Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2011; 14(55): 18-28

The effect of age and strain on screening, proliferation, and differentiation of chicken bone marrow mesenchymal stem cells

Piryaei F[1], Ramezani M [2*], Piryaei F[3]

1- Department of Biology, Payame Noor University of Tehran, Tehran, Iran
2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Ashtian Branch Islamic Azad University, Ashtian, Iran
3- Department of Medical Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Accepted 11 Apr 2010, Received 16 Jun 2010

Abstract

***Background*:** Noticing the practical significance of stem cells, this study was conducted to culture and screen bone marrow mesenchymal stem cells derived from Raf and Hilline chicken strains and investigate the effect of age and race on the morphology and differentiation of the generated cells.

***Materials and Methods*:** In this fundamental study, bone marrow cells from 3 to 25 day-old Raf and Hiline chicken strains were cultured in low glucose DMEM, 10% BFS. Then third passage bone marrow cells of the two strains were compared in terms of morphology, differentiation to bone, cartilage, and adiposity. Data were analyzed through SPSS software.

***Results*:** In culturing Raf chicken derived bone marrow cells, in contrast to Hiline chicken strain, colonization took place and they almost had a better fibroblastic morphology. The results indicated higher yields of differentiation to bone, cartilage, and adipose tissues in Raf chicken derived bone marrow cells than Hiline chicken. These differences were statistically significant. Also, 15 days was the most suitable age for screening the mesenchymal stem cells of chicken.

***Conclusion*:** Screening and proliferation of mesenchymal stem cells from 15-day old Raf chicken bone marrow cells are good resources for differentiation and purification of chicken bone marrow mesenchymal stem cells.

***Keywords*:** Cell Culture, Chicken, Differentiation, Mesenchymal Stem Cells

*Corresponding author:
Address: Department of Biology, Ashtian Branch Islamic Azad University, Ashtian , Iran
Email:mina.ramezani@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 14، شماره 2 (شماره پیاپی 55)، خرداد و تیر 1390، 28-18

تاثیر سن و نژاد بر بازده جدا سازی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه گوشتی و تخمگذار

فاطمه پیریائی[1]، مینا رمضانی[2*]، فهیمه پیریائی[3]

1- کارشناس ارشد علوم جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور مرکز تهران، تهران، ایران

2- استادیار، دکترای تخصصی سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحدآشتیان، آشتیان، ایران

3- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و ملکولی، گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت22 / 1 /89، تاریخ پذیرش26 /3 / 89

چکیده

زمینه و هدف: به دلیل اهمیت کاربردی سلول‌های بنیادی، هدف مطالعه حاضر کشت و جدا سازی سلول‌های مزانشیمی جوجه از مغز استخوان دو نژاد متفاوت (گوشتی و تخمگذار) و مطالعه تاثیر نژاد و سن جوجه بر مورفولوژی و تمایز سلول‌های حاصل است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش بنیادی، سلول‌های مغز استخوان جوجه‌های نژاد Raf (گوشتی) و نژاد Hiline(تخمگذار) در سنین متغییر 3 تا 25 روزه در محیط کشتDMEM با درصد گلوکز پایین و سرم جنین گاوی10 درصد کشت شدند. سپس، سلول‌های پاساژ 3 حاصل از مغز استخوان دو نژاد جوجه، از لحاظ مورفولوژی، تمایز به استخوان، چربی و غضروف مقایسه شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها نیز با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت.

یافته‌ها: در کشت سلول‌های مغز استخوان جوجه نژاد گوشتی، بر خلاف کشت سلول‌های مغز استخوان جوجه نژاد تخمگذار، کلون زایی اتفاق افتاد و اغلب سلول‌ها مورفولوژی فیبروبلاستی داشتند. نتایج تمایز نشان داد که درصد بیشتری از سلول‌های حاصل از کشت سلول‌های مغز استخوان جوجه نژاد گوشتی، در مقایسه با کشت سلول‌های مغز استخوان جوجه نژاد تخمگذار، به استخوان، چربی و غضروف تمایز یافتند که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود. همچنین مناسب‌ترین سن برای جدا سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در جوجه 15 روزه بود.

نتیجه‌گیری: جدا سازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان جوجه نژاد گوشتی با سن 15 روز، منبع مناسبی برای تخلیص وتمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه محسوب می‌شود.

واژگان کلیدی:کشت سلول، جوجه، تمایز، سلول بنیادی مزانشیمی

نویسنده مسئول: آشتیان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی، صندوق پستی:13347-39618

Email: mina.ramezani@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سلول بنیادی یک نوع سلول غیر تمایز یافته در میان مابقی سلول‌های تخصص یافته در یک بافت یا ارگان است که قابلیت خود بازسازی داشته و این توانایی را در تمامی طول عمر خویش حفظ می‌کند. بافت‌های بالغ شامل مغز، مغز استخوان، خون محیطی، رگ‌های خونی، ماهیچه‌های اسکلتی، کلیه و کبد، دارای سلول‌های بنیادی می‌باشند که می‌توانند به سلول‌های تخصص یافته اکثر بافت‌ها و یا ارگان‌ها تمایز یابند(1، 2). مغز استخوان حداقل 2 نوع سلول بنیادی شامل سلول‌های بنیادی خون ساز (Hematopoietic Stem Cells-HSCs) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells-MSCs) دارد که توانایی ساخت انواع سلول‌های خونی را دارند(3، 4). مغز استخوان را می‌توان به عنوان بهترین بافت حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده کرد، سلول‌های مشتق از مغز استخوان توانایی تشکیل چندین نوع بافت در بدن را دارند که این توانایی تمایز به انواع بافت‌های گوناگون در بدن را پلاستیسیته یا Transdifferentiation می‌گویند(5). سلول‌های بنیادی مزانشیمی دو خصوصیت عمده دارند:

