جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی۷، جلد ۲، شماره ۴، پاییز ۸۸، صفحه ۳۵ تا صفحه ۴۴

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

مینا رمضانی[۱]، فاطمه پیریایی[۲]، فاطمه عینی[۳]، مهری فلاح رئوفی[۳]
۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان. mina.ramezani@gmail.com
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 وکمتر 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، فیبروبلاستی 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 اویل رد، آلیزارین رد 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، سلول های بنیادی مزانشیمی، تمایز، جوجه.

مقدمه

از دیدگاه دانشمندان یک سلول بنیادی به عنوان یک سلول تمایز نیافته با توانائی 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 بی‌تحرک بوده و با قدرت فاگوسیتی کم می‌باشند و به پیش سازهای خونی تبدیل نمی‌شوند (۴).

سلول‌های مزانشیمی نیز که در حفرات مغز استخوان جای گرفته‌اند، قادرند به سایر سلول‌ها از جمله کندروسیت‌ها، اوستئوبلاست‌ها، فیبروبلاست‌ها، آدیپوست‌ها، سلول‌های اندوتلیال و میوسیت‌ها در آزمایشگاه تبدیل شوند (۱۰،۱۱،۱۸،۲۰). اگر چه منشاء 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 تنظیم کننده 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 پلاستیسیتی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

می گویند. 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 نادربوده، 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 وچربی قادرند به سلول‌های رده غضروف نیز تمایز یابند (۱۲،۱۴،۱۶). 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 هم چون شبیه‌سازی، انتقال ژن و یا بررسی بیماری‌های ویروسی در پرندگان می‌باشد. هم چنین از آن‌ها می‌توان جهت استفاده در تحقیقات واکسن، تست تشخیصی ویروس‌شناسی، ژن درمانی، درمان بیماری‌های پرندگان و درمان بیماری های مشترک 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 M۱۹۹(Sigma,USA) حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاوی به آرامی بر روی محلول فایکول (Inotrain) بارگذاری گردید. پس از ایجاد محلول دو فازی، فالکون‌ها 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 گلبول‌های قرمز و پلاسما قرار گرفته و به آرامی سلول‌ها را برداشته به فالکون‌های 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 فالکون، در ۵ سی سی محیط کشت M۱۹۹ معلق و در فلاسک ۲۵سانتی‌متری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط M۱۹۹حاوی۱۰درصد سرم جنین گاوی، پنی سیلین ۱۰۰ واحد در سی سی و ۱۰۰ میکروگرم در سی‌سی استرپتومایسین (Sigma,USA) کشت داده شد. سپس سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصدCO_2 انکوبه شدند. ۳ روز پس از آغاز کشت، محیط سلول ها تعویض و پس از آن هر دو روز یک بار تعویض محیط کشت انجام گرفت. زمانی که سلول ها تمام سطح کشت را پر کردند به نسبت ۱:۲پاساژ داده و این عمل تا پاساژدهم ادامه یافت. از سلول‌های پاساژ چهارم برای مرحله بعدی تحقیق یعنی بررسی توان تمایز سلول ها استفاده شد.

بررسی توان تمایزی سلول‌ها

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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سلول شد، محیط آن‌ها با محیط القاکننده تمایز به استخوان شامل محیط M۱۹۹، ۱۰درصد FBS محتوی دگزامتازون یک میلی مولار (Sigma,USA)، L -آسکوربیک اسید ۲- فسفات ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر (Sigma,USA)، فاکتور رشد بتا ترانسفورمینگ ۱۰نانوگرم بر میلی‌لیتر (Sigma,USA) و بتا گلیسرول فسفات ۱۰ میلی مولار (Sigma,USA) جایگزین شد. به عنوان گروه کنترل، محیط برخی از خانه‌ها باFBS ۱۰درصد جایگزین گردید. کشت سلول به مدت ۲۱ روز در شرایط دمای۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه و هر دو روز یک بار محیط آن‌ها تعویض گردید. در پایان دوره تمایز، وقوع تمایز سلول با روش رنگ آمیزی آلیزارین قرمز بررسی شد.

