, the growth rates of MSCs (population doubling time) were found to be different among putative MSCs from different dogs (46.1, 24.2, 38.8 and 32.4 hours).

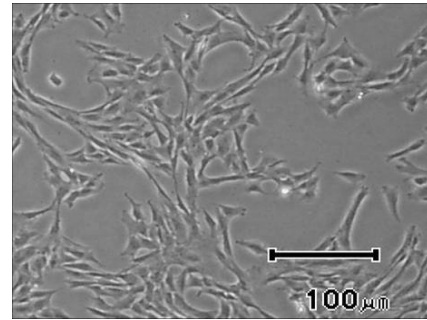


Figure 1 Fibroblastic-like mesenchymal stem cells derived from bone marrow aspirate

We further demonstrated that these cells were also capable of differentiation into mesodermal lineages including bone, cartilage and adipose tissues. After 21 days of differentiation, differentiated MSCs were essentially positive to oil red O, Von kossa and alcian blue as indicators of fat, bone and cartilage formation respectively (Fig 3). In addition, MSCs were also transdifferentiated into multiple-process neuron-like cells soon after treating MSCs with neurogenic medium (Fig 3).

COL1A1 and GLA expression was detected in undifferentiated MSCs. The early stage of differentiation up-regulated the genes as seen in the increment of relative signal intensity on D9 post culture. COL1A1 mRNA increased continuously on D21 post differentiation, while the expression of GLA gene dropped below the starting point (Fig 4).

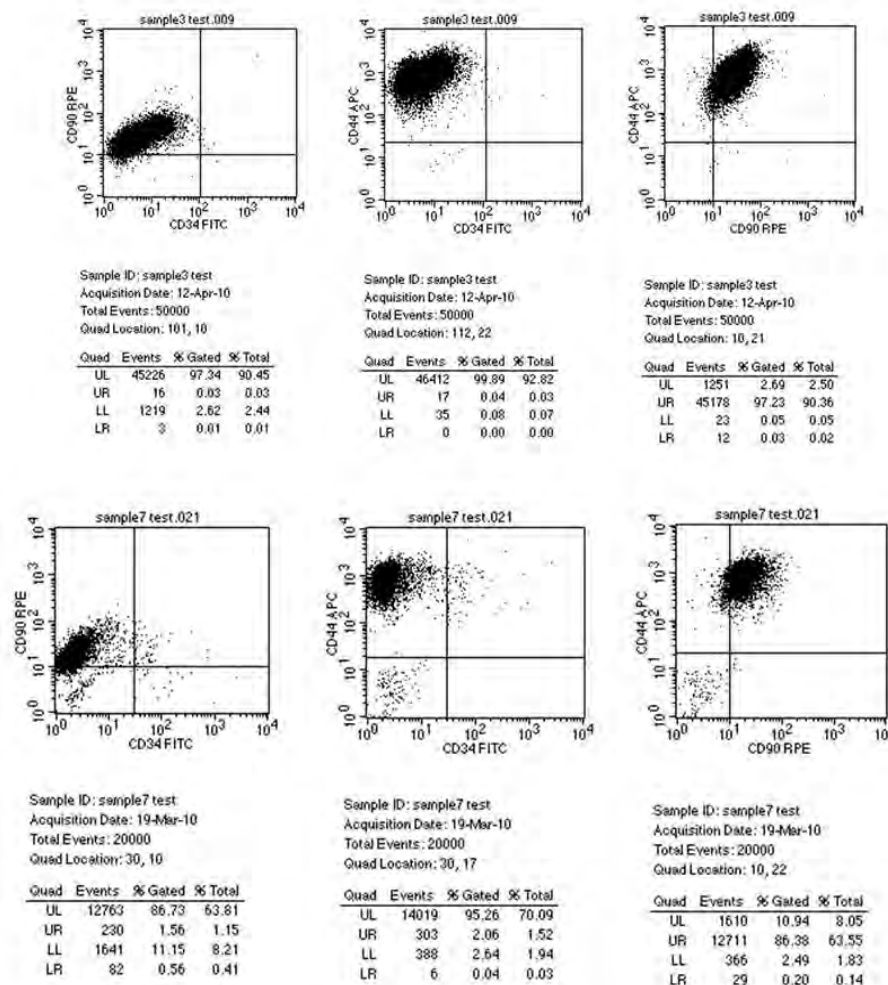


Figure 2 Expressions of CD 44 and CD 90 in canine MSCs. Samples from dog 3 (upper panel) and dog 4 (lower panel) were analyzed by flow cytometry.

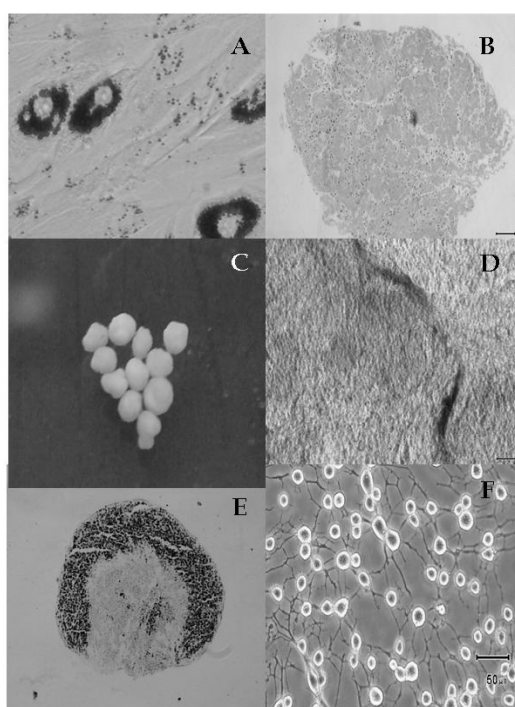


Figure 3 Differentiation potential of canine mesenchymal stem cell (A) adipose tissue; cartilage (B) bone (C and E) and neuron-like cells (F). Adipocytic cells accumulated with neutral lipids as shown by oil red O staining. Cartilaginous and bone tissues were confirmed by the presence of glucosaminoglycan enriched matrix, calcium phosphate and alkaline phosphatase activity (D) using alcian blue, Von kossa and leukocyte alkaline phosphatase kit, respectively.

Discussion

In the current study, we successfully isolated well-defined mesenchymal stem cells derived from canine bone marrow. These specialized cells are classified as multipotent stem cells because they have the capability of differentiation into mesodermal lineage. MSCs have been isolated from many tissues of the body such as bone marrow (Wagner et al., 2005; Kern et al., 2006), adipose tissue (Zuk et al., 2002), umbilical cord (Lee et al., 2004; Koch et al., 2007) and dental pulp (Jo et al., 2007; Waddington et al., 2009). In dog, the data in regard to the isolation, characterization and clinical use of canine MSCs have been limited. Until recently, canine MSCs have been isolated from bone marrow (Csaki et al., 2007; Jafarian et al., 2008), adipose tissue (Neupane et al., 2008; Vieira et al., 2010) and umbilical cord (Seo et al., 2009). Because there is no specific marker for the identification of canine MSCs, the isolation and identification technique has therefore been different among laboratories. MSCs from many species demonstrate antigen specific on cell membrane such as CD 29, CD 44, CD 90, CD 105 and Stro-1 (Martin et al., 2002; Bosnakovski et al., 2005; Csaki et al., 2007; Meirelles and Nardi, 2009; Rho et al., 2009). In the current study, only canine antibodies were proven a good candidate for MSC isolation when compared with antibodies from other animals such as anti-mouse Stro-1 and anti-human CD 105 (unpublished data), suggesting