1- در ظروف کشت سلول به صورت سلول‌های چسبنده با دوره زندگی محدود، رشد می‌کنند.

2- توانایی تمایز به رده‌های مزانشیمی عمده شامل استئوسیت‌ها، کندروسیت‌ها و سلول‌های چربی را در پاسخ به محرک‌های مناسب دارند. در نتیجه این سلول‌ها می‌توانند به عنوان منابع نامحدود برای تمام سلول‌های بدن محسوب گردند(9-6). امروزه استفاده از این سلول‌ها به منظور درمان بیماری‌های مختلف و جبران ضایعات ناشی از آسیب‌های قلبی عروقی، نخاعی، باز سازی استخوان، درمان بیماری‌های مفصلی و بسیاری از دیگر اختلالات دستگاه‌های بدن مورد توجه قرار گرفته است. کاربردی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان بیماری‌های انسان نیازمند جدا سازی این سلول‌ها از گونه‌های حیوانی و مطالعات پیش کلینیکی می‌باشد. از این رو شناخت جنبه‌های بیولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از قبیل ماهیت سلولی، منشا تکاملی، عملکرد سلولی و پتانسیل تمایز حائز اهمیت است که هنوز بسیاری از این مسائل درvivo in ناشناخته باقی مانده است(12-10). تاکنون سلول‌های بنیادی مغز استخوان حیواناتی مثل خوک، بز، گوسفند، میمون، خرگوش، اسب، موش، گاو و جوجه با روش‌های خاص جداسازی شده و به انواع دیگری از سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی تمایز داده شده (15-13) ولی تا کنون به تاثیر نژاد و سن دهنده مغز استخوان بر روند جدا سازی، تکثیر و پتانسیل تمایز سلول‌ها کمتر توجه شده است. لذا در مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در مغز استخوان جوجه‌های سالم نژاد Raf و نژاد Hiline ، در طی چندین پاساژ تکثیر شد و از نظر پتانسیل تمایزی به سه رده استخوانی، غضروفی و چربی بررسی گردید. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نمونه‌های مغز استخوان جوجه به سهولت قابل استخراج بوده و همچنین در شرایط مناسب کشت به راحتی تکثیر می‌یابند، به همین جهت سلول‌های مناسبی برای استفاده در مطالعات مرتبط با ژن درمانی، سلول درمانی و مهندسی بافت به حساب می‌آیند، همچنین مطالعه تمایز آنها در محیط کشت در برخی راهبردهای سلول درمانی و پیوند سلول‌های تمایز یافته حائز اهمیت هستند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بنیادی که در انستیتو پاستور ایران انجام شد از60 قطعه جوجه سالم نژاد Raf و Hiline در سنین متغیر 3، 5، 10، 15، 20 و 25 روزه استفاده شد. این تحقیق بر اساس قوانین بین المللی رعایت اخلاق در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید. ابتدا جوجه‌ها توسط کلروفرم بیهوش شده و با استفاده از سرنگ شماره 19 (شرکت اروم سرنگ)، نیم میلی‌لیتر مغز استخوان از استخوان تیبیا و فمور آسپیره شد و با 3 میلی لیتر محیط (Dulbecos Modified Eagle Medium- DMEM) رقیق شد. به منظور حذف بقایای گلبول‌های قرمز، فالکون 15 سی سی (Falcon , USA) حاوی مغزاستخوان، به

www.SID.ir

Archive of SID

مدت 4 دقیقه و در دور 1500 rpm سانتریفوژ (Universal, USA) شد و پلیت سلولی حاصل در 1 میلی‌لیتر محیط جدید معلق گردید.

بـه منظورکـشت و تکثیـر سـلولی، سوسپانـسیون سلولی در محیط کشت DMEM بـا درصـد گلـوکز پـایین، 10 درصد سرم جنین گاوی، پنی سیلین 100 واحـد در سـی سی و 100 میکروگرم در سی‌سی استروپتومایسین (Sigma, USA) در داخل فلاسـک‌هـای 25 سـانتی‌متـری , Falcon (USA) کـشت داده شـدند و بـه انکوبـاتور 37 درجـه سـانتی‌گـراد (Tritec, Germany) و رطوبـت 95 در صـد منتقل گردیدند و پس از 24 ساعت و سپس هر سه روز یک بار محیط کشت سـلول‌هـا تعـویض مـی‌شـد. پـس از 3 روز، اولین سلول‌های فیبروبلاستی مـشاهده شـدند و بعـد از 8 روز 80-70 درصـد سـطح ظـرف کـشت را پوشـاندند. سـپس بـه منظـور تکثیـر سـلولی، اولـین پاسـاژ سـلولی بـه کمـک Try/EDTA(Gibco) انجام و در هر پاسـاژ بخـشی از آنهـا به منظور نگهداری در ازت مایع، با محلول فریز کننده شامل 10 درصـد DMSO و 90 درصـد (Fetal Bovine Serum-FBS)، فریز شد. سـلول‌هـا بـه مـدت 1 سـاعت در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد (ایران پویا)، یک شبانه روز در فریزر 80- درجه سانتی‌گراد (ایران پویا) قرار گرفتـه و بـرای نگهداری طولانی مدت به نیتروژن مـایع 196- درجـه منتقـل شدند.