تمایز به چربی: برای این منظور از سلول‌های پاساژ چهارم استفاده شد. ابتدا سلول‌ها در خانه‌های پلیت شش خانه کشت قرار گرفته و زمانی که کف ظرف کشت از تک لایه سلولی پوشیده و تمایز آغاز گردید، محیط معمولی سلول‌ها با محیط تمایز به چربی شامل M۱۹۹،FBS۱۰٪، دگزامتازون یک میلی مولار (Sigma,USA)، L- آسکوربیک اسید ۲- فسفات ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر(Sigma,USA)، فاکتور رشد بتا ترانسفورمینگ ۱۰نانوگرم بر میلی لیتر (Sigma,USA) و ۱ واحد از ترکیب انسولین-ترانسفرین-سلنیت 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 CO_2 نگهداری و در پایان این مدت با روش رنگ آمیزی Oil Red مورد ارزیابی قرار گرفت.

تمایز به غضروف: به منظور تمایزسلول های مغز استخوان به غضروف از روش Micro mass culture system استفاده شد، بدین ترتیب که ۲×۱۰^۴ سلول پاساژ سوم به یک لوله ۱۵ میلی لیتری انتقال و با دور g۴۵۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محیط رویی تخلیه و محیط القاء کننده غضروف که شامل محیط کشت M۱۹۹،FBS ۱۰٪ محتوی دگزامتازون یک میلی مولار (Sigma,USA)، L- آسکوربیک اسید۲- فسفات ۵۰میکروگرم بر میلی لیتر (Sigma,USA)، فاکتور رشد بتا ترانسفورمینگ ۱۰نانوگرم بر میلی لیتر (Sigma,USA) و۱ واحد از ترکیب انسولین-ترانسفرین-سلنیت سدیم(Gibco) بر روی پلیت سلولی در ته لوله، اضافه شد. محیط تمایز هر ۴-۳ روز یک بار به مدت۲۱ 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 رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین آبی استفاده شد.

رنگ آمیزی آلیزارین رد S: سلول‌ها را با PBS شسته و به مدت ۴۰ دقیقه با پارافرمالدئید ۴٪ تثبیت شدند. رنگ آلیزارین رد S (۲گرم پودر آلیزارین رد S در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و فیلتر گردید) باید تازه و PH آن در محدوده۴/۳ -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: سلول‌ها به مدت یک ساعت دردمای اتاق با فرمالین۴ درصد تثبیت و سپس با الکل ۷۰درصد شسته و به مدت۱۵-۱۰ دقیقه با محلول رنگ Oil Red O (Sigma,USA) (۰/۶۳ گرم پودر رنگ Oil Red O در ۱۰۰میلی لیتر ایزوپروپانول ۶۰٪ حل شده و فیلتر می‌شود) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شده، در پایان محلول رنگی خارج و سلول ها، سه باربا الکل ۷۰ درصد شستشو شدند.

رنگ‌آمیزی 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 آب‌گیری و با کمک گزیلل شفاف‌سازی و در پارافین قالب‌گیری شد. به این ترتیب نمونه‌ها به روش روتین بافتی پردازش و با استفاده از میکروتوم، بر ش‌های

۵ میکرومتری از آن‌ها تهیه شد. برای رنگ‌آمیزی، 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 دورg۶۰۰ سانتریفوژ ودر نهایت پلیت سلولی را با یک میلی لیتر محلول سرد انجماد سلولی که حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۲۰٪ دی متیل سولفوکساید (DMSO) و ۷۰٪ محیط کشت بود سوسپانسیون کرده و به ویال های مخصوص انجماد سلولی منتقل شدند، ویال ها به مدت ۱ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی گرادبه مدت یک شبانه روز در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد قرار گرفته و پس از ۲۴ ساعت، سلول ها برای نگهداری طولانی مدت در نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه قرار داده شدند.

ذوب سلولی

پس از آماده کردن بن ماری ۳۷درجه سانتی‌گراد، سلول‌ها به سرعت از تانک ازت به داخل بن ماری وسپس در زیر هود به ویال منتقل و با کمک پی پت استریل میزان ۴ میلی لیتر از محیط کشت کامل با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد و CO_2 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 سلول ها

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 سلول ها انجام شد.