the specificity of canine surface antigen. This phenomenon is one of the hallmarks affecting the exploitation of MSCs for clinical use since MSCs are located in the bone marrow with a mixed population of cells and it has been estimated that there are only 0.0001-0.01% MSCs in the nucleated cells of bone marrow aspirate (Pittenger et al., 1999). Most investigators have isolated MSC using their capacity to adhere to a plastic culture dish. However, macrophages, endothelial cells, lymphocytes, and smooth muscle cells can also adhere to culture plate and therefore contaminate the MSC preparations. The isolation, identification and purification of canine MSCs recently become an important issue for the clinical use of MSCs. Although legal regulation use of canine MSCs has yet to be discussed, the minimum requirements for clinical use of MSCs have been announced for human (Dominici et al., 2006). Human MSCs must demonstrate the fibroblast-like morphology and have the ability to adhere to a plastic culture dish, positively express (> 95%) cell surface receptors (e.g. CD 29, CD 44, CD 73, CD 105, CD 106, Stro-1, etc.) and negatively express (< 2%) the hematopoietic lineage markers (e.g. c-Kit, CD 14, CD 34, CD 45). More importantly, these cells must show a capability of differentiation into mesodermal lineage

(bone, cartilage and adipose tissues). In the current study, we found that MSCs, at least under our conditions, were already committed to differentiate into bone and cartilage as they prematurely expressed GLA and COL1A1 (early markers for bone and cartilage differentiation) prior to differentiation induction. It is also possible that the MSCs used in this study had spontaneous differentiation during culture. Until recently, study of pathways regulating the bone and cartilage differentiation of canine bone marrow MSCs is still required in order to improve the efficiency of in vitro bone and cartilage differentiation for cell- or tissue-based engineering. Volk et al. (2005) reported that canine MSCs could be efficiently differentiated into bone using bone morphologic protein 2 (BMP-2) which was similar to other species (Li et al., 2007). In addition to the differentiation capability into mesodermal lineage, transdifferentiation of MSCs to neuron-like cells has been believed to hold a great promise in cell treatment therapy (Zipori, 2004; Krabbe et al., 2005; Bongso et al., 2008). However, this transdifferentiation of MSCs into neuron-like cells has been contradictory especially the toxic effect of DMSO on actin microfilament during differentiation (Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004). Interestingly, it has been shown that MSCs expressed neuronal specific genes even though they were not treated with neuronal differentiation medium (Yamaguchi et al., 2006; Kamishina et al., 2006). In this study, we only recorded morphological changes of canine MSCs after neuronal differentiation. The 'true' capability of canine MSCs in neuron differentiation has yet to be examined in the prospective study.

In conclusion, our study demonstrates that canine mesenchymal stem cells can be isolated from bone marrow, and these MSCs are capable of differentiation into specific mesodermal lineage (bone, cartilage and adipose tissue) following passages and in vitro differentiation.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Innovation Center for Veterinary Science, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Chulalongkorn University Centenary Academic Development Project, the Thailand Research Fund MRG5380153, TRF-DBG5280015 and TRF Senior Research Scholars RTA-5080010.

References

- Alaminos, M., Pérez-Köhler, B., Garzón, I., García-Honduvilla, N., Romero, B., Campos, A. and Buján, J. 2010. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 223: 640-647.
- Arnhold, S., Lenartz, D., Kruttwig, K., Klinz, F.J., Kolossov, E., Hescheler, J., Sturm, V., Andressen, C. and Addicks, K. 2000. Differentiation of green fluorescent protein-labeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum. *J. Neurosurg.* 93: 1026-1032.
- Barry, F.P. and Murphy, J.M. 2004. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36: 568-584.
- Bongso, A., Fong, C.Y. and Gauthaman, K. 2008. Taking stem cells to the clinic: Major challenges. *J. Cell Biochem.* 105: 1352-1360.
- Bosch, P., Pratt, S.L. and Stice, S.L. 2006. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol. Reprod.* 74: 46-57.
- Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G., Takagi, S., Okumura, M. and Fujinaga, T. 2005. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 319: 243-253.
- Csaki, C., Matis, U., Mobasheri, A., Ye, H. and Shakibaei, M. 2007. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: A biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem. Cell Biol.* 128: 507-520.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J. and Horwitz, E.M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.

- Erdo, F., Buhrle, C., Blunk, J., Hoehn, M., Xia, Y., Fleischmann, B., Föcking, M., Küstermann, E., Kolossov, E., Hescheler, J., Hossmann, K.A. and Trapp, T. 2003. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23: 780-785.
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
- Hiyama, A., Mochida, J., Iwashina, T., Omi, H., Watanabe, T., Serigano, K., Tamura, F. and Sakai, D. 2008. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J. Orthop. Res.* 26: 589-600.
- Jafarian, M., Eslaminejad, M.B., Khojasteh, A., Mashhadi Abbas, F., Dehghan, M.M., Hassanizadeh, R. and Houshmand, B. 2008. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: A comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 105: 14-24.
- Jang, B.J., Byeon, Y.E., Lim, J.H., Ryu, H.H., Kim, W.H., Koyama, Y., Kikuchi, M., Kang, K.S. and Kweon, O.K. 2008. Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenesis in bone defect model dogs. *J. Vet. Sci.* 9: 387-393.
- Jing, D., Parikh, A., Canty, J.M. Jr and Tzanakakis, E.S. 2008. Stem cells for heart cell therapies. *Tissue Eng. Part B Rev.* 14: 393-406.
- Jo, Y.Y., Lee, H.J., Kook, S.Y., Choung, H.W., Park, J.Y., Chung, J.H., Choung, Y.H., Kim, E.S., Yang, H.C. and Choung, P.H. 2007. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng.* 13: 767-773.
- Jung, D.I., Ha, J., Kang, B.T., Kim, J.W., Quan, F.S., Lee, J.H., Woo, E.J. and Park, H.M. 2009. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J. Neurol. Sci.* 285: 67-77.
- Kamishina, H., Deng, J., Oji, T., Cheeseman, J.A. and Clemmons, R.M. 2006. Expression of neural markers on bone marrow-derived canine mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 67: 1921-1928.
- Kavalkovich, K.W., Boynton, R.E., Murphy, J.M. and Barry, F. 2002. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 38: 457-466.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. and Bieback, K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 24: 1294-1301.
- Kim, N.R., Kang, S.K., Ahn, H.H., Kwon, S.W., Park, W.S., Kim, K.S., Kim, S.S., Jung, H.J., Choi, S.U. and Ahn, J.H. and Kim, K.R. 2009. Discovery of a new and efficient small molecule for neuronal differentiation from mesenchymal stem cell. *J. Med. Chem.* 52: 7931-7933.
- Koch, T.G., Heerkens, T., Thomsen, P.D. and Betts, D.H. 2007. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.* 7: 26.
- Krabbe, C., Zimmer, J. and Meyer, M. 2005. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. *APMIS.* 113: 831-844.
- Kraus, K.H., and Kirker-Headm C. 2006. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.* 35: 232-242.
- Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.M., Lee, K.D., Hsieh, S.L. and Chen, T.H. 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood.* 103: 1669-1675.
- Li, H., Dai, K., Tang, T., Zhang, X., Yan, M. and Lou, J. 2007. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 356: 836-842.
- Lu, P., Blesch, A. and Tuszynski, M.H. 2004. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J. Neurosci. Res.* 77: 174-191.
- Martin, D.R., Cox, N.R., Hathcock, T.L., Niemeyer, G.P. and Baker, H.J. 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp. Hematol.* 30: 879-886.
- Martin, G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned

