جدا سازی، کشت و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان جوجه

مهدی کدیور *
فاطمه پیریایی **
مینا رمضانی ***

* دکترای فرآورده‌های بیولوژیک، استادیار انستیتو پاستور ایران، گروه بیوشیمی
** کارشناس ارشد علوم جانوری ـ تکوینی، دانشگاه پیام نور تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی
*** دکترای زیست شناسی سلولی و تکوینی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

تاریخ وصول:۱۳۸۸/۶/۲۱
تاریخ پذیرش:۱۳۸۸/۷/۱۳

مولف مسئول: مهدی کدیور
پست الکترونیک:kadivar@pasteur.ac.ir

چکیده:

مقدمه و هدف: امروزه اهمیت سلول‌های بنیادی به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر دانشمندان پوشیده نیست. سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های بنیادی بالغی هستند که توانایی تمایز به بسیاری از سلول‌ها را دارند و از این نظر در مطالعه‌های پیش بالینی اهمیت دارند. هدف از این مطالعه جدا سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان جوجه و اثبات توانایی تمایز این سلول‌ها بود.

مواد و روش ها: این پژوهش یک مطالعه تجربی است که در سال‌های ۱۳۸۸ ـ ۱۳۸۷ در انستیتوپاستور ایران انجام شد. در این تحقیق، از مغز استخوان جوجه‌های سالم نژاد Raf با سن ۱۵ روز استفاده شد. به منظور کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، با عمل فلاشینگ، مغز استخوان ران و درشت نی جدا شد. سپس سلول‌ها کشت شده و بعد از تکثیر سلولی، بخشی از آنها به منظور نگهداری در ازت مایع، منجمد شد. برای اثبات این که سلول‌های جدا شده سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند، تمایز سلول‌ها به سه رده استخوان، غضروف و چربی انجام شد. برای آنالیز هیستولوژیکی، رنگ‌آمیزی اختصاصی سلول‌ها صورت گرفت.

یافته‌ها: مغز استخوان جوجه، یک منبع بالقوه از سلول‌های بنیادی بالغ می‌باشد. سلول‌های بنیادی به دست آمده از مغز استخوان جوجه، قادر به تمایز به سلول‌های استئوسیت، کندروسیت و آدیپوسیت بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی مغز استخوان جوجه، به علت قابلیت تمایز، استحصال آسان، کم هزینه و بدون محدودیت اخلاقی بودن، می‌توانند به عنوان یک منبع با ارزش سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیشنهاد شوند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی، تمایز سلولی، جوجه، مغز استخوان

مقدمه

سلول بنیادی نوعی سلول سوماتیک تمایز نیافته‌ای است که می‌تواند در محیط کشت، مداوم تکثیر یافته و این توانایی تکثیر و بازسازی خود را برای دوره‌ای نامحدود حفظ کند(۱). هم‌چنین می‌تواند تحت شرایط خاص به سلول‌های تخصص یافته تبدیل شود و به انواع سلول‌های سازنده بدن موجود زنده تمایز یابد(۳ و۲). به علاوه می‌توان از آنها در تولید سلول‌ها و در نهایت، بافت‌های مختلف، در بدن موجود زنده استفاده کرد(۴). سلول بنیادی همه منظوره و بسیار توانمند است و این توانایی، محور اصلی توجه به سلول‌های بنیادی است. اولین مسئله در به کارگیری این توانایی شگفت‌انگیز، منبع به دست آوردن آنها است. به طور کلی سلول‌های بنیادی بر اساس این که از چه بافتی جدا می‌شوند به سه گروه تقسیم می‌شوند؛ سلول‌های بنیادی جنینی[۱]، سلول‌های بنیادی بند ناف[۲] و سلول‌های بنیادی بالغ[۳] (۶ و۵). محدودیت‌های ایجاد شده در زمینه استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی، دانشمندان را بر این داشت که تحقیقات بیشتری پیرامون سلول‌های بنیادی بالغ داشته باشند.

