

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

**Piryaei F<sup>1</sup>, Ramezani M<sup>2\*</sup>, Piryaei F<sup>3</sup>**

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

Received 11 Apr 2010, Accepted 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

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

فاطمه پیریانی<sup>1</sup>، مینا رضانی<sup>2\*</sup>، فهیمه پیریانی<sup>3</sup>

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

تاریخ دریافت 89/1/22، تاریخ پذیرش 89/3/26

### 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 کشت DMEM با درصد گلوکز پایین و سرم جنین گاوی 10 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.

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

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

## مقدمه

بنیادی مزانشیمی از قبیل ماهیت سلولی، منشا تکاملی، عملکرد سلولی و پتانسیل تمایز حائز اهمیت است که هنوز بسیاری از این مسائل در vivo ناشناخته باقی مانده است (10-12). تاکنون سلول‌های بنیادی مغز استخوان حیواناتی مثل خوک، بز، گوسفند، میمون، خرگوش، اسب، موش، گاو و جوجه با روش‌های خاص جدا سازی شده و به انواع دیگری از سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی تمایز داده شده (13-15) 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 از 60 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 (شرکت اروم تیبا و فمور آسپیره شد و با 3 میلی لیتر محیط استخوان (Dulbecos Modified Eagle Medium- DMEM) رقیق شد. به منظور حذف بقایای گلبول‌های قرمز، فالكون 15 سی سی (Falcon, USA) حاوی مغز استخوان، به

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 (6-9). 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

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

به منظور کشت و تکثیر سلولی، سوسپانسیون سلولی در محیط کشت DMEM با درصد گلوکز پایین، 10 درصد سرم جنین گاوی، پنی سیلین 100 واحد درسی سی و 100 میکروگرم در سی سی استروپتومايسين (Sigma, USA) در داخل فلاسک های 25 سانتی متری Falcon (USA) کشت داده شدند و به انکوباتور 37 درجه سانتی گراد (Tritec, Germany) و رطوبت 95 درصد منتقل گردیدند و پس از 24 ساعت و سپس هر سه روز یک بار محیط کشت سلول ها تعویض می شد. پس از 3 روز، اولین سلول های فیبروبلاستی مشاهده شدند و بعد از 8 روز 70-80 درصد سطح ظرف کشت را پوشاندند. سپس به منظور تکثیر سلولی، اولین پاساژ سلولی به کمک Try/EDTA (Gibco) انجام و در هر پاساژ بخشی از آنها به منظور نگهداری در ازت مایع، با محلول فریز کننده شامل 10 درصد DMSO و 90 درصد (Fetal Bovine Serum-FBS)، فریز شد. سلول ها به مدت 1 ساعت در فریزر 20- درجه سانتی گراد (ایران پویا)، یک شبانه روز در فریزر 80- درجه سانتی گراد (ایران پویا) قرار گرفته و برای نگهداری طولانی مدت به نیتروژن مایع 196- درجه منتقل شدند.

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

محیط 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 (Sigma) بود که سلول ها به مدت 21 روز تحت تاثیر القا قرار گرفتند. هر سه روز یک بار تعویض محیط صورت گرفت. جهت ارزیابی تمایز، رنگ آمیزی اوایل رد (Sigma, USA) به منظور تشخیص واکوئل های چربی انجام شد. ابتدا سلول ها به مدت 30 دقیقه با پارافرمالدئید 4 درصد فیکس شده، سپس 15 دقیقه در محلول اوایل رد 0/5 درصد در ایزوپروپانول 90 درصد قرار گرفتند (14) و پس از

و داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده است. مقادیر  $p < 0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

برای بررسی تأثیر 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 پلاستیکی 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 7 روز 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، 3-4 روز طول کشید تا مجدداً کف ظرف به تراکم 70-80 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 (شکل 1-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 کلونی‌ها، 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 70-80 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.

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 تعیین شد. هر تست 5 بار تکرار شد و میانگین آنها مورد مقایسه قرار گرفت.