- by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 7634-7638.
- Mayorga, M., Finan, A. and Penn, M. 2009. Pre-transplantation specification of stem cells to cardiac lineage for regeneration of cardiac tissue. *Stem Cell Rev.* 5: 51-60.
- Meirelles, Lda S. and Nardi, N.B. 2009. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front. Biosci.* 14: 4281-4298.
- Neuhuber, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., Mackay, A. and Fischer, I. 2004. Reevaluation of *in vitro* differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *Neurosci. Res.* 77: 192-204.
- Neupane, M., Chang, C.C., Kiupel, M. and Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2008. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A.* 14: 1007-1015.
- 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. and Marshak, D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284: 143-147.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A. and Bongso, A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18: 399-404.
- Rho, G.J., Kumar, B.M. and Balasubramanian, S.S. 2009. Porcine mesenchymal stem cells--current technological status and future perspective. *Front. Biosci.* 14: 3942-3961.
- Ribitsch, I., Burk, J., Delling, U., Geißler, C., Gittel, C., Jülke, H. and Brehm, W. 2010. Basic science and clinical application of stem cells in veterinary medicine. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 123: 219-263.
- Sano, J., nagafuchi, S., Yamazaki, J., Oguma, K., Kano, R. and Hasegawa A. 2005. Effect of antineoplastic drugs on the expression of Bcl-2 and Bcl-xL genes in the feline T-cell leukemia cell line. *Res. Vet. Sci.* 79: 197-201.
- Seo, M.S., Jeong, Y.H., Park, J.R., Park, S.B., Rho, K.H., Kim, H.S., Yu, K.R, Lee, S.H., Jung, J.W., Lee, Y.S. and Kang, K.S. 2009. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *J. Vet. Sci.* 10: 181-187.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
- Trzaska, K.A., Kuzhikandathil, E.V. and Rameshwar, P. 2007. Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 25: 2797-2808.
- Vieira, N.M., Brandalise, V., Zucconi, E., Secco, M., Strauss, B.E. and Zatz, M. 2010 Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.* 19: 279-289.
- Volk, S.W., Diefenderfer, D.L., Christopher, S.A., Haskins, M.E. and Leboy, P.S. 2005. Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 66: 1729-1737.
- Waddington, R.J., Youde, S.J., Lee, C.P. and Sloan, A.J. 2009. Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. *Cells Tissues Organs.* 189: 268-274.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W. and Ho, A.D. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* 33: 1402-1416.
- Wobus, A.M. and Boheler, K.R. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* 85: 635-678.
- Yamaguchi, S., Kuroda, S., Kobayashi, H., Shichinohe, H., Yano, S., Hida, K., Shinpo, K., Kikuchi, S. and Iwasaki, Y. 2006. The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells (BMSC)--a preliminary study using microarray analysis. *Brain Res.* 1087: 15-27.
- Zipori, D. 2004. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells Mol. Dis.* 33: 211-215.

- Zucconi, E., Vieira, N.M., Bueno, D.F., Secco, M., Jazedje, T., Ambrosio, C.E., Passos-Bueno, M.R., Miglino, M.A. and Zatz, M. 2010. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein--a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells Dev.* 19: 395-402.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. and Hedrick, M.H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4279-4295.

Comparison of isolation techniques for mesenchymal stem cells (MSCs) derived from canine bone marrow and the effects of MSCs loaded onto polycaprolactone hydroxyapatite scaffold on non-union bone healing

Chalika Wangdee ^a , Kumpanart Soontornvipart ^a , Wijit Bunlunara, Sasijaras Tantrajak ^c , Mongkol Techakumphu ^b , Prasit Pavasant ^d , Pitt Supaphol ^e , Theerawat Tharasanit ^{b,*}

^a *Department of Veterinary Surgery, ^bDepartment of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

^c *Veterinary Surgery Unit, Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

^d *Department of Anatomy, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

^e *The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

* Corresponding author. Tel.: +662 2189644

E-mail address: Theerawat.t@chula.ac.th

Manuscript in preparation

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) have increasingly become an attractive aspect for tissue engineering and modulation of bone healing. However, limitation of cell numbers at isolation and culture has restricted the clinical exploitations. In experiment 1, bone marrow contents were collected from 7 dogs and then submitted to 3 different MSC isolation techniques (direct plating, red blood cell lysis treatment and Percoll gradient density). The number of cells and viability for each technique were recorded. The characterization of isolated MSCs included plastic adherence, expression of MSC markers and in vitro differentiation.

In order to study in vivo osteogenic capacity of derived MSCs, non-union ulna lesions (n=3) were firstly induced by transplantation of a composite of polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) scaffold onto a critical size ulna bone defect. The MSCs were then injected into the lesions. The non-union sites were examined by radiography, angiography and histology at 2, 4, 6, 8 and 12 weeks after MSC injection.

Gradient density (1.08 ± 0.92) and RBC lysis (0.94 ± 0.55) techniques yielded higher number ($\times 10^6$) of putative MSCs on day 7 of culture compared with direct plating technique (0.26 ± 0.28), while the percentages of viability and osteogenic differentiation property were not significantly different among the isolation techniques. A large number of isolated MSCs, irrespective the isolation techniques expressed all MSC markers used (CD 44, CD 90). However, the numbers of MSC-marker positive cells were significantly reduced when compared between MSCs at passage 3 and 5

For all MSC transplanted dogs, neither radiological changes at scaffold-ulna interface nor callus formation was observed. At 16 weeks after MSC injection, the angiogram indicated an increased neovascularization. This was confirmed by the histological finding that there was an improvement of vascularization within the thicker fibrinous tissue surrounded the scaffold.

It is concluded that gradient density and RBC lysis treatment are suitable MSC isolation techniques in terms of the numbers of cells obtained and also their MSC properties. However, the potential use of these MSCs following injection to non-union bone site was compromised possibly caused by a lack of osteogenic stimulation.

Keywords: Bone marrow mesenchymal stem cells, dogs, Differentiate, Composite scaffold, Non-union

1. Introduction

In dogs with impaired bone healing, the incidence of long bone non-union is 3.4% and the most common site of non-union (40-60%) is often associated with the radius/ulna (Bartels, 1987). The etiology of a non-union may involve multiple factors including a poor blood supply to the affected area, poor apposition of fractured bone-end, motion at the fracture site, large fracture gap, pathological fractures, foreign bodies, large quantities of necrotic bone, infection and non-justified corticosteroid therapy (Calori et al., 2011; Vertenten et al., 2010). For treatment of non-union bone, autologous bone graft is the gold standard that leads to bone union through osteogenecity, osteoconductivity and osteoinductivity. However, it carries with it a high risk of fracture and infection, pain at the donor site and less cancellous bone (Lee et al., 2009). Such shortcomings can be addressed by bone tissue engineering, an interdisciplinary field that applies principles of bioengineering, material science and life science to develop biological substitutes that restore, maintain, and improve tissue function (Langer and Vacanti, 1993).