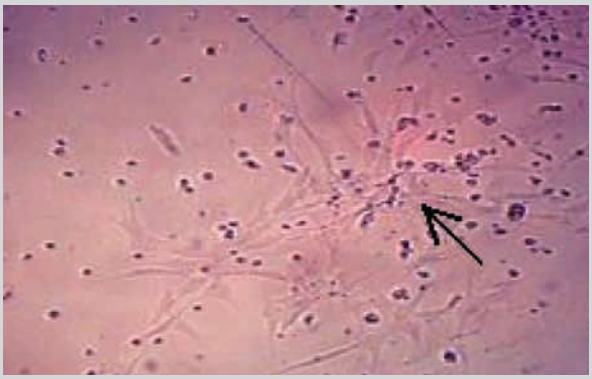
نتایج

کشت سلول ها: کشت سلولی، روزانه با میکروسکوپ معکوس مشاهده شد. بر اساس این مشاهدات، در کشت اولیه کلون هایی از سلول های فیبروبلاستی ظاهر (شکل A ۱) و با گذشت زمان سلول ها رشد کردند، به طوری که ۸ روز پس از آغاز، کشت تک لایه ای از سلول های دوکی شکل تشکیل شد(شکل ۱ B). سلول های فیبروبلاستی مغز استخوان با انجام۱۰ پاساژ متوالی تکثیر شدند. این سلول ها، ریخت شناسی فیبروبلاستی خود را درطی دوره کشت حفظ و از پاساژچهارم به منظور مراحل بعدی آزمایش یعنی تمایز استفاده گردیدند(شکل C۱).

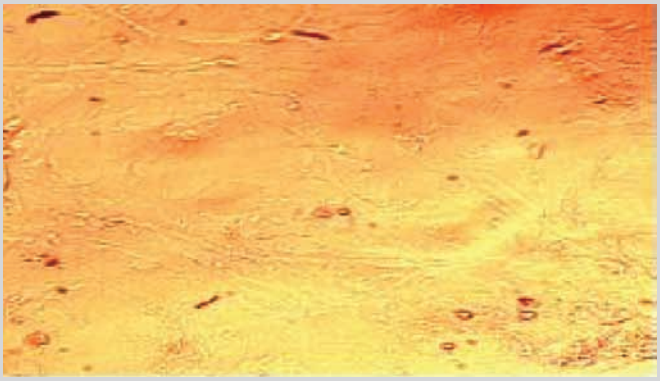
تمایز

تمایز به استخوان: این کشت هر روز با میکروسکوپ معکوس مشاهده شد. اولین نشانه های تغییرات ریخت شناسی وتمایز به استخوان ۵ روز پس از القای تمایز مشاهده گردید. بدین ترتیب که در مناطقی از تک لایه سلولی، توده های سلولی تشکیل و به تدریج بزرگ تر شد(شکل ۲ A). در پایان دوره کشت تمایز(۲۱ روز پس از کشت) توده های سلولی از نظر ترشح ماتریکس معدنی با روش آلیزارین رد ارزیابی شدند که حاصل آن قرمز شدن توده های مذکور بود(شکل ۲ B). در کشت کنترل که سلول ها در معرض محیط معمولی فاقد مواد القا کننده تمایز به استخوان قرار داشتند، توده های سلولی تشکیل نشد و این کشت با آلیزارین قرمز رنگ نشد(شکل C۲).

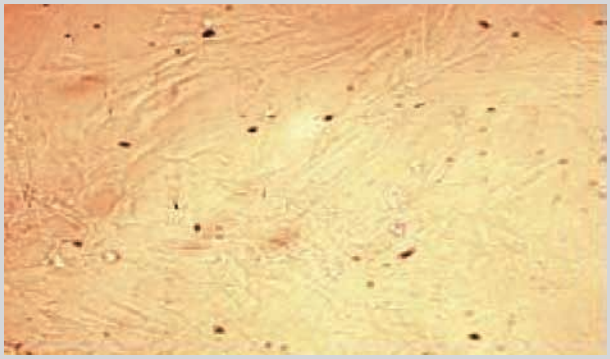
تمایز به چربی: اولین قطرات چربی ۲ روز پس از آغازکشت در برخی از سلول‌ها مشاهده شد. این قطرات