سلول‌های بنیادی بالغ ،سلول‌های نا متمایزی هستند که نقش اولیه آنها حمایت کردن و تعمیر بافت‌هایی است که از آنها مشتق می‌شوند. این سلول‌ها در خون، مغز استخوان، ماهیچه اسکلتی، شبکیه، قرنیه چشم، پالپ دندان، مغز، طناب عصبی، کبد، پوست، روده، پانکراس و خون سیاه‌رگی وجود دارند. مغز استخوان بافت پیچیده‌ای شامل سلول‌های بنیادی خون‌ساز که انواع سلول‌های خونی را در بدن می‌سازند و سلول‌های بنیادی مزانشیمی که می‌توانند انواع دودمان‌های بافت همبند از قبیل؛ غضروف، استخوان و چربی را بسازند است(۸ و۷).

آزمایش‌های وسیعی در شرایط تعریف شده برای جداسازی، تکثیر و تمایز آنها درشرایط آزمایشگاه[۴] و در بدن[۵] صورت گرفته است(۹).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی اولین بار به وسیله فریدنستین و همکاران[۶](۱۹۹۲) و سپس به وسیله محققین دیگر بر اساس چسبندگی آنها به سطح کشت بافت جدا شدند. در این پژوهش‌ها به خصوصیات کلون‌زایی، خود تجدیدی و توان تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز اشاره شده است(۱۲-۱۰). در بررسی‌های دیگر، انعطاف و پلاستیسیتی این سلول‌ها در تمایز به انواع سلول‌های دیگر از جمله؛ ماهیچه قلبی روده، کبد، پوست و یا سلول‌های هر بافت آسیب دیده به اثبات رسیده است(۱۴و۱۳). یکی دیگر از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی این است که پتانسیل انجماد و ذوب مجدد داشته و به دنبال خروج از این شرایط، قادر به تکثیر و تمایز به سلول‌های مزانشیمی هستند(۱۶و۱۵).

1-Embryonic stem cells
2-Cord blood stem cells
3-Adult stem cells
4-In Vitro
5-In Vivo
6-Friedenstein et al

با توجه به این خصوصیات، محققین سلول‌های بنیادی مزانشیمی را سلول‌های مناسبی برای خدمت به عرصه حیات در زمینه‌های درمانی می‌دانند (۱۷).

سلول‌های بنیادی طیف‌هایی از انواع سلول‌ها را که برای مرمت هر آسیب بافتی یا اندام ضروری است، تولید می‌کنند. کاربرد متداول کلینیکی آنها در موارد مختلف از جمله؛ درمان استئوژنز ناقص، آسیب مغزی، پارکینسون، انفارکتوس قلبی، التیام شکستگی، پاره شدن تاندون، احیاء غضروف، درمان نارسایی کبد و اختلالات ایجاد شده دیگر در بدن به خوبی نشان داده شده است(۱۸).

هرچند که ماهیت و عملکرد این سلول‌ها در بدن موجود زنده در بسیاری از جنبه‌ها ناشناخته باقی مانده است و با توجه به ضرورت و اهمیت سلول‌های بنیادی در زندگی و کاربرد آن در زمینه‌های مختلف علوم‌پزشکی، تحقیقات بسیار در زمینه سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسان و حیواناتی مثل؛ گاو، خوک، بز و گوسفند صورت گرفته است(۲۳-۱۹)، ولی هنوز بررسی و گزارش مستندی برای مؤثرترین روش جداسازی، کشت و تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان جوجه انجام نشده است.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به راحتی از مغز استخوان گونه‌های حیوانی قابل استخراج بوده و به سهولت تکثیر می‌یابند، به همین دلیل سلول‌های مناسبی برای استفاده در مطالعه‌های مرتبط با مهندسی بافت، ژن درمانی، سلول درمانی و پیوند عضو در نظر گرفته می‌شوند. جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از گونه‌های حیوانی به دلیل اهمیت آنها در کاربردهای بالینی بسیار مورد توجه هستند و کاربردی کردن این سلول‌ها مستلزم مطالعه‌های پیش بالینی در نمونه‌های حیوانی است، لذا هدف این مطالعه، 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 مطالعه بیماری‌های ویروسی در پرندگان بود. هم‌چنین از آنها می‌توان جهت استفاده در تحقیقات واکسن، تست‌های تشخیصی ویروس‌شناسی، ژن‌درمانی، حفظ گونه‌های با ارزش پرندگان در حال انقراض، درمان بیماری‌های پرندگان و درمان بیماری‌های مشترک انسان و طیور بهره جست.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال‌های۱۳۸۸ - ۱۳۸۷ در انستیتو پاستور ایران انجام شد. در این تحقیق از ۱۰ قطعه جوجه‌های نژاد Raf با سن ۱۵ روز استفاده شد. جوجه‌ها به وسیله کلروفرم بیهوش شدند. استخوان‌های ران و درشت نی آنها جدا گردید و عضلات و بافت نرم اطراف پاک شد و به فالکون حاوی DMEM[1] منتقل شد. لوله محتوی

