

جداسازی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه به سلول‌های رده استخوان، غضروف و چربی

مینا رضانی^۱، فاطمه پیریایی^۲، فاطمه عینی^۳، مه‌ری فلاح رثوفی^۳

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان.
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم جانوری دانشگاه پیام نور مرکز تهران.
۳- دکتری دامپزشکی دانشگاه تهران.

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۹

چکیده

تا به حال از مغز استخوان جوجه به منظور استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده نشده و کمتر توان تمایز این سلول‌ها در محیط کشت مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این بررسی، جدا نمودن سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان جوجه و تمایز آن‌ها است. جهت کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان ران جوجه استفاده و تمایز سلول‌های مغز استخوان به سلول‌های استخوانی، غضروفی و چربی توسط محیط‌های القایی صورت گرفت. پس از تمایز، بررسی بافتی با رنگ آمیزی‌های اختصاصی هیستوشیمیایی انجام شد. سلول‌های جدا شده از نظر ریخت‌شناسی، فیروبلاستی بودند. سه هفته پس از القاء، واکوئل‌های چربی در سلول‌های چربی، تجمعات کلسیمی در استئوسیت‌ها و ماتریکس غضروفی در کندروسیت‌ها ایجاد شد که به ترتیب با اوایل رده، آلزارین رده و تولوئیدین بلو رنگ گرفتند. نتایج نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان جوجه قادرند به رده‌های استخوانی، چربی و غضروفی تمایز یابند. کلید واژه: مغز استخوان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز، جوجه.

مقدمه

گرفته‌اند، قادرند به سایر سلول‌ها از جمله کندروسیت‌ها، اوستئوبلاست‌ها، فیروبلاست‌ها، آدیپوسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال و میوسیت‌ها در آزمایشگاه تبدیل شوند (۲۰، ۱۸، ۱۱، ۱۰). اگر چه منشأ سلول‌های مزانشیمی کاملاً مشخص نبوده ولی ارتباط تنگاتنگی بین استخوان‌سازی و خون‌سازی وجود داشته و سلول‌های اوستئوبلاست نه تنها نقش مهمی در توسعه و رشد اسکلت دارند بلکه تنظیم‌کننده خون‌سازی هم هستند (۱۹). بررسی‌ها نشان داده است که سلول‌های مغز استخوان می‌توانند همانند دیگر سلول‌های سوماتیک بنیادی، در شرایط معینی به سایر سلول‌ها تبدیل شوند که به این خاصیت انعطاف‌پذیری یا پلاستیسیته

از دیدگاه دانشمندان یک سلول بنیادی به عنوان یک سلول تمایز نیافته با توانایی تکثیر، خودنوزایی و تولید دودمان‌های سلولی متفاوت در نظر گرفته می‌شود (۱۷). مغز استخوان بافتی نرم و پر از عروق با داربست‌هایی از بافت رشته‌ای رتیکولار بوده که سلول‌های خونی، سلول‌های چربی و سلول‌های بنیادی خون ساز بر روی این رشته‌ها قرار دارند. در این بافت سلول‌های فوق تشکیل دهنده سلول‌های آزاد مغز استخوان و سلول‌های رتیکولار ثابت و بی‌تحرك بوده و با قدرت فاگوسیتی کم می‌باشند و به پیش‌سازهای خونی تبدیل نمی‌شوند (۴). سلول‌های مزانشیمی نیز که در حفرات مغز استخوان جای

انسان و طیور نیز بهره جست.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از مغز استخوان جوجه و کشت سلول‌ها

در مطالعه حاضر از ۱۰ قطعه جوجه ۱۵ روزه نژاد Raf، استفاده شد. جوجه‌ها توسط کلروفرم بیهوش و با استفاده از سرنگ شماره ۱۹، مغز استخوان از استخوان تیبیای آن‌ها آسپیره و با رقیق نمودن با ۵ میلی‌لیتر محیط M199 (Sigma, USA) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی به آرامی بر روی محلول فایکول (Inotrain) بارگذاری گردید. پس از ایجاد محلول دو فازی، فالكون‌ها در سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰g قرار داده شدند. با ایجاد گرادیان غلظت، توسط محلول فایکول سلول‌های تک هسته‌ای در یک لایه ظریف بین گلوبول‌های قرمز و پلاسما قرار گرفته و به آرامی سلول‌ها را برداشته به فالكون‌های ۵۱ سی‌سی منتقل گردیدند، مجدداً با ریختن حجم مساوی از محلول PBS به منظور خنثی کردن اثر سمی فایکول در سانتریفوژ با دور ۴۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه شستشو انجام شد. پس از خارج کردن مایع رویی، پلیت سلولی تشکیل شده در کف فالكون، در ۵ سی‌سی محیط کشت M199 معلق و در فلاسک ۲۵ سانتی‌متری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط M199 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در سی‌سی و ۱۰۰ میکروگرم در سی‌سی استرپتومایسین (Sigma, USA) کشت داده شد. سپس سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند. ۳ روز پس از آغاز کشت، محیط سلول‌ها تعویض و پس از آن هر دو روز یک بار تعویض محیط کشت انجام گرفت. زمانی که سلول‌ها تمام سطح کشت را پر کردند به نسبت ۱:۲ پاساژ داده و این عمل تا پاساژدهم ادامه یافت. از سلول‌های پاساژ چهارم برای مرحله بعدی تحقیق یعنی بررسی توان تمایز سلول‌ها استفاده شد.