از قابلیت تمایزی سلول‌های جدا شده به عنوان تست تعیین هویت این سلول‌ها استفاده شد. به این منظور از سلول‌های پاساژ سوم جوجه‌های 15 روزه هر دو نژاد استفاده شد. ابتدا سلول‌های مزانشیمی موجود در فلاسک تریپسینه شده و به کمک لام نئوبار(HBG, Germany) مورد شمارش سلولی قرار گرفتند و تعداد 4000 سلول بر سانتی‌متر مربع در دیش‌های 12 خانه‌ای کشت داده شدند. سلول‌ها به دو گروه کنترل و آزمایش تقسیم شدند. پس از پر شدن 80-70 درصد از کف دیش، محیط این سلول‌ها تعویض گردید و به خانه‌های گروه کنترل، محیط کشت معمولی و به خانه‌های آزمایش محیط القاء کننده تمایز اضافه گردید.

محیط تمایز به سمت استئوسیت شامل DMEM، 10 FBS درصد حاوی 50 میکروگرم در میلی‌لیتر - Lآسکوربیک اسید 2- فسفات (Sigma,USA)، دگزامتازون 10^{-7} مولار (Sigma) USA و بتا گلیسرول فسفات (Sigma,USA) 10میلی‌مولار بود. هر3 روز یک بار محیط کشت تعویض شد و به مدت 21 روز سلول‌ها تحت تأثیر محیط القا کننده تمایز استئوسیت قرار گرفتند. به منظور ارزیابی تمایز، رنگ آمیزی برای تشخیص ذخایر کلسیمی صورت گرفت. برای این رنگ آمیزی، در ابتدا محیط رویی تخلیه و سپس سلول‌ها دو بار با (Phosphate Buffer Saline- PBS) شستشو شده و با پارافرمالدئید 4 درصد به مدت 30 دقیقه فیکس شدند و سپس با محلول رنگی 1 درصد رنگ آلیزارین رد S (Sigma,USA) در آب آمونیاکی 0/25 درصد به مدت 20 دقیقه رنگ آمیزی شدند(14). پس از آن رنگ اضافی از محیط خارج و با PBS دو بار شسته شدند و بعد از رنگ آمیزی با آلیزارین رد در ظرف کشت 12 خانه‌ای، از هر خانه 6 فیلد به طور تصادفی انتخاب و با استفاده از میکرومتر چشمی درصد مناطق رنگی (معدنی شده) در کشت سلولی دو نژاد تعیین شد. هر تست 5 بار تکرار شد و میانگین آنها مورد مقایسه قرار گرفت.

تمایز به سمت آدیپوسیت و ارزیابی آن:

محیط تمایز به آدیپوسیت شامل DMEM-LG،10 درصد FBS محتوی 10^{-7} مولار دگزامتازون (Sigma) USA، نیم میلی مول 3- ایزوبوتیل 1- متیل گزانتین (Sigma) USA، ترکیب انسولین- ترانسفرین- سلنیت سدیم(Gibco) به مقدار یک واحد و 10 میلی مولار ایندو متاسین USA (Sigma) بود که سلو ل‌ها به مدت21 روز تحت تاثیر القا قرار گرفتند. هر سه روز یک بار تعویض محیط صورت گرفت. جهت ارزیابی تمایز، رنگ آمیزی اویل رد (Sigma,USA) به منظور تشخیص واکوئل‌های چربی انجام شد. ابتدا سلول‌ها به مدت 30 دقیقه با پارافرمالدئید 4 درصد فیکس شده، سپس 15 دقیقه در محلول اویل رد 0/5 درصد در ایزوپروپانول 90 درصد قرار گرفتند(14) و پس از

www.SID.ir

Archive of SID

شستشو با آب مقطر و خروج رنگ اضافی، 6 فیلد به طور تصادفی انتخاب و درصد مناطق رنگی (قطرات چربی) در کشت سلولی هر دو نژاد تعین شد. هر تست 5 بار تکرار شد و میانگین آنها مورد مقایسه قرار گرفت.