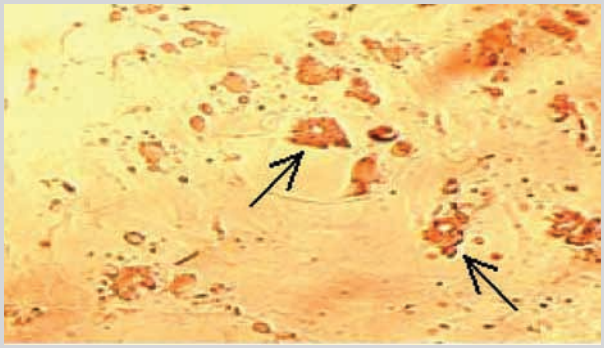
شکل ۱- کشت سلول‌های مغز استخوان جوجه:
1A)یک کلون سلولی در کشت اولیه (درشت نمایی ۱۰۰x)



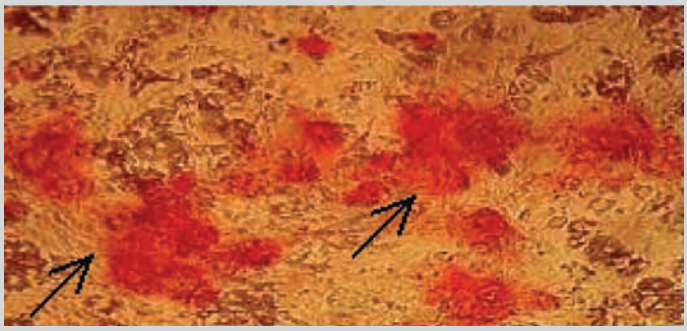
1B) به هم پیوستن کلونی‌ها و ایجاد تک لایه سلولی ۸ روز بعد از کشت (درشت نمایی ۱۰۰x)



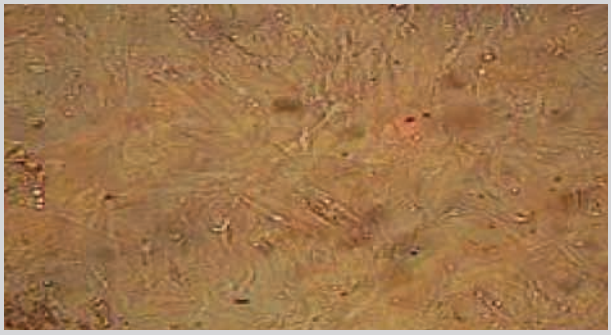
1C) سلول‌های پاساژ ۳ که هم چنان ریخت شناسی فیبرو بلاستی خود را حفظ کرده‌اند (درشت نمایی ۱۰۰x)



شکل۲- تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی جوجه به استخوان
2A) توده‌های سلولی در کشت الفاء کننده استخوان (درشت نمایی ۱۰۰x)



2B- سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته به استخوان پس از رنگ آمیزی با آلیزارین رد (درشت نمایی ۱۰۰x)



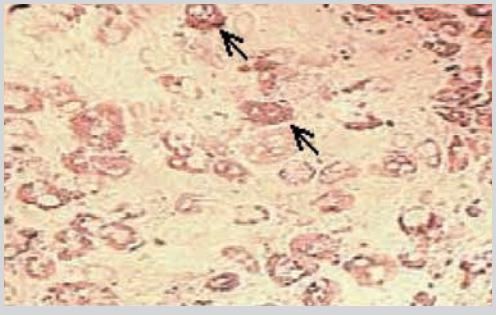
2C- عدم رنگ پذیری سلول‌های کنترل، پس از رنگ آمیزی با آلیزارین رد (درشت نمایی ۱۰۰x)

به تدریج درسایر سلول‌ها نیز ظاهر شد، به طوری که در پایان ۲۱ روز، اغلب سلول‌ها حاوی قطرات چربی بودند (شکل۳ A). قطرات چربی، به دنبال رنگ‌آمیزی اویل رد، قرمزرنگ شدند (شکل۳ B)، در مقابل در سلول‌های کنترل که به مدت۲۱ روز درمحیط فاقد القاء کننده بودند، قطره چربی تشکیل نشد و با اویل رد رنگ نگردید (شکل۳ C).