Stem cells are anticipated to serve as a powerful tool for tissue engineering in human and veterinary medicine (Barry and Murphy, 2004; 2008; Ribitsch et al., 2010). Mesenchymal stem cells (MSCs) are able to self-renew and differentiate into mesodermal lineage such as bone, cartilage and adipose tissues (Zuk et al., 2002). They also can potentially transdifferentiate into other cell lineages (Alaminos et al., 2010). Canine MSCs have been demonstrated to have potential for cell-based therapy for bone and soft tissue regeneration (Jang et al., 2008; Kraus and Kirker-Head, 2006; Zucconi et al., 2010). Although bone marrow is the major accessible and enriched source of mesenchymal stem cells, the numbers of MSCs obtained from bone marrow is generally insufficient for transplantation since the population of MSCs has been reported to range about 0.01 to 0.001% of bone marrow mononuclear cells in rodents and felines (Martin et al., 2002), (Kadiyala et al., 1997). This therefore highlights the importance of the technique for isolation of MSCs. Because the specific markers for bone marrow derived MSCs have yet to be identified, the characterization of MSCs usually relies upon the traditional MSC properties. These include plastic adherence, expression of some surface markers such as CD 90, CD 105

and Stro-1, while lacking the expression of hemopoietic stem cell marker (CD 34) (Wagner et al., 2005; Dominici et al., 2006). More importantly, these cells have a capability to differentiate into mesodermal lineage including bone, cartilage and adipose tissue (Bosch et al., 2006) or transdifferentiate into other cell lineages such as neuron (Krabbe et al., 2005). In dog, direct plating of bone marrow aspirate is frequently used for bone marrow derived mesenchymal stem cells. However, no such information about comparison of the technique for MSC isolation has been reported. It is therefore important to standardize the MSC isolation technique in order to increase the cell homogeneity of the MSCs population, thereby improving efficiency for bone regeneration (Roberts et al., 2008).

Scaffold, a three-dimensional porous structure with interconnection between pores, allows cell attachment that can replace defective bone. Polycaprolactone (PCL) is a biodegradable synthetic polymer (Amato et al., 2007; Williams et al., 2005) with advantages over other polymeric materials for bone formation and remodeling phase, including good biocompatibility, higher and prolonged mechanical strength, more stability in ambient conditions, and a slower biodegradation rate (Gunatillake and Adhikari, 2003; Shor et al., 2007). Hydroxyapatite (HA) ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) is known as a ceramic of choice for bone tissue engineering because its chemical and crystal properties resemble to the mineral component of bone tissue, giving it to have an excellent biocompatibility (Di Silvio et al., 2002; Neuendorf et al., 2008; Wang, 2006), osteoconductive capacity and also ability to bind directly to host bone (Hutmacher et al., 2007). The combination of PCL and HA synergistically improves mechanical properties, osteoconductivity and osteointegrative potential of the scaffold (Di Silvio et al., 2002; Neuendorf et al., 2008; Wang, 2006). The objectives of this study were to compare the effects of isolation techniques on derivation of bone marrow mesenchymal stem cells and characteristics and also to examine the effect of MSC transplantation on bone healing of an experimentally 'induced' non-union ulna bone in dogs.

2. Materials and methods

All chemicals used in this study were purchased from Sigma Aldrich, St Louis, USA, unless otherwise specified.

2.1 Collection and isolation of canine bone marrow derived mesenchymal stem cells

This study was approved by the Committee for the Ethical Care of Animals of the Chulalongkorn University. Seven mature dogs, mixed breeds, weighed between 10 to 15 kg

were enrolled in this study. All dogs were clinically examined and remained healthy throughout the experiment. Complete blood counts and blood chemical profiles were also examined before surgery. Acepromazine (0.02 mg/kg) and morphine (0.5 mg/kg) were administered intramuscularly for sedation and pain control. Anesthesia was induced with propofol (Fresenius Kabi, Austria GmbH, Graz, Austria) and maintained with isoflurane in 100% oxygen delivered via a rebreathing anesthetic circuit. Cefazolin (25 mg/kg) was administered intravenously as prophylactic antibiotic. Epidural anesthesia using 5% bupivacaine (1 mg/kg) combined with 0.1 mg/kg morphine was additionally performed in order to relieve pain sensation caused by bone marrow aspiration procedure. Fifteen milliliters of bone marrow were harvested from the iliac crest of each dog with a heparinized syringe.

The bone marrow aspirate (15 ml) was equally divided into 3 aliquots, and each aliquot (5 ml) of bone marrow was then submitted to one of the following isolation techniques: 1) direct plating, 2) red blood cell lysis treatment and 3) gradient density.

2.1.1 Direct plating

Direct plating was performed by adding bone marrow aspirate directly into a 10 cm Petri-dish (BD-Falcon™, Franklin Lake, NJ, USA) containing with 7 ml of MSC culture medium. After 24 of culture, the attached cells were washed with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without calcium and magnesium (DPBS) for 2-3 times, and the fresh MSC medium was then added.

2.1.2 Red blood cell lysis treatment

Red blood cell lysis buffer (8.3 g/L ammonium chloride in 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 ± 0.2) was used to eliminate the contaminated red blood cells (RBC) in the bone marrow aspirate. The RBC lysis buffer was mixed at a ratio of 1: 1 with bone marrow aspirate and then incubated at room temperature (approximately 25-26 °C) for 5 min. The mixture was then centrifuged at 1000 rpm for 5 min. After the supernatant was discarded, the pellet was resuspended with MSC medium, and the isolated cells were cultured in MSC culture medium. The non-attached cells were washed out in the following day.

2.1.3 Gradient density

Bone marrow aspirate (5 ml) was gently layered onto a histopaque® 1077 (density 1.077 ± 0.001) in a 15 ml conical tube (BD-Falcon™, Franklin Lake, NJ, USA). The

centrifugation was performed at 26 °C and 400g for 30 min, and the interface containing mononuclear cells was then collected. The presumptive MSCs were washed with MSC culture medium for two times prior to culture.

2.2 Culture of bone marrow derived mesenchymal stem cells

Following MSC isolation (day 0) as previously described, the isolated cells were allowed to attach to the culture plate for 24 h prior to washing with DPBS (Invitrogen). These cultured cells were assigned as primary cells at passage 0 (P₀). MSC culture medium was composed of a low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (low glucose DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, CA, USA), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, USA), 100 unit/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin, 8 mg/ml gentamicin and 5 µg/ml amphotericin B.

Subculture of MSCs was performed after treating the cells with 0.05% (w/v) trypsin-EDTA (Invitrogen). The disaggregated cells were then centrifuged and split into new petri-dish at a ratio of 1:3. Putative MSCs at passages 3 (P₃) and passage 5 (P₅) were used for flow cytometric analysis in order to examine the expression of cell-surface antigens and also for *in vitro* differentiation. In all cases, the culture condition was performed at 37°C in a humidified condition of 5 % CO₂ in air.

2.3 Assessing the characteristics of canine mesenchymal stem cells

2.3.1 Flow cytometry

The examination of MSCs was performed as essentially described by Tharasanit et al. (2011). Canine MSCs at the 3rd and 5th passages from a total of 5 dogs (Dog no. 1, 4, 6, 7 and 8) were immunologically examined for surface markers. These makers included the positive (CD 44, CD 90) and negative (CD 34) makers. The MSCs were first dissociated from the Petri dishes with Trypsin- EDTA and then centrifuged. A total of 200,000 to 300,000 cells were used for immunolabeling. Rat monoclonal anti-canine CD 90 (AbD serotec, Kidlington, UK) with rabbit anti-rat FITC secondary antibody and monoclonal anti-canine CD44 conjugated with allophycocyanin (APC) (R&D system, Minneapolis, USA) were used as MSC positive markers. Antibody against CD 34 conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Rat monoclonal anti-canine antibody was used as the negative MSC marker. Fluorescently-labeled MSCs were washed and fixed with 1% (w/v) paraformaldehyde in PBS and stored at 4°C in the dark until analysis. Non-staining MSCs and MSCs labeled with only

the secondary antibody were used as controls. At least 20,000 MSCs were analyzed by flow cytometry.