تمایز به سمت کندروسیت و ارزیابی آن:

سلول‌ها از فلاسک کشت به تیوب 15 میلی‌لیتری از جنس پروپیلن منتقل و با 1800 دور در دقیقه و به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد و توده کوچک سلولی در ته تیوب تشکیل شد. سپس محیط القا کننده تمایز غضروف که شامل محیط کشت DMEM-LG، FBS 10 درصد محتوی دگزامتازون (Sigma) USA، 50 میکروگرم در میلی لیتر - L آسکوربیک اسید2- فسفات (Sigma) USA، 10 نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد ترانسفورمینگ بتا USA (Sigma) و1 واحد از ترکیب انسولین - ترانسفرین - سلنیت سدیم(Gibco) بود به مدت چهار هفته به سلول‌ها اضافه شد. در این مدت هر سه روز یک بار محیط سلول‌ها تعویض شد. برای ارزیابی تمایز به غضروف، پلیت سلولی به مدت 2 ساعت در پارافرمالدئید 10 درصد فیکس شد و پس از انجام مراحل آب‌گیری و تهیه بلوک پارافینی، برش‌های 5 میکرومتری تهیه گردید و لام‌های به دست آمده به منظورمشاهده هسته، اسید موکوپلی ساکاریدها و موکوپلی ساکاریدهای سولفاته مترشحه از سلول‌های غضروفی با استفاده از رنگ تولوئیدن بلو (Sigma,USA) با غلظت 0/1 درصد رنگ آمیزی شد و رنگ‌های اضافی با آب مقطر شسته شد(14). هسته، اسید موکوپلی ساکاریدها و موکوپلی ساکاریدهای سولفاته مترشحه از سلول‌های غضروفی به وسیله میکروسکوپ نوری و نرم افزارMotic در واحد سطح تحت بررسی قرار گرفتند. در مشاهدات میکروسکوپی به وسیله روش cell counting شمارش سلولی در کشت سلولی برای هر دو نژاد انجام شد و میانگین آنها مورد مقایسه قرار گرفت.

داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون آنالیز واریانس و برنامه آماری SPSS نسخه 10 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. کلیه آزمایش‌ها حداقل 5 بار تکرار شده و داده‌ها به صورت میانگین ±انحراف معیار گزارش شده است. مقادیر $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

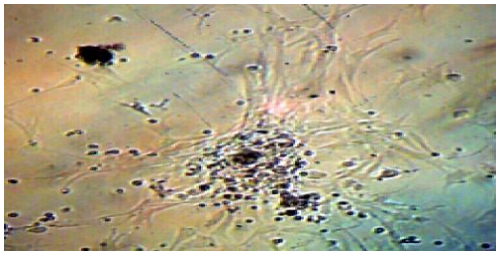
یافته ها

برای بررسی تاثیر نژاد جوجه بر مورفولوژی و تمایز سلول‌ها، وضعیت کشت سلولی هر روز با میکروسکوپ فاز کنتراست (Zeiss , Germany) مشاهده شد. 24 ساعت بعد از کشت سلولی و حذف سلول‌های غیر چسبان، سلول‌های دوکی شکل به کف ظرف کشت پلاستیک چسبیدند، تعداد این سلول‌ها در ابتدا کم بوده و پس از 3 روز، اولین سلول‌ها با مورفولوژی دوکی شکل به شکل کلونی‌های جدا از هم دیده شدند(شکل 1-الف)، پس از 7روز به تدریج کلونی‌ها بیشتر شدند(شکل 1-ب) و با تکثیر سریع این کلونی‌ها، تمام کف فلاسک پس از دو هفته پر شد. به منظور ازدیاد و خالص سازی سلول‌ها با انجام اولین پاساژ سلولی، 4-3 روز طول کشید تا مجدداً کف ظرف به تراکم 80-70 درصد برسد و پاساژ بعدی انجام پذیرد. حاصل این تریپسینه کردن در پاساژهای 3 به بعد ایجاد جمعیت نسبتاً یکنواخت از سلول‌های دوکی فیبروبلاستی بود(شکل1- ج) که این سلول‌ها، شکل شبه فیبروبلاستی خود را در طول کلیه پاساژها حفظ کردند.

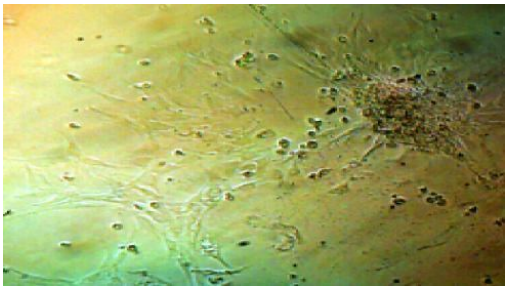
در جوجه‌های نژاد تخمگذار پس از تعویض محیط کشت، سلول‌هایی که به شکل شناور در محیط قرار داشتند، خارج شدند و تنها سلول‌هایی که به کف ظرف چسبیده بودند، باقی ماندند. تعداد این سلول‌ها در ابتدا بسیار کم بود(شکل 2- الف) و بعد از 7 روز به ندرت سلول‌های دوکی به شکل کلونی مشاهده گردید(شکل 2- ب). با تکثیر آرام این کلو نی‌ها، تمام کف فلاسک پس از 3 هفته پر شد. به منظور ازدیاد و خالص سازی سلول‌ها با انجام اولین پاساژ سلولی، 7 روز طول کشید تا مجدداً کف ظرف به تراکم 80-70 درصد برسد تا پاساژ بعدی انجام پذیرد. حاصل این تریپسینه کردن در پاساژهای 3 به بعد ایجاد جمعیت نسبتاً یکنواخت از سلول‌های دوکی فیبروبلاستی بود(شکل 2- ج). این سلول‌ها، ظاهر شبه فیبروبلاستی خود را در پاساژها حفظ کردند.