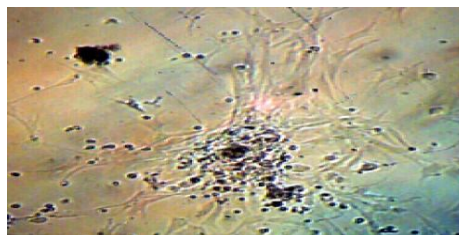
تمایز به سمت کندروسیت و ارزیابی آن:

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 میلی‌لیتر - L آسکوربیک اسید 2- فسفات (Sigma) USA، 10 نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد ترانسفورمینگ بتا (Sigma) USA و 1 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 منظور مشاهده هسته، اسید موکوپلی ساکاریدها و موکوپلی ساکاریدهای سولفات‌ها مترشحه از سلول‌های غضروفی با استفاده از رنگ تولوئیدین 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 سولفات‌ها مترشحه از سلول‌های غضروفی به وسیله میکروسکوپ نوری و نرم افزار Motic 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.

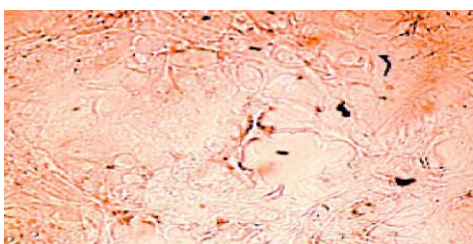
داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون آنالیز واریانس و برنامه آماری SPSS نسخه 10 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. کلیه آزمایش‌ها حداقل 5 بار تکرار شده



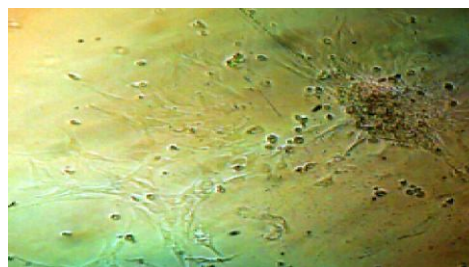
ب. روز هفتم پس از کشت اولیه سلول های مزانشیمی مغز استخوان جوجه های نژاد تخمگذار (بزرگنمایی  $\times 100$ )



شکل 1. مورفولوژی سلول های کشت شده در جوجه های نژاد گوشتی الف: روز سوم پس از کشت اولیه سلول های مزانشیمی مغز استخوان جوجه های نژاد گوشتی (بزرگنمایی  $\times 100$ )



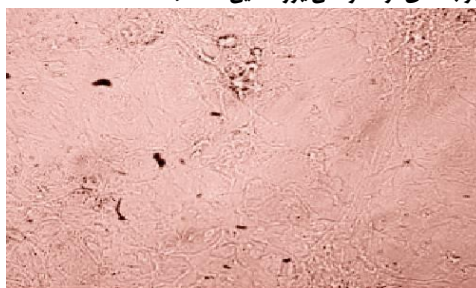
ج. پاساژ سوم سلول های مزانشیمی مغز استخوان جوجه های نژاد تخمگذار (بزرگنمایی  $\times 100$ )



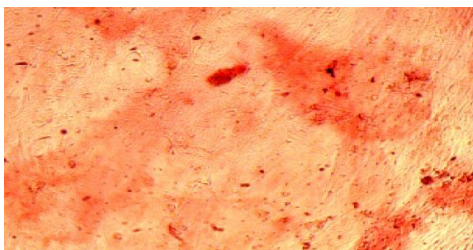
ب. روز هفتم پس از کشت اولیه سلول های مزانشیمی مغز استخوان جوجه های نژاد گوشتی (بزرگنمایی  $\times 100$ )

تمایز به استخوان

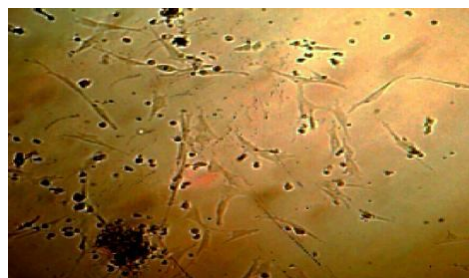
نتیجه رنگ آمیزی اختصاصی استخوان، قرمز شدن مواد خارج سلولی معدنی شده در کشت تمایز به استخوان بود. کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد گوشتی به طور یکنواخت  $(67/16 \pm 2/7)$  قرمز شد در حالی که در سلول های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان جوجه نژاد تخم گذار تنها  $38/14 \pm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