2.3.2 *In vitro* bone differentiation of MSCs

Canine bone marrow derived MSCs at passage 3 and 5 from four dogs were simultaneously induced to osteogenic lineage (each dog represented one replicate). Osteogenic differentiation was performed as essentially described by Bosch et al. (2006) with minor modifications. The MSCs were first cultured to reach approximately 80% confluence, the osteogenic medium containing MSC medium supplemented with 0.1 μ M dexamethasone, 50 μ M ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate (Merck) was then added into the culture dish. The *in vitro* bone differentiation was performed for 21 days. Von Kossa staining was used to detect deposition of calcium phosphate indicating *de novo* bone formation.

2.3.3 Scaffold preparation and MSC transplantation

PCL/HA composite scaffolds were prepared as previously described. The scaffold were cut into 10x5x25 millimeters and sterilized with 100% (v/v) absolute ethanol for 1 h. The scaffolds were washed thoroughly with sterilized distilled water and then DPBS to remove the ethanol.

Anesthesia and surgical procedures were performed as similar as previously described. Brachial plexus block using 5% bupivacaine (1.3 mg/kg) was additionally performed prior bilateral ulnar osteotomy in order to reduce pain sensation principally by noxious signal inhibition. A total of 3 dogs were induced bilateral ulnar non-union (n=6) by cutting the mid-shaft of the ulnar bone (2.5 cm) using an oscillating saw. The osteotomized sites were implanted with the PCL/HA composite scaffold to improve bone stability. After the operation, all forelimbs were applied with modified Robert Jones bandages reinforced with thermoplastic splint (Vet-lite, Bangkok, Thailand). All dogs also received enrofloxacin (5 mg/kg, Bayer®, USA) and carprofen (4 mg/kg, Pfizer, USA) orally for 7 days after implantation. All dogs demonstrated for bone non-union during 12 weeks after scaffold implantation. For transplantation, autologous MSCs were subcultured to passage 4 as previously described. After trypsinization, approximately 10×10^6 cells/ml were loaded into a syringe containing with minimum volume (0.5 ml) of DMEM supplemented with 1% (v/v) FBS. Three MSC transplanted sites (proximal, middle and distal parts of the PCL/HA

scaffold implant) were injected via a 23 G indwelling intravenous catheter with MSCs under a fluoroscope.

2.4 Examination of bone formation

2.4.1 Radiography

The lateral radiographs were taken immediately at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks post-operation in all dogs. Bone healing was evaluated using radiographic scoring system previously described by Johnson et al. (1996) as shown in table 1. Bone union was justified grading from 0 to 3 at the proximal and distal of implanted material. In addition, the new bone formation was scored 0 to 4.

2.4.2 Angiography

Fluoroscopic angiography was performed in two experimental dogs at 12 weeks before MSC injection (dog no. 1, 2) and 16 weeks after MSC injection (dog no.1) in order to observe blood vessels at an implantation site. Anesthesia and surgical procedures were performed as previously described. The 23 G intravenous catheter connected with an extension tube was inserted into the axillary vein and the radiographic contrast medium (Omnipaque®) was slowly administrated in order to observe the presence of the blood vessel at the MSC transplanted site using fluoroscopy.

2.4.3 Histological examination of MSCs loaded scaffold

The biopsy was performed both before (n=2) and after MSC transplantation (n=2) at 12 and 20 weeks post-transplantation. The biopsy samples were fixed with 10% (v/v) formalin, and the fixed samples were embedded in paraffin and processed following guideline for a routine histological procedure. The sections were stained with H&E and examined for neovascularization and bone formation under a light microscope. Occasionally, Masson's Trichrome staining was additionally performed to detect the presence of collagen fibers.

3. Statistical analysis

Values are present as means $\pm$ standard deviation (SD). Efficacy for different MSC isolation techniques on the number of isolated MSCs, viability and expression of MSC markers were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and post-hoc analysis

with LDS. Expression of MSC markers of MSCs at passage 3 and 5 was compared using a pair T-test. Angiographs and histological findings were descriptively analyzed. The differences in radiographic scores at 2, 4, 6 and 8 weeks post MSC transplantation were evaluated using Kruskal-Wallis one way analysis and Mann-Whitney U test. In all cases, statistical analysis was performed using SPSS statistical program (version 17.0). P values <0.05 were considered statistically significant.

4. Results

Following MSC isolation, putative MSCs were attached onto Petri-dish. These MSCs irrespective the MSC isolation techniques demonstrated a typical MSC morphology (figure 1 A-C). There were several cell types including thin spindle shaped, typical fibroblast-like, and mantle cells. On day 7 after MSC isolation, the total number of MSCs obtained from a 5-ml of bone marrow aspirate was ranged from 0.35×10^6 to 2.8×10^6 (1.08×10^6), 0.23×10^6 to 1.43×10^6 (mean = 0.94×10^6), 0.03×10^6 to 0.75×10^6 (mean = 0.26×10^6) for gradient density, RBC lysis treatment and direct plating, respectively. The numbers of isolated MSCs were considerably variable among donors (Table 3). On day 7 after MSC isolation, the gradient density techniques significantly increased the numbers of isolated MSCs when compared with direct plating technique ($P < 0.05$), while cell yields obtained from this gradient density was efficiently comparable to RBC lysis treatment ($P > 0.05$). However, different techniques did not affect the cell viability (Table 1).

Cell-surface antigen profiles of canine MSCs was ascertained after immunolabeling with canine-specific/cross-reacted monoclonal antibodies and examined with a flow cytometer. Ranges and averages of percentage of cells positive for CD 44, CD 90 and CD34 are shown in table 3. In general, canine MSCs were positively labeled with CD 44 and CD 90, while they were negative to CD 34 a hemopoietic stem cell marker. Canine MSCs at passage 3 and passage 5 highly expressed CD 44 (range between xxx-yyy and eee –ttt for MSCs at passage 3 and 5) and rarely expressed CD 34 in all cases . However, these cells appeared to differently express CD 90 when compared between the two passages ($P > 0.05$). In order to verify that these cells retained the MSC properties during subpassages, MSCs were induced to differentiate into osteogenesis. These cultured cell lines were able to differentiate into an osteogenic lineage as they positively stained with Von Kossa.

Following MSC transplantation into non-union sites, all three dogs could walk properly within 24 hours after surgery. Neither radiological changes at scaffold-ulna interface nor callus formation was presented at the implant sites of PCL/HA alone (figure 4A) and PCL/HA combined with MSCs (figure 4B) at 2, 4, 6, 8 and 12 weeks post-operatively. The density of the implant grafts was comparable to soft tissue density. The radiographic scores was 0 in all cases. Fluoroscopic angiography presented blood vessels at the PCL/HA grafts at 12 weeks after implantation and increasing blood vessels at PCL/HA grafts with MSCs injection at 16 weeks after injection (figure 5). Moreover, this cannot prove vascular suppling at the implant area or at deep tissue surround.