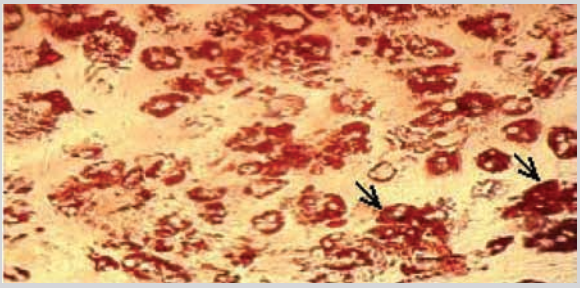
تمایز به غضروف : برش‌های تهیه شده از کشت تمایز به غضروف با تولوئیدین بلو، بنفش رنگ شدند (شکل۴ A). نتیجه رنگ‌آمیزی اختصاصی در مورد سلول های کنترل پس از ۲۱ روز منفی بود (شکل۴ B).

درصد زنده بودن سلول‌ها

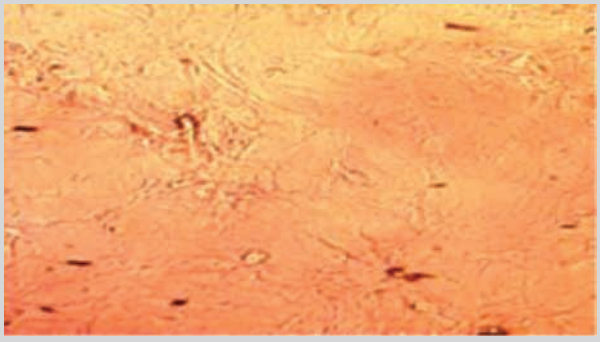
پس از کشت مجدد سلول‌های منجمد شده، سلول‌ها توان چسبیدن به ظروف کشت سلولی را پیدا کرده و شروع به تکثیر کردند. احیای سلول‌ها به خصوص در پاساژهای پائین‌تر با سرعت بیشتری انجام شد. هم چنین پتانسیل تکثیر سلول‌ها در پاساژهای پائین نسبت به پاساژهای ۷ به بالا به مراتب بیشتر بود (نمودار۱).



شکل۳- تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی جوجه به چربی
3A- پس از ۲۱ روز قطرات چربی در سیتوپلاسم اکثر سلول ها جمع شد (درشت نمایی ۱۰۰x)

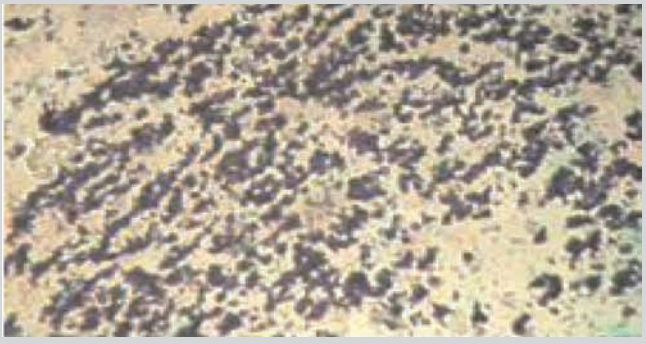


۳B- پس از ۲۱ روز پس از آغاز تمایز، قطرات چربی با رنگ آمیزی اویل رد قرمز شد (درشت نمایی ۱۰۰x)