بررسی توان تمایزی سلول‌ها

تمایز به استخوان: سلول‌های پاساژ چهارم در پلیت شش‌خانه کشت و پس از این که تمام سطح کشت پر از

می‌گویند. شواهد تجربی نشان داده که سلول‌های پیش‌ساز مشتق از یک فرد بالغ توانایی تبدیل شدن به فنوتیپ‌های سلولی که به طور نرمال در آن بافت موجود نیست را دارا می‌باشند. از سوی دیگر سلول‌های اختصاصی بافت‌های بالغ نیز می‌توانند برای تغییر شکل فنوتیپ کاملاً متمایزی که به طور نرمال در آن بافت پیدا نمی‌شوند را مجدداً برنامه‌ریزی کنند (۲،۳،۶،۱۵،۱۸). سلول‌های خانواده سلول بنیادی بسیار نادر بوده، به طوری که در هر ۱۰۰۰۰ سلول هسته‌دار مغز استخوان یکی از این سلول‌ها، سلول بنیادی است. از آن جایی که این سلول‌ها مسئول پیوند طولانی مدت و جایگزینی کامل خون‌سازی هستند، خالص‌سازی سلول‌ها برای نگهداری آن‌ها در موقعیت فریز یا برای سنجش سریع و آسان توان خون‌سازی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند (۱۶). با انجام پژوهش‌های متفاوت مشخص شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی توان تمایز به سه رده، سلول پیوندی را دارند. به عبارت دیگر، این سلول‌ها، علاوه بر استخوان و چربی قادرند به سلول‌های رده غضروف نیز تمایز یابند (۱۶، ۱۴، ۱۲). وجود سلول‌های بنیادی در مغز استخوان، آن‌ها را به عنوان منبع مهمی در تأمین سلول‌های بنیادی، در درمان‌های ترمیمی مطرح کرده است. از مغز استخوان گونه‌های حیوانی مختلف می‌توان به راحتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را استخراج و در شرایط کشت مناسب با سهولت تکثیر نمود (۷، ۸، ۱۳). تا به حال این سلول‌ها از انسان و برخی گونه‌های حیوانی با موفقیت جداسازی و مطالعه شده است (۵، ۹). اما تا کنون جداسازی، کشت و توان تمایز به سه رده سلولی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی جوجه بررسی نشده است. لذا هدف از این پژوهش دستیابی به یک منبع با ارزش سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استحصال آسان، در جوجه به منظور استفاده در روش‌هایی هم‌چون شبیه‌سازی، انتقال ژن و یا بررسی بیماری‌های ویروسی در پرندگان می‌باشد. هم‌چنین از آن‌ها می‌توان جهت استفاده در تحقیقات واکسن، تست تشخیصی و ویروس‌شناسی، ژن درمانی، درمان بیماری‌های پرندگان و درمان بیماری‌های مشترک

دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محیط رویی تخلیه و محیط القاء کننده غضروف که شامل محیط کشت FBS ۱۰٪، M۱۹۹ محتوی دگزامتازون یک میلی مولار (Sigma, USA)، L-آسکوربیک اسید ۲- فسفات ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر (Sigma, USA)، فاکتور رشد بتا ترانسفورمینگ ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر (Sigma, USA) و ۱ واحد از ترکیب انسولین-ترانسفرین-سولیت سدیم (Gibco) بر روی پلیت سلولی در ته لوله، اضافه شد. محیط تمایز هر ۳-۴ روز یک بار به مدت ۲۱ روز تعویض شد. برخی از کشت ها به عنوان گروه کنترل، محیط معمولی یعنی محیط M۱۹۹ با ۱۰ درصد FBS دریافت کردند. برای ارزیابی تمایز به غضروف از روش رنگ آمیزی اختصاصی تولوئیدین آبی استفاده شد.