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

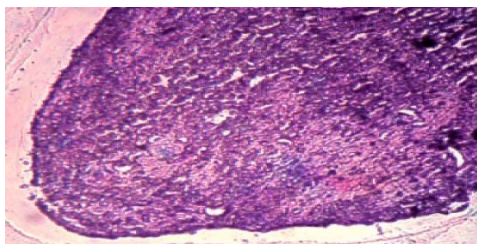


شکل 3. الف. تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی نژاد گوشتی به استخوان (بزرگنمایی  $\times 100$ )

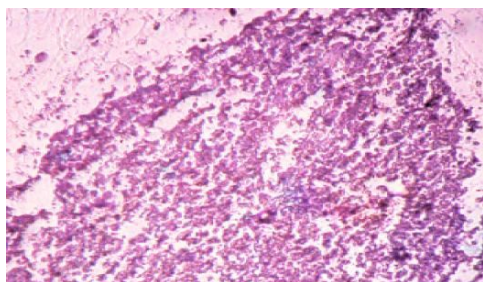


شکل 2. مورفولوژی سلول های کشت شده در جوجه های نژاد تخمگذار الف. روز سوم پس از کشت اولیه سلول های مزانشیمی مغز استخوان جوجه های نژاد تخمگذار (بزرگنمایی  $\times 100$ )

استخوان جوجه نژاد تخم گذار (55/19±2/31) می‌باشد (p<0/05). (شکل 5-الف و 5-ب).

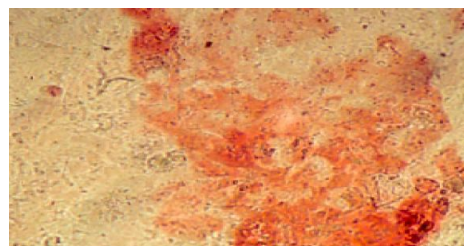


شکل 5. الف. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جوجه نژاد گوشتی به غضروف (بزرگنمایی 400×)



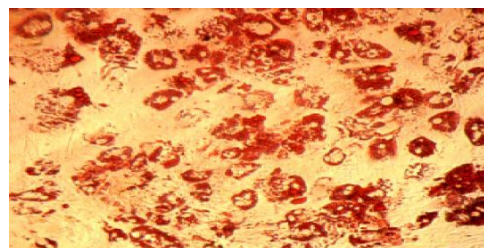
ب. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جوجه نژاد تخم‌گذار به غضروف (بزرگنمایی 250×)

نتایج تأثیر سن جوجه در میزان مغز استخوان استخراج شده: در جوجه‌هایی با سن 3، 5 و 10 روزه در هر دو نژاد میزان مغز استخوان اندک و تراکم سلولی در محیط کشت بسیار کم بود و در جوجه‌هایی با سن 20 و 25 روزه مغز استخوان به صورت بافت چربی در آمده و جدا سازی به سختی صورت می‌گرفت. 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 (نمودار 1 و نمودار 2). 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).

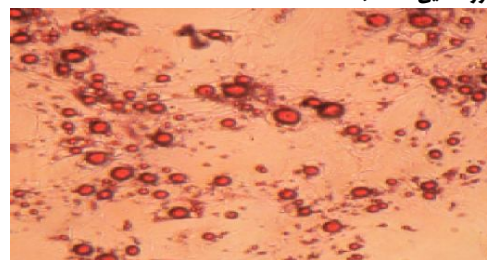


ب. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی نژاد تخم‌گذار به استخوان (بزرگنمایی 100×)

در پایان دوره تمایز، رنگ آمیزی اوایل 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 تخم‌گذار (58/41±1/52) بود که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p<0/05)، (شکل 4-الف و 4-ب).