1-Dulbecos Modified Eagle Medium (DMEM)

استخوان‌ها بر روی یخ قرار داده شد و به زیر هود استریل منتقل گردید. سپس دو انتهای استخوان‌ها قطع و با استفاده از سرنگ و سر سوزن شماره ۲۲، مغز استخوان خارج گردید و به فالکون جدید منتقل شد. به منظور حذف بقایای گلبول های قرمز، فالکون حاوی مغز استخوان به مدت ۴ دقیقه و در دور ۱۵۰۰ سانتریفوژ شد. پلیت سلولی حاصل در ۱ میلی‌لیتر محیط جدید معلق گردید.

سوسپانسیون سلولی در محیط کشت DMEM با درصد گلوکز پایین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در سی‌سی و ۱۰۰ میکروگرم در سی‌سی استروپتومایسین در داخل فلاسک‌های کشت سلولی کشت داده شد و به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد منتقل گردید. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها که حاوی سلول‌های خونی شناور و سلول‌های نچسبیده بود، دور ریخته شد و محیط جدید اضافه شد و به منظور تکثیر سلولی، ادامه کشت در همان شرایط انجام شد. هر سه روز یک‌بار محیط سلول‌ها تعویض شد. اولین سلول‌های فیبروبلاستی۳ روز پس از کشت مشاهده شدند و بعد از ۸ روز ۸۰ ـ۷۰ درصد سطح ظرف کشت را پوشاندند. سپس به منظور تکثیر سلولی، اولین پاساژ سلولی به کمک EDTA/ تریپسین انجام شد و این عمل تا پاساژ ۳ ادامه یافت. از سلول‌های پاساژ ۳ برای مرحله بعدی تحقیق، یعنی بررسی تمایز استفاده شد.

محیط تمایز به سمت استئوسیت شامل؛ DMEM، حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال آسکوربیک اسید ۲ـ فسفات، $۱۰^{-۷}$ مولار دگزامتازون و ۱۰ میلی‌مولار بتا گلیسرول فسفات بود. هر۳ ـ ۲ روز یک‌بار محیط کشت تعویض شد و به مدت ۲۱ روز سلول‌ها تحت تأثیر محیط القاء کننده تمایز استئوسیت قرار گرفتند.

محیط تمایز به آدیپوسیت شامل؛ DMEM، محتوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، $۱۰^{-۷}$ مولار دگزامتازون، ۰/۵ میلی‌مول ۳ـ ایزوبوتیل ۱ـ متیل گزانتین، ۱ واحد از ترکیب انسولین ـ ترانسفرین ـ سلنیت سدیم و۱۰ میلی‌مول ایندومتاسین بود که سلول‌ها به مدت۲۱ روز تحت تأثیر القاء قرار گرفتند. هر سه روز یک‌بار تعویض محیط صورت می‌گرفت.

سلول‌ها از فلاسک کشت به تیوب ۱۵ میلی‌لیتری از جنس پروپیلن منتقل و مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۸۰۰ سانتریفوژ شدند. توده کوچک سلولی در ته تیوب تشکیل شد و سپس محیط القاء کننده تمایز غضروف که شامل؛ محیط کشت DMEM ، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، $۱۰^{-۶}$ مولار دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ال آسکوربیک اسید ۲ـ فسفات، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد ترانسفورمینگ بتا و ۱ واحد از ترکیب انسولین ـ ترانسفرین ـ سلنیت سدیم بود، به مدت چهار هفته به سلول‌ها اضافه شد. در این مدت هر سه روز یک‌بار محیط سلول‌ها تعویض شد.