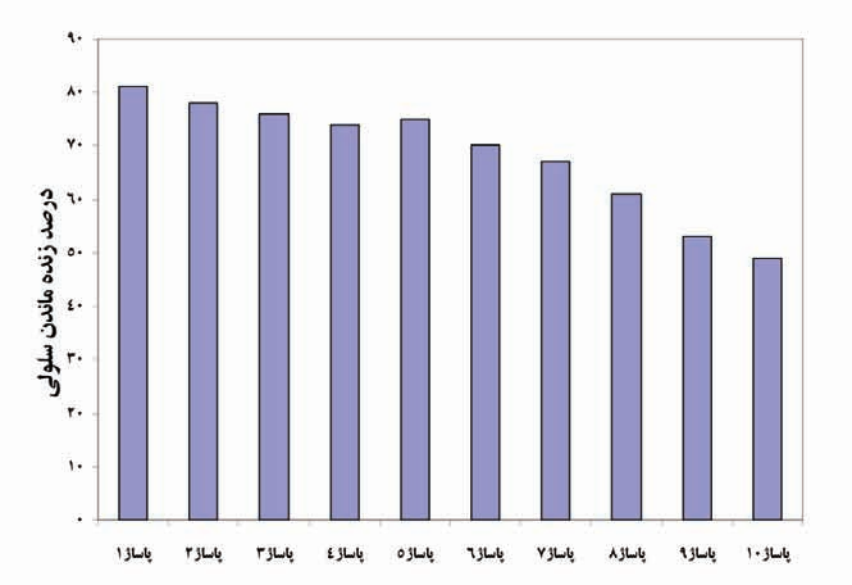


۳C- پدر سلول های کنترل قطرات جربی مشاهده نشد (درشت نمایی ۱۰۰x)

شکل٤- تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی جوجه به غضروف
٤A- برش‌های تهیه شده از کشت تمایزبه غضروف که با تولوئیدین آبی بنفش رنگ شدند (درشت نمایی ۱۰۰x)



٤B- عدم رنگ آمیزی سلول های کنترل با تولوئیدین آبی (درشت نمایی ۱۰۰x)



نمودار ۱- درصد زنده ماندن سلول ها در پاساژهای مختلف

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر برای اولین بار اقدام به جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان جوجه شده است. سلول‌های جدا شده، مورفولوژی فیبروبلاستی داشته و از تکثیر بالایی بر خوردار بودند و با بالا رفتن تعداد پاساژ سرعت تکثیر و مورفولوژی سلول‌ها تغییری نکرد. سلول‌های 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 تزاید 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 ویژگی‌های اختصاصی خود مثل تکثیر و توانایی تمایز به رده‌های مزانشیمی (استئوسیت، کندروسیت و آدیپوسیت) امکان‌پذیر بوده و می توان آن‌ها را در آینده برای تحقیقات مختلف مثل انتقال ژن، شبیه‌سازی و غیره مورد استفاده قرار داد(۲۱).

از معیارهای مهم در تشخیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی حضور شناساگرهای مربوط به سلول‌های بنیادی مزانشیمی و عدم حضور شناساگرهای سلول‌های بنیادی خون ساز می‌باشد. بر این اساس در انسان و سایر گونه‌های جوندگان نظیر موش صحرایی با روش فلوسایتومتری و استفاده از آنتی بادی‌های مونوکلونال آنتی ژن‌های سطحی مربوط به این سلول‌ها بررسی شده‌اند(۱). با توجه با این که تا کنون در جهت تهیه و ساخت آنتی بادی‌های 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 بادی‌های مونوکلونال مربوط به گونه پرندگان در دسترس باشد، غربال‌گری و جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه با روش فلوسایتومتری جهت بررسی ویژگی‌های ایمونوفنوتیپی این سلول‌ها و مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف و بافت چربی جالب توجه خواهند بود، هم‌چنان که این بررسی‌ها در انسان صورت گرفته است(۲). بنابراین بهترین معیار جهت اثبات سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز این سلول‌ها به سلول‌های استخوان، غضروف و چربی است. به این ترتیب وقتی سلول‌های دوکی شکل و فیبرو بلاستی جداشده در این تحقیق، تحت تأثیر محرک‌های شیمیایی قرار گرفته و به سمت استئوسیت، آدیپوسیت و کندروسیت متمایز شدند، این خود شاهد بر بنیادی بودن این سلول‌ها است. سه هفته بعد

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 رنگ‌آمیزی با تولوئیدین بلو، اسید موکوپلی ساکاریدها و موکوپلی ساکاریدهای سولفاته و هسته سلول‌های غضروفی، به رنگ بنفش درآمده و سیتوپلاسم سلولی بی‌رنگ ماند. واکوئل‌های 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 تدریج افزایش پیدا کرد و طی مدتی کمتر از یک هفته به سلول‌های آدیپوسیت تمایز پیدا کردند که این تمایز با مشاهده واکوئل‌های چربی در رنگ‌آمیزی 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 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., Yasko, A.W., Yaszemsski, 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 fibrobalstlike 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., Douglase, 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.