www.SID.ir

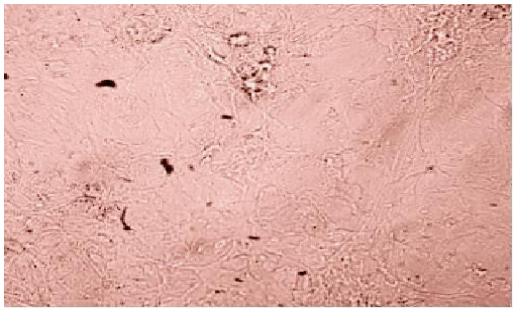
Archive of SID



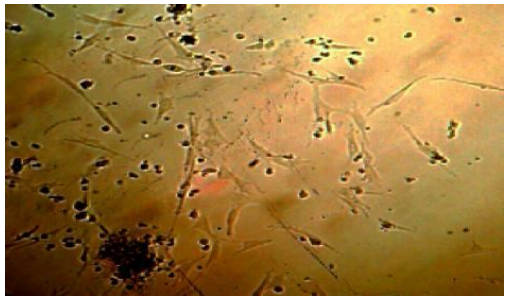
شکل 1. مورفولوژی سلول‌های کشت شده در جوجه‌های نژاد گوشتی
الف: روز سوم پس از کشت اولیه سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان جوجه‌های نژاد گوشتی(بزرگنمایی 100×)



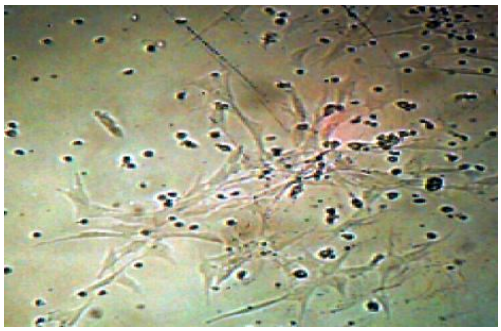
ب. روز هفتم پس از کشت اولیه سلول های مزانشیمی مغز استخوان جوجه های نژاد گوشتی(بزرگنمایی 100×)



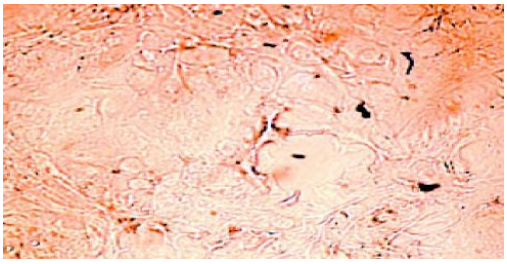
ج. پاساژ سوم سلول های مزانشیمی مغز استخوان جوجه های نژاد گوشتی(بزرگنمایی 100×)



شکل 2. مورفولوژی سلولهای کشت شده درجوجه های نژاد تخمگذار
الف. روز سوم پس از کشت اولیه سلول های مزانشیمی مغز استخوان جوجه های نژاد تخمگذار(بزرگنمایی 100×)



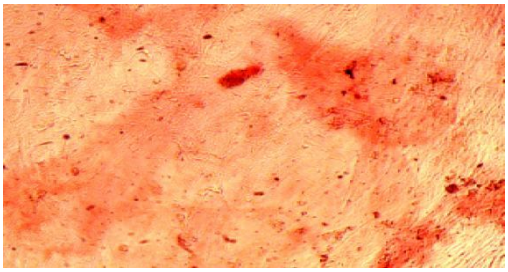
ب. روز هفتم پس از کشت اولیه سلول های مزانشیمی مغز استخوان جوجه های نژاد تخمگذار(بزرگنمایی 100×)



ج. پاساژ سوم سلول های مزانشیمی مغز استخوان جوجه های نژاد تخمگذار(بزرگنمایی 100×)

تمایز به استخوان

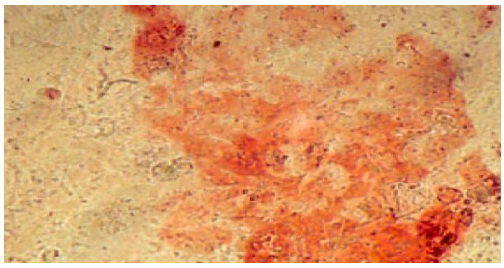
نتیجه رنگ آمیزی اختصاصی استخوان، قرمز شدن مواد خارج سلولی معدنی شده در کشت تمایز به استخوان بود. کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژادگوشتی به طور یکنواخت (67/16±2/7) قرمز شد در حالی که در سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان جوجه نژاد تخم گذار تنها 38/14± 1/9 مناطق کشت رنگ گرفت که این مقادیر در بین دو نژاد جوجه به طور معنی‌داری متفاوت بود ($p<0/05$) (شکل 3-الف و 3-ب).