به منظور ارزیابی تمایز، رنگ‌آمیزی برای تشخیص ذخایر کلسیمی صورت گرفت. برای این رنگ‌آمیزی، در ابتدا محیط رویی تخلیه و سپس سلول‌ها دو بار با بافر PBS[1] شستشو شده و با پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۱ ساعت فیکس شدند. رنگ آلیزارین رد S (۲ گرم پودر آلیزارین رد S در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و فیلتر گردید. رنگ باید تازه تهیه شود و PH آن در محدوده ۴/۳ ــ ۴/۱ با هیدروکیسد آمونیوم تنظیم گردد) بر روی سلول‌ها قرار گرفت و پس از ۴۰ دقیقه رنگ اضافی از محیط خارج گردید و با بافرPBS دو بار شسته شدند و سپس در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردیدند.

جهت ارزیابی تمایز، رنگ آمیزی اویل رد او به منظور تشخیص واکوئل‌های چربی انجام شد. مطابق مورد قبل ابتدا سلول‌ها فیکس شده، سپس در مجاورت رنگ اویل رد او (۰/۳۶ گرم پودر رنگ اویل رد او در ۱۰۰ میلی‌لیتر ایزوپروپانول ۶۰ درصد حل شده و فیلتر می‌شود) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. پس از شستشو با آب مقطر و خروج رنگ اضافی در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

پلیت سلولی موجود در انتهای تیوب پلی‌پروپیلن با بافر ۱۰ درصد پارافرمالدئید فیکس شد. پلیت فیکس شده در بلوک‌های پارافین برش زده ودر رنگ تولوئیدن بلو با غلظت ۰/۱ درصد قرار گرفت. رنگ‌های اضافی با آب مقطر شسته شد و نمونه‌های مورد نظر در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید.

یافته‌ها

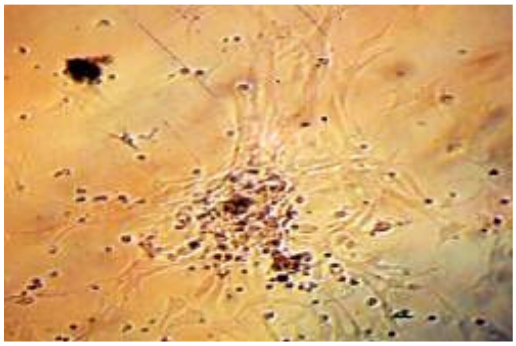
پس از تعویض محیط کشت، سلول‌هایی که به شکل شناور در محیط قرار داشتند، خارج شدند، به این صورت تنها سلول‌هایی که به کف ظرف چسبیده بودند، باقی ماندند. تعداد این سلول‌ها در ابتدا کم بوده و پس از ۲ روز اولین سلول‌ها با مورفولوژی دوکی شکل به شکل کلونی‌های جدا از هم دیده شدند (تصویر ۱ـ الف). پس از ۷ روز به تدریج کلونی‌ها بیشتر شدند. با تکثیر سریع این کلونی‌ها، تمام کف فلاسک پس از دو هفته پر شد(تصویر ۱ـ ب). به منظور ازدیاد و خالص‌سازی سلول‌ها با انجام اولین پاساژسلولی ۴ـ۳ روز طول کشید که مجدداً کف ظرف به تراکم ۸۰ ـ۷۰ درصد برسد تا مجدداً پاساژ بعدی انجام پذیرد. حاصل این تریپسینه کردن در پاساژهای ۳ به بعد ایجاد جمعیت نسبتاً یکنواخت از سلول‌های دوکی فیبروبلاستی بود (تصویر ۱ــ ج). پاساژ این سلول‌ها تا ۱۲ بار انجام شد. این سلول‌ها ریخت شبه فیبروبلاستی خود را در طول کلیه پاساژها حفظ کردند.