رنگ آمیزی آلیزارین رد S: سلول ها را با PBS شسته و به مدت ۴۰ دقیقه با پارافرمالدئید ۴٪ تثبیت شدند. رنگ آلیزارین رد S (۲ گرم پودر آلیزارین رد S در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل و فیلتر گردید) باید تازه و PH آن در محدوده ۴/۳-۴/۱ با هیدروکسید آمونیوم تنظیم و بر روی سلول ها به مدت ۳۰ دقیقه قرار گیرد. در پایان، سلول ها با آب مقطر شسته و خشک شدند.

رنگ آمیزی Oil Red O: سلول ها به مدت یک ساعت دردمای اتاق با فرمالین ۴ درصد تثبیت و سپس با الکل ۷۰ درصد شسته و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با محلول رنگ Oil Red O (Sigma, USA) (۰/۶۳ گرم پودر رنگ Oil Red O در ۱۰۰ میلی لیتر ایزوپروپانول ۶۰٪ حل شده و فیلتر می شود) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شده، در پایان محلول رنگی خارج و سلول ها، سه بار با الکل ۷۰ درصد شستشو شدند.

رنگ آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو: پلیت سلولی تمایز یافته در دستگاه کشت Micro Mass ابتدا به مدت ۱ ساعت در پارافرمالدئید ۱۰ درصد، تثبیت و با استفاده از الکل آب گیری و با کمک گزلیل شفاف سازی و در پرافین قالب گیری شد. به این ترتیب نمونه ها به روش روتین بافتی پردازش و با استفاده از میکروتوم، برش های

سلول شد، محیط آن ها با محیط القاکننده تمایز به استخوان شامل محیط M۱۹۹، ۱۰ درصد FBS محتوی دگزامتازون یک میلی مولار (Sigma, USA)، L-آسکوربیک اسید ۲- فسفات ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر (Sigma, USA)، فاکتور رشد بتا ترانسفورمینگ ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر (Sigma, USA) و بتا گلیسرول فسفات ۱۰ میلی مولار (Sigma, USA) جایگزین شد. به عنوان گروه کنترل، محیط برخی از خانه ها با FBS ۱۰ درصد جایگزین گردید. کشت سلول به مدت ۲۱ روز در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ انکوبه و هر دو روز یک بار محیط آن ها تعویض گردید. در پایان دوره تمایز، وقوع تمایز سلول با روش رنگ آمیزی آلیزارین قرمز بررسی شد.

تمایز به چربی: برای این منظور از سلول های پاساژ چهارم استفاده شد. ابتدا سلول ها در خانه های پلیت شش خانه کشت قرار گرفته و زمانی که کف ظرف کشت از تک لایه سلولی پوشیده و تمایز آغاز گردید، محیط معمولی سلول ها با محیط تمایز به چربی شامل M۱۹۹، FBS ۱۰٪، دگزامتازون یک میلی مولار (Sigma, USA)، L-آسکوربیک اسید ۲- فسفات ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر (Sigma, USA)، فاکتور رشد بتا ترانسفورمینگ ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر (Sigma, USA) و ۱ واحد از ترکیب انسولین-ترانسفرین-سولیت سدیم (Gibco) تعویض شد. برخی از خانه های پلیت شش خانه به عنوان گروه کنترل محیط معمولی یعنی محیط M۱۹۹ با ۱۰ درصد FBS جایگزین گردید. گروه تجربی (کشت تمایز) و گروه کنترل به مدت ۲۱ روز در شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO₂ نگهداری و در پایان این مدت با روش رنگ آمیزی Oil Red مورد ارزیابی قرار گرفت.

تمایز به غضروف: به منظور تمایز سلول های مغز استخوان به غضروف از روش Micro mass culture system استفاده شد، بدین ترتیب که 2×10^4 سلول پاساژ سوم به یک لوله ۱۵ میلی لیتری انتقال و با دور ۴۵۰g به مدت ۱۵

۵ میکرومتری از آن‌ها تهیه شد. برای رنگ آمیزی، رنگ تولوئیدین بلو (Sigma, USA) به مدت ۱۰ دقیقه به مقاطع بافتی اضافه و در انتها رنگ اضافی با آب مقطر شسته شد.

انجماد سلولی

زمانی که سلول‌ها ۸۰-۷۰ درصد از کف فلاسک‌های کشت سلول را پر کردند، سلول‌ها با ۲ میلی لیتر محلول تریپسین ۰/۰۵ درصد و EDTA ۰/۰۳ درصد از کف ظرف جدا و با محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰g سانتریفوژ و در نهایت پلیت سلولی را با یک میلی لیتر محلول سرد انجماد سلولی که حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۲۰٪ دی متیل سولفو کساید (DMSO) و ۷۰٪ محیط کشت بود سوسپانسیون کرده و به ویال‌های مخصوص انجماد سلولی منتقل شدند، ویال‌ها به مدت ۱ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد قرار گرفته و پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها برای نگهداری طولانی مدت در نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه قرار داده شدند.