شکل 3. الف. تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی نژاد گوشتی به استخوان (بزرگنمایی 100×)

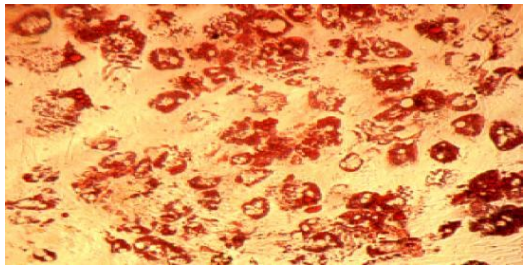
www.SID.ir

Archive of SID

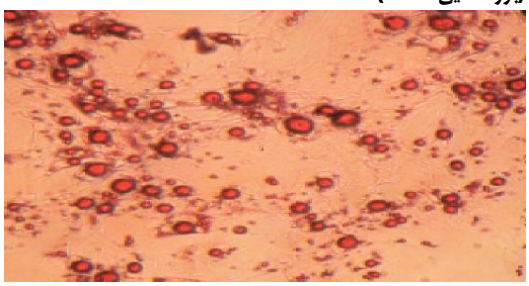


ب. تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی نژاد تخمگذار به استخوان (بزرگنمایی ×100)

در پایان دوره تمایز، رنگ آمیزی اویل رد نشان داد که در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد گوشتی، تعداد سلول‌های چربی به طور معنی‌داری (85/50±1/33) بیش از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد تخم گذار (58/41±1/52) بود که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود($p<0/0 5$)،(شکل 4-الف و 4-ب).

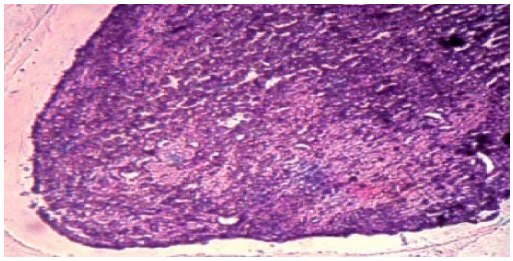


شکل 4. الف. تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی نژاد گوشتی به چربی (بزرگنمایی ×100)

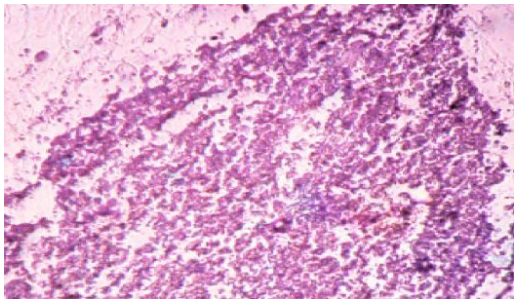


ب. تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی نژاد تخمگذار به چربی (بزرگنمایی ×100)

نتایج رنگ آمیزی تولوئیدن بلو برای ارزیابی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به غضروف نشان داد که در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد گوشتی، تعداد سلول‌های تبدیل شده به غضروف (81/16±2/24) به طور معنی‌داری بیش از تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی تبدیل شده به غضروف مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد تخم گذار (55/19±2/31) می‌باشد($p<0/05$). (شکل 5-الف و 5-ب).



شکل 5. الف. تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی جوجه نژاد گوشتی به غضروف (بزرگنمایی ×400)



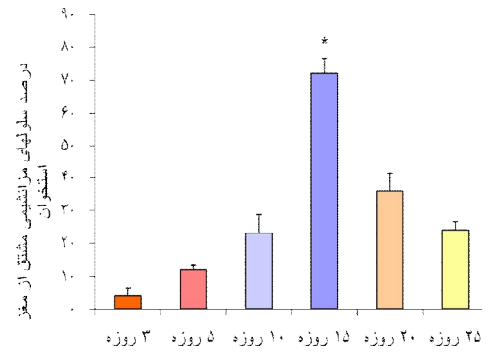
ب. تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی جوجه نژاد تخمگذار به غضروف (بزرگنمایی ×250)

نتایج تأثیر سن جوجه در میزان مغز استخوان استخراج شده:

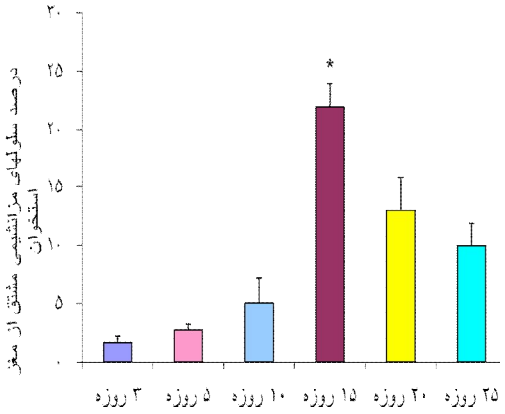
در جوجه‌هایی با سن 3، 5 و10 روزه در هر دونژاد میزان مغز استخوان اندک و تراکم سلولی در محیط کشت بسیارکم بود و در جوجه‌هایی با سن 20 و 25 روزه مغز استخوان به صورت بافت چربی در آمده و جدا سازی به سختی صورت می گرفت. جوجه‌های نژاد گوشتی 15 روزه، بهترین روند جدا سازی و کشت سلولی را دارا بودند، به همین دلیل به منظور تعیین هویت سلول‌های مزانشیمی و تست‌های تمایزی از این سلول‌ها در طول انجام آزمایش استفاده شد(نمودار1 و نمودار2). همان طور که در نمودار 3 نشان داده شده است. در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از جوجه 15 روزه نژاد گوشتی، تعداد سلول‌ها به طور معنی‌داری (72/05±4/5) بیش از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از جوجه تخم‌گذار 15 روزه (22/80±1/29) بود ($p<0/05$).