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

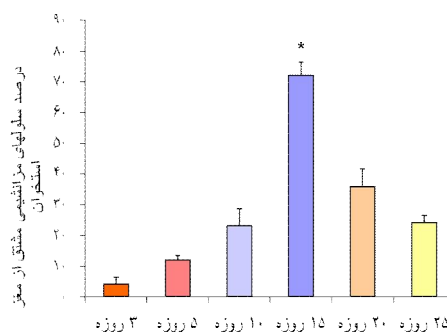


ب. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی نژاد تخم‌گذار به چربی (بزرگنمایی 100×)

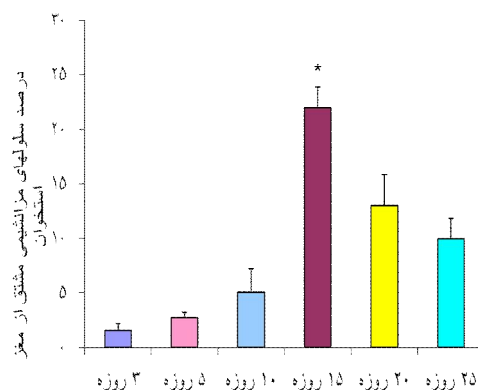
نتایج رنگ آمیزی تولوئیدن بلو برای ارزیابی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به غضروف نشان داد که در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه نژاد گوشتی، تعداد سلول‌های تبدیل شده به غضروف (81/16±2/24) به طور معنی‌داری بیش از تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی تبدیل شده به غضروف مشتق از مغز

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 پیش‌کلینیکی و مرتبط با سلول درمانی استفاده می‌شود، با این وجود توان تمایز 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 vivo* و *in vitro* شناسایی کند وجود ندارد (16-17).

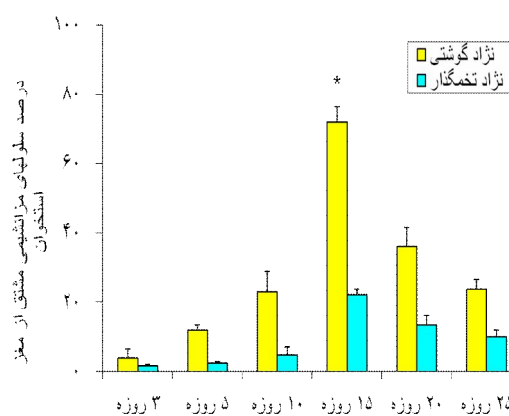
واضح است که معیارهای مورفولوژیکی یا فنوتیپی برای شناسایی ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی کافی نمی‌باشد. یک روش تعریف شده متداول و شاید تنها روش مطمئن برای تشخیص جمعیت‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت، خاصیت ادیپوژنز، استئوژنز و کندروژنز آنها و توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به این سه رده است (18-20). 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 اوایل رد، قرمز رنگ می‌شوند. تعداد کمی از کلونی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بر اساس نوع گونه و شرایط محیط کشت می‌توانند پروتئین‌های گلیکوزآمینو



نمودار 1. تأثیر سن جوجه‌های گوشتی در بازده تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان ( $p < 0/05$ )



نمودار 2. تأثیر سن جوجه‌های تخمگذار در بازده تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان ( $p < 0/05$ )



نمودار 3. مقایسه بازده تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در جوجه‌های نژاد گوشتی و تخمگذار ( $p < 0/05$ )

## بحث

در مطالعه حاضر با کشت مغز استخوان استخراج شده از استخوان ران جوجه‌های نژاد گوشتی و تخم‌گذار،



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)، 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 پروژنیوتوری 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 نژاد گوشتی 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 می‌نمایم.

## 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. Flidner 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, Higuera N, Sarassa C, Hansford D, et al. Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells and evaluation of their osteogenic potential. *Revista Ingenieria Biomédica*. 2008; 2(3): 48-55.
10. Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, Davis-Sprout 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, Hosseini 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, Bensaid 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.

21. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. 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.