Histopathology showed a incorporation of the PCL/HA scaffold and host bone which mainly achieved with fibrocartilaginous tissue without osteoid formation. The defect site was filled with loose and unorganized connective tissue with new vascular ingrowth in the control group (figure 6 A-B). The new vascular ingrowth and the organized connective tissue were increase at the PCL/HA scaffold with MSCs injection. The capillaries and arterioles were more remarkable and thickening of fibrous tissue was mainly comprised of spindled cells with extensive collagen deposition confirmed by Masson's Trichrome staining at 16 week and 20 weeks after MSC injection (Figure 6 C-D). The numerous of multinucleated gaint cells and lymphocytes were found indicating a chronic inflammation with foreign body giant cell response to the material both before and after MSC injection.

Discussion

The in vitro study demonstrated property of BMSCs in all isolation techniques for cell behaviors with respect to cell viability, cell attachment and morphology, the proliferative capacity and the ability to differentiate into osteogenic lineage confirmed by von kossa. Whole bone marrow aspiration was the worst isolated techniques that it might RBC occupy the space of expansion. RBC lysis technique is less time consuming, and easy to perform. It is the best in terms of the number of total MSCs and simplicity so it should be used to isolate MSCs from bone marrow. However, age also affects on amount of BMSCs which MSCs decrease in elder (Dodson et al., 1996; Egrise et al., 1992) and the cells obtained from young donors grew more rapidly (Musina et al., 2005). There is a small number of MSCs at P₀ so sub-culturing of BMSCs need to increase the number of cells. We found the similar properties of cells at P₃ and P₅. According to the expression of cell-surface antigen markers,

BMSCs from all isolation techniques contain with the high percentage of cells positive on CD 44 and CD 90. The percentages of cells positive on CD 90 decrease at P₅ that it might be spontaneous differentiation of MSC. As considering of Wiesmann et al (2006), expression level of CD 90 declines as the cells mature towards osteoblast-like cells. However, it is not happen in CD 44 which is adherent marker. Furthermore, in vitro osteogenic differentiation demonstrated MSC property can be used in vivo.

In vivo study, as the combination of osteopotential cell and biodegradable scaffold is one of the most successful strategies in bone tissue engineering and the use of PCL/HA composite scaffold fabricated by solvent casting and particulate leaching techniques has been demonstrated as a promising approach for promoting new bone formation (Chuenjitkuntaworn et al., 2010). Defects in PCL/HA group were healed with fibrous connective tissue consisted of long spindle-shaped fibroblastic cells and collagen fiber as an extracellular matrix. The presence of capillaries within the graft sites suggested that PCL/HA scaffolds can support the ingrowth of vascular tissue. Similar results were obtained in the group that treated with MSC-injected PCL/HA scaffold, however, Mason's trichrome staining suggested that more collagen deposition was found when compared to PCL/HA group. Although there was a good evidence of fibrovascular tissue infiltration with an extent matrix deposition throughout the entire PCL/HA scaffold, no osteogenic differentiation was observed. In contrast to the promising result in a calvarial defect of mouse (Chuenjitkuntaworn et al., 2010) neither new bone nor callus formation was observed in defects treated with PCL/HA alone or MSC-injected PCL/HA scaffold. Several possible reasons could explain for this inconsistency. It is believed that larger animal possesses bone regenerative capacity to a lesser extent than small animal. Moreover, the physiological differences between dog and mouse with regard to the slower bone turnover rate lower basal metabolic rate and longer lifespan in dog may contribute to different bone healing result (Cook et. al., 1994). The variation in size, location and the mechanical environment of the defects may impact on the biological response to the scaffold. PCL/HA scaffolds used in the present study were not only larger in size but also thicker in dimension than the previous study. This may cause a massive release of the degradation product, caproic acid, from the scaffold and subsequently creating an unfavorable environment for bone regeneration (Böstmann et al. 1990; Bergsma et al., 1995; Prokop et al., 2004). Finally, the major consideration was given to the different types of bone defect (flat bone as a calvarial bone versus long bone). A calvarial defect is considered as a non-weight-bearing model which

experiences lesser mechanical interference than a long bone model. Therefore, a calvarial bone defect may provide more favorable environment for new bone regeneration than an ulnar bone defect in a biomechanical aspects. Histological analysis demonstrated the presence of numerous multinucleated giant cells within defect sites that implanted with PCL/HA and MSC-injected PCL/HA scaffold. These giant cells appeared adjacent to remnants of the scaffold which reflected chronic inflammation with foreign body response. For this reason, scaffold samples were sent to identify the contamination using scanning electron microscope with energy dispersive x-ray (SEM/EDX) analysis. The result of the SEM/EDX analysis showed that the scaffolds were contaminated with copper (Cu) from hydroxyapatite ceramic. Thus, chronic inflammation with foreign body giant cell response from copper contamination may result in an impaired new bone formation at defect site. Similar tissue reaction was reported by Linder and Lundskog (1975), Völker et al. (1997), Tindel et al. (2001) and Saitoh et al. (2010).

Conclusion

The basics for successful bone healing are biomechanical stability and biological vitality of the bone providing an environment in which new bone formed. Cortical bone graft, scaffold, or fibrous tissue at the long bone-defects can be used to bridge major defects or to establish the continuity of a long bone additionally to promote bony union in delayed union or non-union fractures. Moreover, non-union has a poor blood supply together with a poor general nutritional status. Polytherapy becomes the concept for the treatment of non-union using three fundamental components, osteoprogenitor cells, growth factor and osteoconductive scaffold. These are essential for the evolution of bone healing which lack any factors causing disappointing results. (Calori et al., 2011) BMP is one of the most popular growth factors which play a role in bone tissue engineering. It greatly increased osteocalcin release from MSCs promoting and healing response and induced chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow MSCs (Cheng et al., 2003; Schmitt et al., 1999; Shen et al., 2010). Additionally, it promoted the new bone formation in femoral defects in rats (Burastero et al., 2010) and increased the local population of cells and the connective tissue progenitors in a canine femur defect model with the combination of MSCs (Takigami et al., 2007). It should be used for the future study.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

References

Alaminos, M., Perez-Kohler, B., Garzon, I., Garcia-Honduvilla, N., Romero, B., Campos, A., Bujan, J., 2010. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *Journal of cellular physiology* 223, 640-7.

Amato, I., Ciapetti, G., Pagani, S., Marletta, G., Satriano, C., Baldini, N., Granchi, D., 2007. Expression of cell adhesion receptors in human osteoblasts cultured on biofunctionalized poly-(epsilon-caprolactone) surfaces. *Biomaterials* 28, 3668-78.

Barry, F.P., Murphy, J.M., 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 568-84.

Bartels, K.E., 1987. Nonunion. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 17, 799-809.

Bosch, P., Pratt, S.L., Stice, S.L., 2006. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biology of reproduction* 74, 46-57.

Burastero, G., Scarfi, S., Ferraris, C., Fresia, C., Sessarego, N., Fruscione, F., Monetti, F., Scarfo, F., Schupbach, P., Podesta, M., Grappiolo, G., Zocchi, E., 2010. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. *Bone* 47, 117-26.

Calori, G.M., Mazza, E., Colombo, M., Ripamonti, C., Tagliabue, L., 2011. Treatment of long bone non-unions with polytherapy: indications and clinical results. *Injury* 42, 587-90.

Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F.M., Haydon, R.C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H.H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., Szatkowski, J.P., Park, J.Y., He, T.C., 2003. Osteogenic

activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *The Journal of bone and joint surgery.American volume* 85-A, 1544-52.

Di Silvio, L., Dalby, M.J., Bonfield, W., 2002a. Osteoblast behaviour on HA/PE composite surface s with different HA volumes. *Biomaterials* 23, 101-7.