www.SID.ir

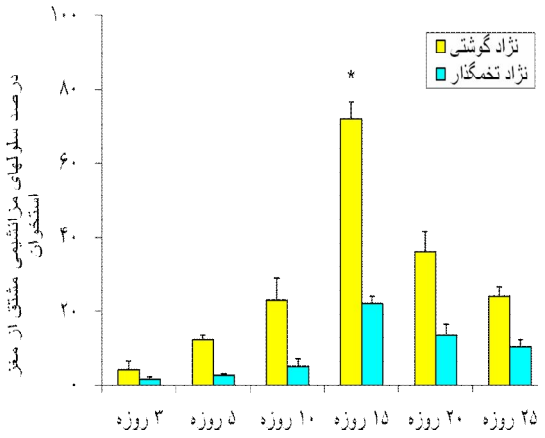
Archive of SID



نمودار 1. تأثیر سن جوجه های گوشتی در بازده تمایزسلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان(p<0/0 5*)



نمودار 2. تأثیر سن جوجه های تخمگذار در بازده تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان(p<0/0 5*)



نمودار 3. مقایسه بازده تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در جوجه های نژاد گوشتی و تخمگذار(p<0/0 5*)

بحث

در مطالعه حاضر با کشت مغز استخوان استخراج شده از استخوان ران جوجه‌های نژاد گوشتی و تخم‌گذار، سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در آن جداسازی و تکثیر شد تا توان آنها در تمایز به سه رده استخوان، چربی و غضروفی ارزیابی گردد. اگرچه سلول‌های بنیادی مزانشیمی گونه‌های حیوانی مختلف به طور مکرر در مطالعات پیش کلینیکی و مرتبط با سلول درمانی استفاده می‌شود، با این وجود توان تمایزی این سلول‌ها در محیط کشت کمتر بررسی شده است. لذا در تحقیق حاضر این موضوع مورد توجه قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی این گونه حیوانی از نظر تمایز سه ظرفیتی بوده و قادرند با فراهم کردن شرایط مناسب در محیط آزمایشگاهی، به سه رده استخوانی، چربی و غضروفی تمایز یابند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های چند ظرفیتی هستند که توانایی تمایز به انواع دودمان‌های بافت همبند از جمله آدیپوسیت‌ها، کندروسیت‌ها و استئوسیت‌ها را دارا می‌باشند. خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی در آزمایشگاه‌ها و در بین گونه‌های مختلف، متفاوت می‌باشد و هیچ مارکر ویژه یا مجموعه‌ای از مارکرها که سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در محیط کشت in vitro و in vivo شناسایی کند وجو د ندارد(17-16).

واضح است که معیارهای مورفولوژیکی یا فنوتیپی برای شناسایی ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی کافی نمی‌باشد. یک روش تعریف شده متداول و شاید تنها روش مطمئن برای تشخیص جمعیت‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت، خاصیت ادیپوژنز، استئوژنز و کندروژنز آنها و توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به این سه رده است(20-18). اکثریت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت به راحتی ندول‌های استخوانی غنی از پروتئوگلیکان تولید می‌کنند که با تکنیک آلیزارین رد رنگ پذیرند. بسیاری از کلونی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت شرایط کشت صحیح، قطرات چربی در سیتوپلاسم خود تولید می‌کنند و در مسیر آدیپوژنیک قرار می‌گیرند و با اویل رد، قرمز رنگ می‌شوند. تعداد کمی از کلونی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بر اساس نوع گونه و شرایط محیط کشت می‌توانند پروتئین‌های گلیکوزآمینو

www.SID.ir

Archive of SID

گلیکان را تولید نموده و به کندروسیت‌های بالغ تمایز یابند و با تولوئیدن بلو به رنگ بنفش در آیند.

این نکته حائز اهمیت است که امروزه تمام سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده، از طریق سنجش‌های کلونی (Colony Assay) نشان دادند که دارای سلول‌هایی با توانایی تمایزی و ظرفیت تکثیری می‌باشند(21، 22) که در این تحقیق سلول‌های چسبنده حاصل از پاساژ سوم، به راحتی در محیط‌های ویژه به استخوان، چربی و غضروف تمایز یافتند. هر چند هنوز مارکر اختصاصی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی جوجه گزارش نشده، اما فاکتورهای زیر تایید کننده این مطلب هستند که سلول‌های جدا شده در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند؛