ذوب سلولی

پس از آماده کردن بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد، سلول‌ها به سرعت از تانک ازت به داخل بن ماری و سپس در زیر هود به ویال منتقل و با کمک پی پت استریل میزان ۴ میلی لیتر از محیط کشت کامل با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به درون یک فالکون استریل و محتویات ویال را نیز داخل فالکون ریخته، سانتریفوژ می‌شود تا اثرات سمی موجود در محیط انجماد برداشته شود. در نهایت پلیت سلولی با ۱ الی ۲ سی سی محیط کشت سوسپانسیون گردیده و مجدداً داخل فلاسک‌های کشت سلول، کشت شدند. حال فلاسک را درون انکوباتور با شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و CO₂ ۵٪ قرار داده تا رشد کنند. ضمناً قبل از انتقال سلول‌ها به فلاسک کشت، تعدادی از آن‌ها با رنگ حیاتی تریپان بلو رنگ آمیزی شد تا درصد زنده ماندن آن‌ها پس از انجماد در هر پاساژ سلولی، معلوم

گردد.

آزمایش تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها

پس از ذوب سلولی در هر پاساژ، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را با ۵۰ میکرو لیتر از رنگ تریپان بلو ۰/۴٪ (Merck; Germany) مخلوط کرده، پس از ۲ تا ۳ دقیقه یک قطره از این مخلوط را برداشته و با استفاده از لام نئوبار و در خانه های مربوط به شمارش گلبول سفید شمارش سلول‌ها انجام شد.

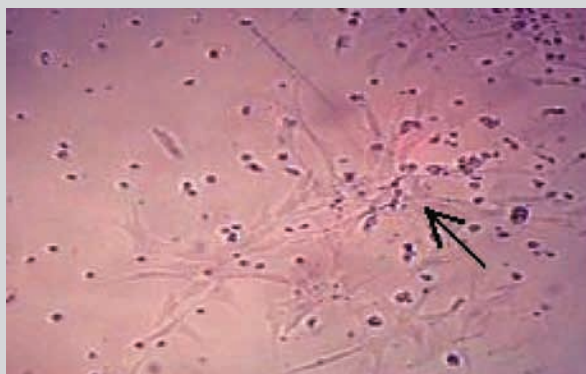
نتایج

کشت سلول‌ها: کشت سلولی، روزانه با میکروسکوپ معکوس مشاهده شد. بر اساس این مشاهدات، در کشت اولیه کلون‌هایی از سلول‌های فیبروبلاستی ظاهر (شکل A) و با گذشت زمان سلول‌ها رشد کردند، به طوری که ۸ روز پس از آغاز، کشت تک لایه ای از سلول‌های دو کی شکل تشکیل شد (شکل B). سلول‌های فیبروبلاستی مغز استخوان با انجام ۱۰ پاساژ متوالی تکثیر شدند. این سلول‌ها، ریخت‌شناسی فیبروبلاستی خود را در طی دوره کشت حفظ و از پاساژ چهارم به منظور مراحل بعدی آزمایش یعنی تمایز استفاده گردیدند (شکل C).

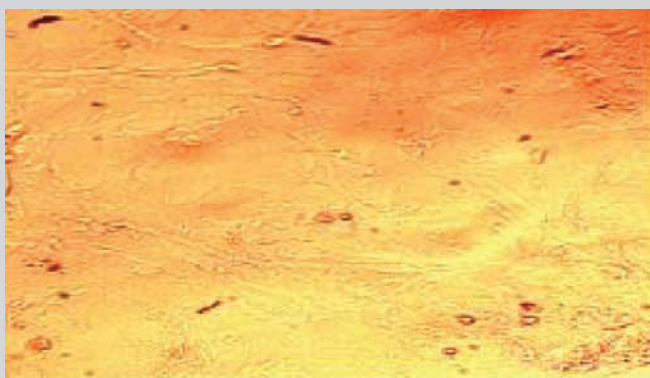
تمایز

تمایز به استخوان: این کشت هر روز با میکروسکوپ معکوس مشاهده شد. اولین نشانه‌های تغییرات ریخت‌شناسی و تمایز به استخوان ۵ روز پس از القای تمایز مشاهده گردید. بدین ترتیب که در مناطقی از تک لایه سلولی، توده‌های سلولی تشکیل و به تدریج بزرگ‌تر شد (شکل A). در پایان دوره کشت تمایز (۲۱ روز پس از کشت) توده‌های سلولی از نظر ترشح ماتریکس معدنی با روش آلزارین رد ارزیابی شدند که حاصل آن قرمز شدن توده‌های مذکور بود (شکل B). در کشت کنترل که سلول‌ها در معرض محیط معمولی فاقد مواد القا کننده تمایز به استخوان قرار داشتند، توده‌های سلولی تشکیل نشد و این کشت با آلزارین قرمز رنگ نشد (شکل C).