Dodson, S.A., Bernard, G.W., Kenney, E.B., Carranza, F.A., 1996. In vitro comparison of aged and young osteogenic and hemopoietic bone marrow stem cells and their derivative colonies. *Journal of periodontology* 67, 184-96.

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, 315-7.

Egrise, D., Martin, D., Vienne, A., Neve, P., Schoutens, A., 1992. The number of fibroblastic colonies formed from bone marrow is decreased and the in vitro proliferation rate of trabecular bone cells increased in aged rats. *Bone* 13, 355-61.

Gunatillake, P.A., Adhikari, R., 2003. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European cells & materials* 5, 1,16; discussion 16.

Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Lam, C.X., Tan, K.C., Lim, T.C., 2007. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 1, 245-60.

Jang, B.J., Byeon, Y.E., Lim, J.H., Ryu, H.H., Kim, W.H., Koyama, Y., Kikuchi, M., Kang, K.S., Kweon, O.K., 2008. Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenesis in bone defect model dogs. *Journal of veterinary science* 9, 387-93.

Johnson, K.D., Frierson, K.E., Keller, T.S., Cook, C., Scheinberg, R., Zerwekh, J., Meyers, L., Sciadini, M.F., 1996. Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 14, 351-69.

Kadiyala, S., Jaiswal, N., Bruder, S.P., 1997. Culture-Expanded, Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Can Regenerate a Critical-Sized Segmental Bone Defect. *Tissue Engineering* 3, 173-85.

Kraus, K.H., Kirker-Head, C., 2006. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Veterinary surgery* : VS 35, 232-42.

Langer, R., Vacanti, J.P., 1993. Tissue engineering. *Science* (New York, N.Y.) 260, 920-6.

Lee, H.B., Chung Y.S., Heo, S.Y., Kim , N.S., 2009. Augmentation of bone healing of nonunion fracture using stem cell based tissue engineering in a dog: a case report. *Veterinari Medicina* 54, 198-203.

Martin, D.R., Cox, N.R., Hathcock, T.L., Niemeyer, G.P., Baker, H.J., 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Experimental hematology* 30, 879-86.

Martinez, S.A., Walker, T., 1999. Bone grafts. *The Veterinary clinics of North America.Small animal practice* 29, 1207-19.

Meuleman, N., Tondreau, T., Delforge, A., Dejeneffe, M., Massy, M., Libertalis, M., Bron, D., Lagneaux, L., 2006. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *European journal of haematology* 76, 309-16.

Musina, R.A., Bekchanova, E.S., Sukhikh, G.T., 2005. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bulletin of experimental biology and medicine* 139, 504-9.

Neuendorf, R.E., Saiz, E., Tomsia, A.P., Ritchie, R.O., 2008. Adhesion between biodegradable polymers and hydroxyapatite: Relevance to synthetic bone-like materials and tissue engineering scaffolds. *Acta biomaterialia* 4, 1288-96.

Ribitsch, I., Burk, J., Dellling, U., Geissler, C., Gittel, C., Julke, H., Brehm, W., 2010. Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 123, 219-63.

Roberts, S.J., Howard, D., Buttery, L.D., Shakesheff, K.M., 2008. Clinical applications of musculoskeletal tissue engineering. *British medical bulletin* 86, 7-22.

Samuelson, D.A., 2007. *Textbook of Veterinary Histology*. Saunders-Elsevier, St. Louis, Mo.

Schmitt, J.M., Hwang, K., Winn, S.R., Hollinger, J.O., 1999. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 17, 269-78.

Seo, M.S., Jeong, Y.H., Park, J.R., Park, S.B., Rho, K.H., Kim, H.S., Yu, K.R., Lee, S.H., Jung, J.W., Lee, Y.S., Kang, K.S., 2009. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Journal of veterinary science* 10, 181-7.

Shen, B., Wei, A., Whittaker, S., Williams, L.A., Tao, H., Ma, D.D., Diwan, A.D., 2010. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 109, 406-16.

Shor, L., Guceri, S., Wen, X., Gandhi, M., Sun, W., 2007. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials* 28, 5291-7.

Takigami, H., Kumagai, K., Latson, L., Togawa, D., Bauer, T., Powell, K., Butler, R.S., Muschler, G.F., 2007. Bone formation following OP-1 implantation is improved by addition of autogenous bone marrow cells in a canine femur defect model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 25, 1333-42.

Vertenten, G., Gasthuys, F., Cornelissen, M., Schacht, E., Vlamincx, L., 2010. Enhancing bone healing and regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T* 23, 153-62.

Wang, M., 2006. Composite scaffolds for bone tissue engineering. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2, 80-84.

Williams, J.M., Adewunmi, A., Schek, R.M., Flanagan, C.L., Krebsbach, P.H., Feinberg, S.E., Hollister, S.J., Das, S., 2005. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials* 26, 4817-27.

Zucconi, E., Vieira, N.M., Bueno, D.F., Secco, M., Jazedje, T., Ambrosio, C.E., Passos-Bueno, M.R., Miglino, M.A., Zatz, M., 2010. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein--a novel source for cell therapy studies. *Stem cells and development* 19, 395-402.

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, 4279-95.

Table 1 Radiographic scoring system for bone healing evaluation (reference).¹³

	Score	Description
Bone formation	0	No new bone; graft approximates density of soft tissue
		Minimal new bone composed mostly of noncontiguous
	1	Areas of minimal density
		New bone present as mostly contiguous areas of normal
	2	Density and fills approximately 50% of the defect
		New bone present as mostly contiguous areas of normal
	3	Density and fills approximately 51-95% of the defect
Bone union	4	New bone a solid contiguous mass that fills > 95% of the defect
	0	No contact between new bone and noninvolved adjacent normal bone
	1	Partial bridge (< 50%) from new bone to adjacent normal bone
	2	Partial bridge (> 50%) from new bone to adjacent normal bone
	3	Complete bridge from new bone to adjacent normal bone

Table 2 Total cells and viability of BMSCs on day 7 (P₀) by using three isolated techniques.

	Gradient		RBC lysis		Whole aspiration	
Dog	Total cell (x10 ⁶)	% viability	Total cell (x10 ⁶)	% viability	Total cell (x10 ⁶)	% viability
1	2.8	97.01	1.32	97.58	0.17	96.95
2	1.40	96.29	1.25	95.85	0.75	97.34
3	0.35	96.89	1.43	86.27	0.46	93.48
4	0.51	98.27	0.26	94.36	0.03	88.32
5	0.61	97.51	1.14	93.76	0.08	95.88
6	0.79	96.45	0.23	98.23	0.09	96.22
7	1.16	96.21	0.04	96.73	0.38	95.82
Mean $\pm$ SD	1.08 $\pm$ 0.92a	97.08$\pm$0.73a	0.94 $\pm$ 0.55a,b	94.34 $\pm$ 4.32a	0.26 $\pm$ 0.28b	94.70 $\pm$ 3.4a

Table 2 Mean $\pm$ SD of total cells and viability of BMSCs of 7 dogs on day 7 (P₀) by using three isolated techniques.

Isolation techniques	% viability	Total cell (x10 ⁶)
Gradient	1.08 $\pm$ 0.92a	97.08 $\pm$ 0.73a
RBC lysis	0.94 $\pm$ 0.55a,b	94.34 $\pm$ 4.32a
Whole aspiration	0.26 $\pm$ 0.28b	94.70 $\pm$ 3.4a

Table 3 Range and average percentage of flow cytometric determine canine BMSCs by using CD 34 CD 90 and CD 44.