در این مطالعه جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از روش‌های معمول و شناخته شده جداسازی این سلول‌ها در انسان و سایر گونه‌ها استفاده شد. همچنین این سلول‌ها از لحاظ مورفولوژی بسیار شبیه به سلول‌های جدا شده از انسان و رده جوندگان بودند. به علاوه این سلول‌ها تا پاساژهای 3 تکثیر پیدا کرده در عین حال که مورفولوژی و خصوصیات رشد و تشکیل کلونی را همچنان حفظ کردند و مهمتر این که سلول‌های جدا شده در این مطالعه توانستند در محیط کشت به سلول‌های استخوانی، غضروف و چربی تمایز پیدا کنند. شاید مهم‌ترین نکته قابل توجه در این تحقیق مشاهده پتانسیل بالای تمایزی در جوجه نژاد گوشتی بود، به طوری که در مقایسه با سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان جوجه‌های نژاد تخم‌گذار، سلول‌های مزانشیمی حاصل از مغز استخوان جوجه‌های نژاد گوشتی، مورفولوژی بهتری داشتند. به علاوه در شرایط تمایز، درصد بیشتری از آنها به استخوان، چربی و غضروف تبدیل شدند. اما این که چرا سلول‌های بنیادی مزانشیمی جوجه نژاد گوشتی نسبت به سلول‌های مزانشیمی تخلیص شده از مغز استخوان جوجه تخم‌گذار توانایی تکثیر بالایی داشته و این توانایی تکثیر را در دوره زمانی طولانی‌تری حفظ می‌کنند و همچنین توان تمایزی بالاتری را نشان می‌دهند، هنوز معلوم نیست اما این طور به نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جوجه نژاد گوشتی خواص پروژنیتوری بیشتری داشته باشند که البته اثبات این موضوع به تحقیقات بیشتری نیازمند است. همچنین بر خلاف تصور، دهنده‌های مناسب مغز استخوان برای جدا سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، جوجه‌های 15 روزه نژادگوشتی می‌باشند.

مطالعه حاضر، اولین گزارش مبنی بر وجود برخی تفاوت‌های معنی‌دار بین سلول‌های مزانشیمی حاصل از مغز استخوان دو نژاد مختلف جوجه است. چنانچه این موضوع در تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرد می‌توان امیدوار بود که از این نتایج برای مقاصد ژن درمانی، سلول درمانی، مهندسی بافت و در جهت پرورش پرندگان مقاوم به بیماری‌هایی چون آنفولانزای مرغی استفاده کرد.

نتیجه گیری

سلول‌های مزانشیمی حاصل از مغز استخوان جوجه‌های 15 روزه نژاد گوشتی از لحاظ مورفولوژی شباهت زیادی به سلول‌های فیبروبلاستی دارند و سرعت رشد و تکثیر بالاتری را نشان می‌دهند. به علاوه در شرایط تمایز، درصد بیشتری از آنها به استخوان چربی و غضروف تبدیل می‌شوند که می‌تواند تایید کننده این موضوع باشد که برخی خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی منحصر به نژادهای خاص است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت‌های مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان انجام شده است که بدینوسیله از حمایت‌های مرکز مذکور قدردانی می‌نماییم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol. 2005 Nov; 33(11):1402-16.
2. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med (Maywood). 2001 Jun;226(6):507-20.
3. Fibbe WE, Noort WA. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation. Ann N Y Acad Sci. 2003 May; 996: 235-44.
4. Fliedner TM. The role of blood stem cells in hematopoietic cell renewal. Stem Cells. 1998; 16(6): 361-74.
5. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood. 2003 Nov;102(10): 3483-93.
6. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. J Gene Med. 2003 Dec;5(12):1028-38.
7. Wang JA, Li CL, Fan YQ, He H, Sun Y. Allograftic bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted into heart infarcted model of rabbit to renovate infarcted heart. J Zhejiang Univ Sci. 2004 Oct;5(10):1279-85.
8. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. Stem Cells. 2005 Sep;23(8):1105-12.
9. Quiroz F, Posada O, Gallego D, Higuita N, Sarassa C, Hansford D, et al. Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells and evaluation of their osteogenic potential. Revista Ingenier a Biomédica. 2008; 2(3): 48-55.
10. Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, Davis-Sproul J, Chuang LC, Majumdar MK, et al. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. Clin Orthop Relat Res. 2000 Oct(379 Suppl): S71-90.
11.Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. Gene Ther. 2008 Jan;15(2):109-16.
12. Eslaminejad MB, Mirzadeh H, Mohamadi Y, Nickmahzar A. Bone differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells using beta-tricalcium phosphate-alginate-gelatin hybrid scaffolds. J Tissue Eng Regen Med. 2007 Nov-Dec;1(6):417-24.
13. Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, Massumi M, Atashi A, Izadpanah R. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. Int J Dev Biol. 2007;51(8):723-9.
14. Kadivar M, Piryaei F, Ramezani M. Isolation, Culture and Differentiation of Chicken Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Armaghan Danesh. 2010; 14(4 (56)):1-11.
15. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. Exp Hematol. 2002 Aug; 30(8): 879-86.
16. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999 Apr; 284(5411): 143-7.
17. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004 Jul-Sep; 8(3): 301-16.
18. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. Nat Biotechnol. 2000 Sep;18(9):959-63.
19. Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X ,Tang PH, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. Stem Cells. 2003; 21(5): 527-35.
20. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science. 1997 Apr; 276(5309): 71-4.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, etal. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol. 1974; 2(2): 83-92.

22. Friedenstein AJ ,Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation. 1974 Apr;17(4):331-40.

www.SID.ir