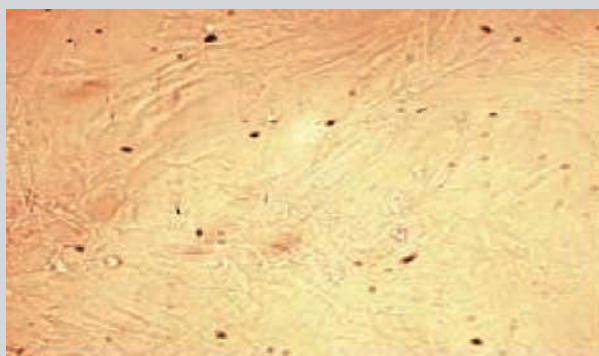
تمایز به چربی: اولین قطرات چربی ۲ روز پس از آغاز کشت در برخی از سلول‌ها مشاهده شد. این قطرات



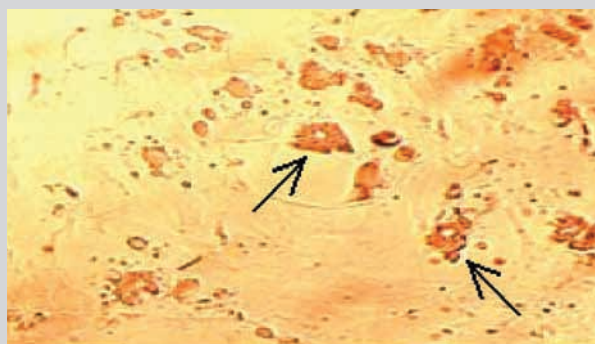
شکل ۱- کشت سلول‌های مغز استخوان جوجه:
 (1A) یک کلون سلولی در کشت اولیه (درشت نمایی 100x)



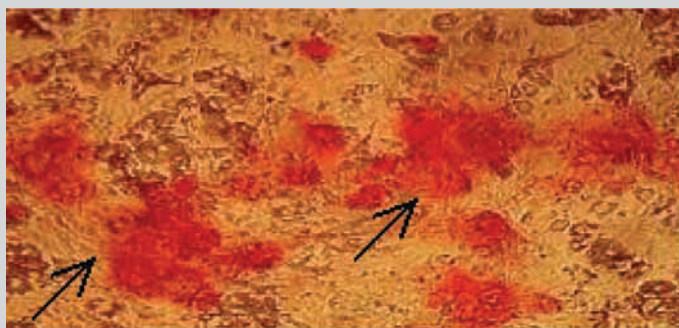
(1B) به هم پیوستن کلونی‌ها و ایجاد تک لایه سلولی ۸ روز بعد از کشت (درشت نمایی 100x)



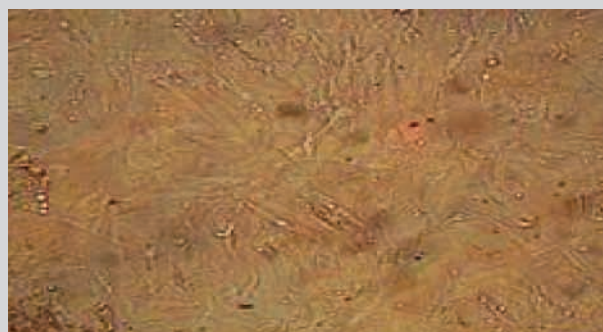
(1C) سلول‌های پاساژ ۳ که هم چنان ریخت شناسی فیبرو بلاستی خود را حفظ کرده‌اند (درشت نمایی 100x)



شکل ۲- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جوجه به استخوان
 (2A) توده‌های سلولی در کشت الفاء کننده استخوان (درشت نمایی 100x)



۲B- سلول های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته به استخوان پس از رنگ آمیزی با آلیزارین رد (درشت نمایی ۱۰۰x)



۲C- عدم رنگ پذیری سلول های کنترل، پس از رنگ آمیزی با آلیزارین رد (درشت نمایی ۱۰۰x)

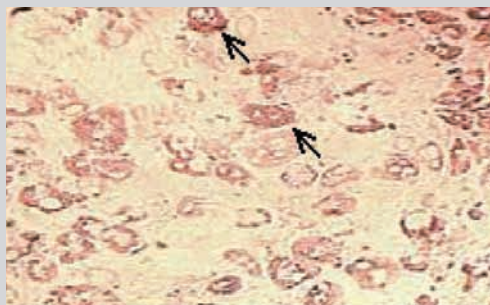
پس از ۲۱ روز منفی بود (شکل ۴ B).