		WHOLE		RBC LYSIS		GRADIENT	
		range	Average	Range	average	range	average
CD 44	P 3	95.66-99.59	98.74 $\pm$ 1.73	99.18-99.89	99.28 $\pm$ 0.82	99.02-99.89	99.2 $\pm$ 0.96
	P 5	88.56-99.76	96.34 $\pm$ 4.74	96.34-99.93	98.38 $\pm$ 1.8	95.04-99.76	97.27 $\pm$ 1.98
CD 90	P 3	91.93-99.15	95.84 $\pm$ 3.05	74.3-99.21	93.48 $\pm$ 10.76	82.53-98.88	93.62 $\pm$ 6.65
	P 5	23.35-92.99	67.61 $\pm$ 30.04	67.49-95.67	79.38 $\pm$ 22.34	31.19-93.93	70.34 $\pm$ 26.39
CD 34	P 3	0-0.01	0.018 $\pm$ 0.03	0-0.06	0.014 $\pm$ 0.03	0-0.06	0.012 $\pm$ 0.027
	P 5	0-0.03	0.01 $\pm$ 0.01	0-0.02	0.006 $\pm$ 0.009	0-0.06	0.012 $\pm$ 0.027

Figure 1 canine MSCs cultured at P₂ derived from bone marrow using whole bone marrow aspirate (A), RBC lysis technique (B), gradient density (C). Their morphologies were spindle and fibroblastic-like cells.

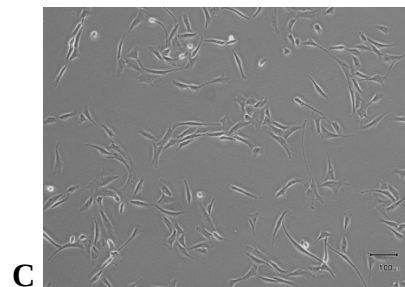
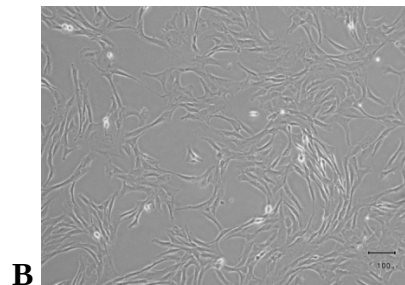
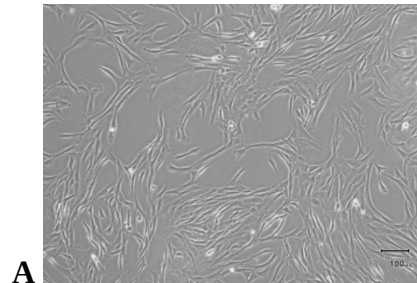


Figure 3 BMSCs were shown to differentiate appropriately to the osteogenic lineage: von kossa

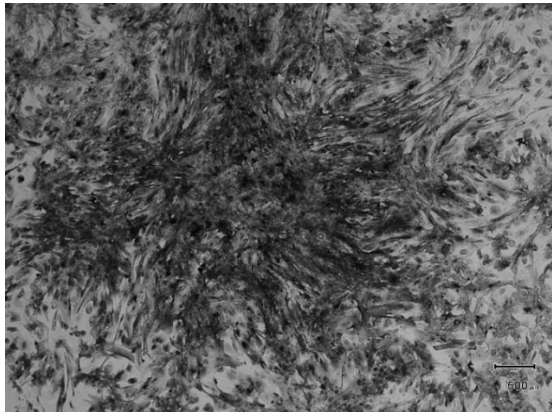


Figure 4 Radiographs of canine ulnar segment defect with PCL/HA injected BMSCs at 2 weeks (A) and 12 weeks (B) postoperatively

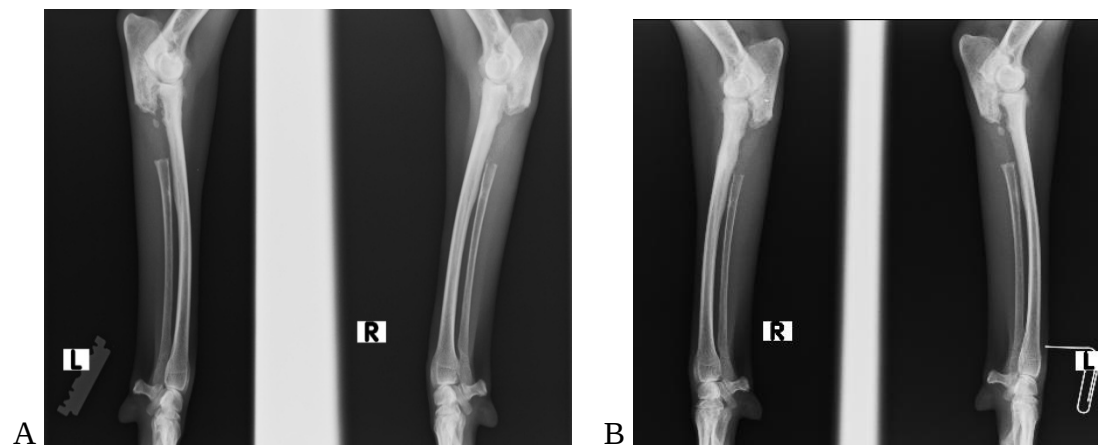


Figure 5 Fluoroscopic angiography at 12 weeks (A) after PCL/HA scaffold implantation and at 16 weeks after BMSC injection (B) presented increasing blood vessel at the implantation site after BMSC injection. (in a dog)

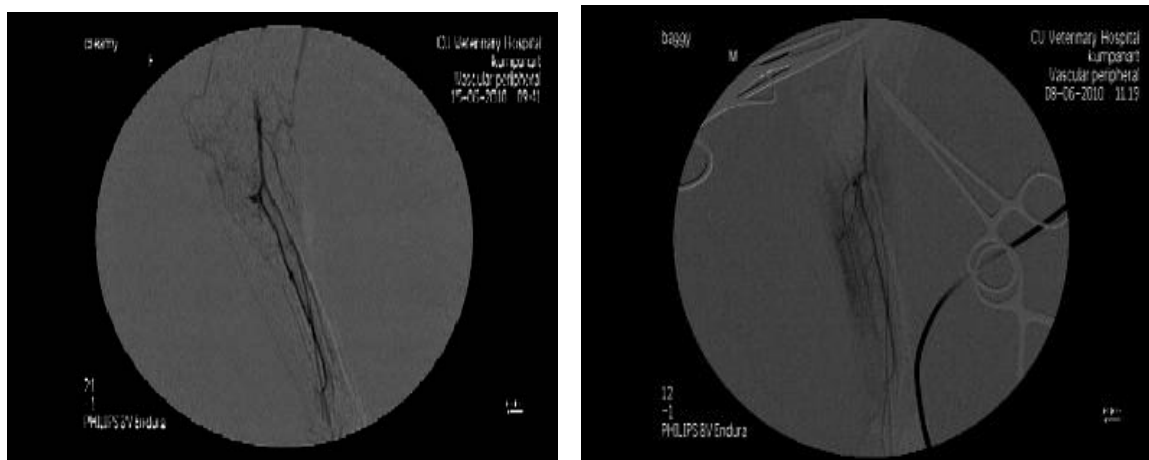


Figure 6 Histopathology at 12 weeks (A-B) after PCL/HA scaffold implantation and at 20 weeks after BMSC injection (C) remarkable capillaries and arterioles and thickening of fibrous tissue with extensive collagen deposition confirmed by Masson's Trichrome staining (D).