درصد زنده بودن سلول ها

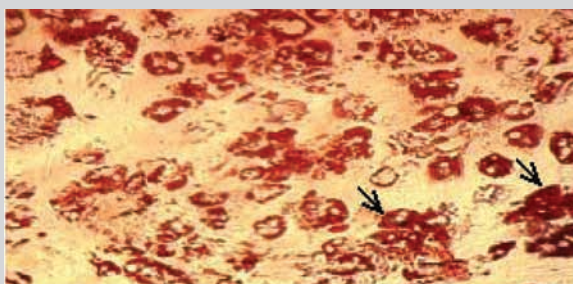
پس از کشت مجدد سلول های منجمد شده، سلول ها توان چسبیدن به ظروف کشت سلولی را پیدا کرده و شروع به تکثیر کردند. احیای سلول ها به خصوص در پاساژهای پائین تر با سرعت بیشتری انجام شد. هم چنین پتانسیل تکثیر سلول ها در پاساژهای پائین نسبت به پاساژهای ۷ به بالا به مراتب بیشتر بود (نمودار ۱).

به تدریج در سایر سلول ها نیز ظاهر شد، به طوری که در پایان ۲۱ روز، اغلب سلول ها حاوی قطرات چربی بودند (شکل ۳ A). قطرات چربی، به دنبال رنگ آمیزی اوایل رد، قرمز رنگ شدند (شکل ۳ B)، در مقابل در سلول های کنترل که به مدت ۲۱ روز در محیط فاقد القاء کننده بودند، قطره چربی تشکیل نشد و با اوایل رد رنگ نگرديد (شکل ۳ C).

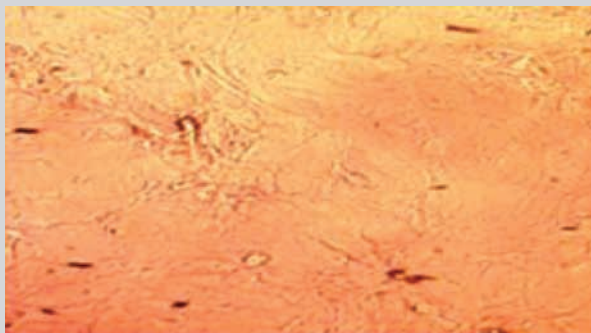
تمایز به غضروف: برش های تهیه شده از کشت تمایز به غضروف با تولوئیدین بلو، بنفش رنگ شدند (شکل ۴ A). نتیجه رنگ آمیزی اختصاصی در مورد سلول های کنترل



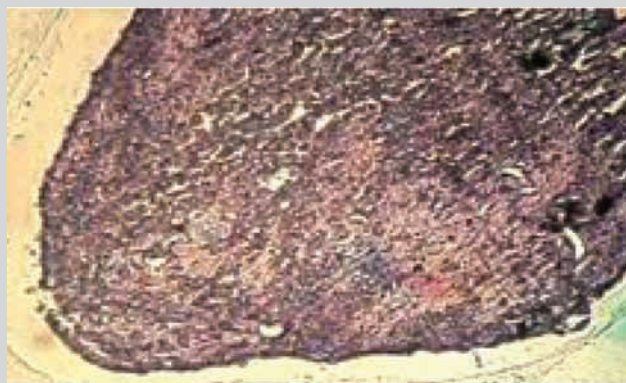
شکل ۳- تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی جوجه به چربی
۳A- پس از ۲۱ روز قطرات چربی در سیتوپلاسم اکثر سلول ها جمع شد (درشت نمایی ۱۰۰x)



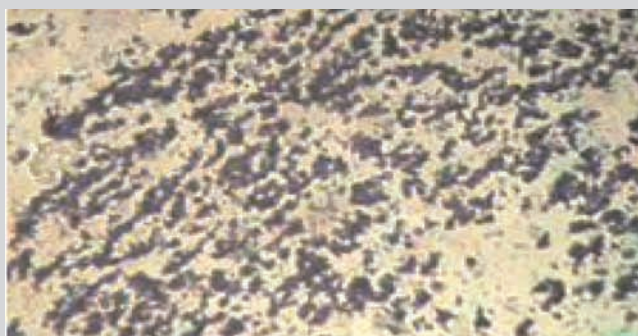
۳B- پس از ۲۱ روز پس از آغاز تمایز، قطرات چربی با رنگ آمیزی اوایل رد قرمز شد (درشت نمایی ۱۰۰x)



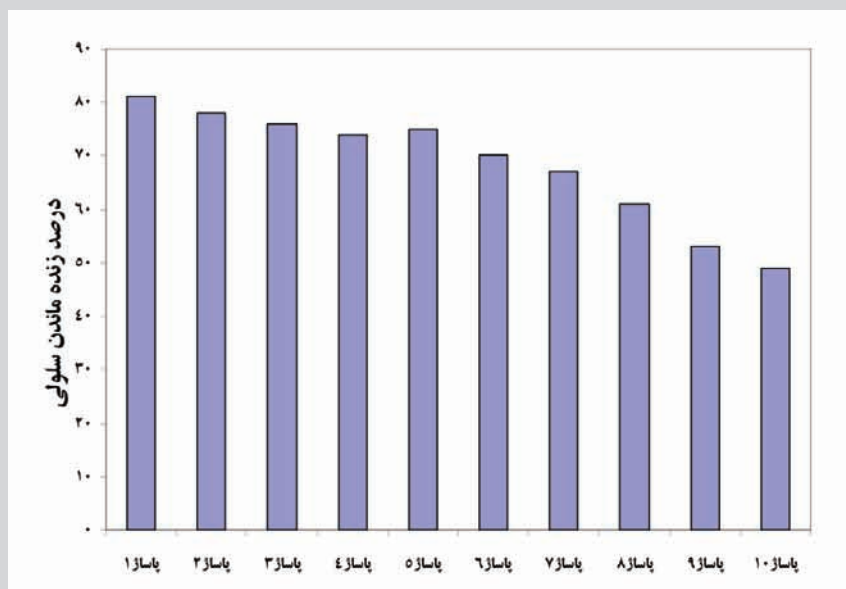
۳C- پدر سلول های کنترل قطرات چربی مشاهده نشد (درشت نمایی ۱۰۰x)



شکل ۴- تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی جوجه به غضروف
 ۴A- برش های تهیه شده از کشت تمایز به غضروف که با تولوئیدین آبی بنفش رنگ شدند (درشت نمایی ۱۰۰x)



۴B- عدم رنگ آمیزی سلول های کنترل با تولوئیدین آبی (درشت نمایی ۱۰۰x)



نمودار ۱- درصد زنده ماندن سلول ها در پاساژهای مختلف

بحث و نتیجه گیری

نظیر موش صحرایی با روش فلوسایتومتری و استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال آنتی ژن های سطحی مربوط به این سلول ها بررسی شده اند (۱). با توجه با این که تا کنون در جهت تهیه و ساخت آنتی بادی های مونوکلونال جوجه به منظور بررسی شناساگرهای سطحی مزانشیمی، اقدامی صورت نگرفته است، لذا در این مطالعه نیز به این مسئله توجه نشده است. چنانچه آنتی بادی های مونوکلونال مربوط به گونه پرندگان در دسترس باشد، غربالگری و جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه با روش فلوسایتومتری جهت بررسی ویژگی های ایمونوفنوتیپی این سلول ها و مقایسه با سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف و بافت چربی جالب توجه خواهند بود، هم چنان که این بررسی ها در انسان صورت گرفته است (۲). بنابراین بهترین معیار جهت اثبات سلول های بنیادی مزانشیمی، تمایز این سلول ها به سلول های استخوان، غضروف و چربی است. به این ترتیب وقتی سلول های دوکی شکل و فیبرو بلاستی جدا شده در این تحقیق، تحت تأثیر محرک های شیمیایی قرار گرفته و به سمت استئوسیت، آدیپوسیت و کندروسیت متمایز شدند، این خود شاهد بر بنیادی بودن این سلول ها است. سه هفته بعد

در مطالعه حاضر برای اولین بار اقدام به جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان جوجه شده است. سلول های جدا شده، مورفولوژی فیبروبلاستی داشته و از تکثیر بالایی برخوردار بودند و با بالا رفتن تعداد پاساژ سرعت تکثیر و مورفولوژی سلول ها تغییری نکرد. سلول های مورد نظر به دنبال ذوب پس از مرحله انجماد، مجدداً به ظروف کشت چسبیده و بدون هیچ تغییری در سرعت رشد، مورفولوژی سلولی و پتانسیل تزايد شروع به تکثیر نموده و قدرت تمایزی خود را حفظ کردند. بنابراین، نگهداری این سلول ها در شرایط انجماد برای مدت طولانی و بدون از دست دادن ویژگی های اختصاصی خود مثل تکثیر و توانایی تمایز به رده های مزانشیمی (استئوسیت، کندروسیت و آدیپوسیت) امکان پذیر بوده و می توان آن ها را در آینده برای تحقیقات مختلف مثل انتقال ژن، شبیه سازی و غیره مورد استفاده قرار داد (۲۱). از معیارهای مهم در تشخیص سلول های بنیادی مزانشیمی حضور شناساگرهای مربوط به سلول های بنیادی مزانشیمی و عدم حضور شناساگرهای سلول های بنیادی خون ساز می باشد. بر این اساس در انسان و سایر گونه های چونندگان

تدریج افزایش پیدا کرد و طی مدتی کمتر از یک هفته به سلول‌های آدیپوسیت تمایز پیدا کردند که این تمایز با مشاهده واکنش‌های چربی در رنگ آمیزی Oil Red O به تأیید رسید. نتایج مورفولوژی و تست‌های تمایزی نشان داد که سلول‌های جدا شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند. این نتایج اولین گزارش مبنی بر وجود سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مغز استخوان جوجه است که امید آن می‌رود تا در آینده بتوان از این سلول‌ها در روش‌هایی هم چون شبیه‌سازی، انتقال ژن و یا مطالعه بیماری‌های ویروسی مشترک انسان و طیور استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح پژوهشی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان با شماره ۲۱۷۱ است.

منابع

1. Barry, F.P., Boynton, R.E., Haynesworth, S., Murphy, J.M., Zaia, J. (1999). The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Bioch Biophys Res*, 265, 134-139.
2. Barry, F.P. (2003). Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. *Novartis Found Symp*, 249, 86-96.
3. Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., Robey, P.G. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19, 180-192.
4. Caplan, A.I., Bruder, S.P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*, 7 (6), 259-264.
5. Eslaminejad, M.B., Nikmahzar, A., Taghiyar, L., Nadri, S., Massumi, M. (2006). Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ*, 48, 361-370.
6. Fuchs, E., Segre, J.A. (2000). Stem cells: a

از القای تمایز به استخوان، سلول‌های استخوانی از حالت نامتمایز (دوکی شکل و کشیده) به صورت سلول‌های گرد، تغییر شکل داده و توسط ماده زمینه (ماتریکس) احاطه شده و رسوبات کلسیم (که نشانه مینرالیزاسیون در سلول‌های استخوانی است) با رنگ آلیزارین رد S، به رنگ قرمز- نارنجی مشاهده شدند. در رنگ آمیزی با تولوئیدین بلو، اسید موکوپلی ساکاریدها و موکوپلی ساکاریدهای سولفات‌ها و هسته سلول‌های غضروفی، به رنگ بنفش درآمده و سیتوپلاسم سلولی بی‌رنگ ماند. واکنش‌های چربی در آدیپوسیت‌ها با Oil Red O، به رنگ قرمز دیده شدند. علاوه بر این، در مرحله القای آدیپوژنتیک، قطرات طبیعی لیپید در سیتوپلاسم سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در هفته اول ظاهر شده و حجم قطرات لیپید به

new lease on life. *Cell*, 100, 143-150.

7. Horwitz, E.M., Prockop, D.J., Gordon, P.L., Koo, W.W., Fitzpatrick, L.A., Neel, M.D. (2001). Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*, 97, 1227-1231.
8. Ishaug, S.L., Crane, G.M., Miller, M.J., Yasuko, A.W., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G. (1997). Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 36, 17-28.
9. Kadiyala, S., Young, R.G., Thiede, M.A., Bruder, S.P. (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*, 6, 125-134.
10. Kumar, D., Kamp, T.J., Lewinter, M. (2005). Embryonic stem cells: differentiation into cardiomyocytes and potential for heart repair and regeneration. *Coron Artery Dis*, 16, 111-116.
11. Modderman, W.E., Vrijheid-Lammers, T., Lowik, C.W., Nijweide, P.J. (1994). Removal of hematopoietic cells and macrophages from mouse

bone marrow cultures: isolation of fibroblastlike stromal cells. *Exp Hematol*, 22(2),194-201.

12. Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci*, 3, 63-76.

13. Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., Pollak, C., Bourguignon, M. (2000). Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*, 18, 959-963.

14. Piersma, A.H., Brockbank, K.G., Ploemacher, R.E., Van Vliet, E., Brakel-van Peer, K.M., Visser, P.J. (1985). Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol*, 13, 237-243.

15. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglass, R., Mosca, J.D. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284,143-147.

16. Prochop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for non hematopoietic tissues. *Science*, 276, 71-74.

17. Sanchez – Ramos, J. (2006). Stem cells from umbilical cord blood. *Semin Reprod Med*, 24(5), 358-69.

18. Sun, S., Guo, Z., Xiao, X., Liu, B., Liu, X., Tang, P-H. (2003). Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable methods. *Stem cells*, 21,527-535.

19. Taichman, R. (2005). Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem cell niche. *Blood*, 105(7), 2631-2639.

20. Tropel, P., Noel, D., Platet, N., Legrand, P., Benabid, A.L., Berger, F. (2004). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*, 295(2),395-406.

21. Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13,4279-4295.



Archive of SID