1-Phosphate Buffer Saline (PBS)

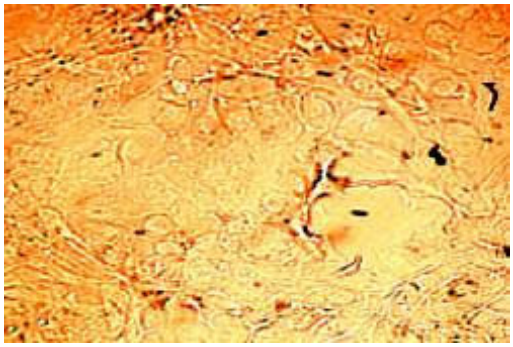
برای تمایز به استخوان سلول‌ها به مدت سه هفته تحت اثر محیط القاء کننده تمایز به استخوان کشت داده شدند. پس از این مدت و رنگ‌آمیزی سلول‌ها، توده‌های قرمز رنگ درخارج سلول‌ها که نشان دهنده ذخایر کلسیمی است مشاهده شد. به این ترتیب تولید کلسیم به وسیله اوستئوسیت‌ها با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد به اثبات رسید (تصویر ۲ـ الف). نتیجه رنگ‌آمیزی اختصاصی در مورد سلول‌های کنترل پس از ۲۱ روز منفی بود(تصویر۲ـ ب).

پس از رنگ‌آمیزی سلول‌هایی که در محیط القاء چربی به مدت ۲۱ روز قرار داشتند با رنگ‌آمیزی اویل رد حضور واکوئل‌های قرمز رنگ چربی، تأیید کننده تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به آدیپوسیت بود(تصویر ۳ـ الف). نتیجه رنگ‌آمیزی اختصاصی در مورد سلول‌های کنترل پس از ۲۱ روز منفی بود(تصویر ۳ ـ ب).

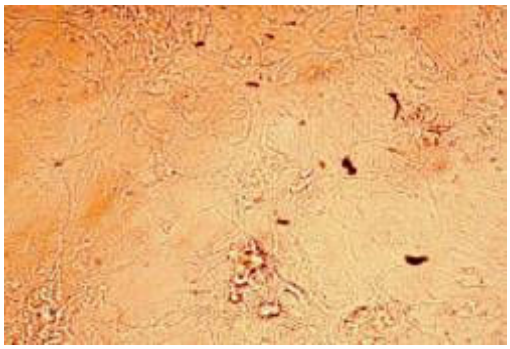
در تأیید تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کندروسیت، رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو برای گلیکوزآمینو گلیکان‌ها و موکوپلی ساکارید و کلاژن به کار رفت. نتیجه رنگ‌آمیزی پی از ۲۱ روز رنگ شدن ماتریکس خارج سلولی که شامل مواد زمینه‌ای غضروف است به رنگ بنفش بود(تصویر۴ ـ الف). نتیجه رنگ‌آمیزی اختصاصی در مورد سلول‌های کنترل پس از ۲۱ روز منفی بود (تصویر۴ ـ ب).



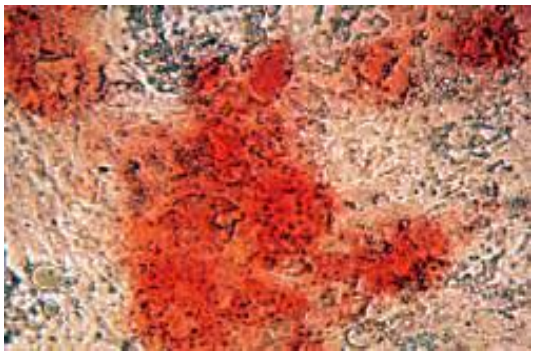
تصویر ۱ـ الف: یک کلون سلولی در کشت اولیه (بزرگنمایی ۱۰۰با میکروسکوپ نوری)



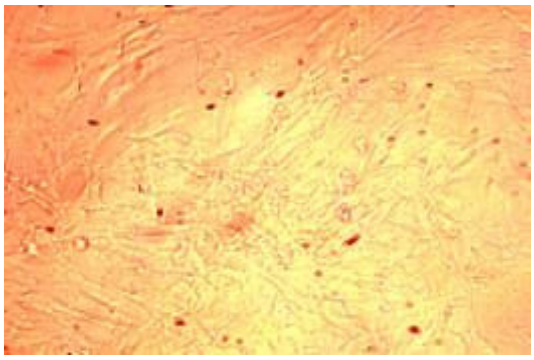
تصویر ۱ـ ب: تک لایه سلولی حاصل از به هم پیوستن کلون‌ها در کشت اولیه (بزرگنمایی ۱۰۰ با میکروسکوپ نوری)



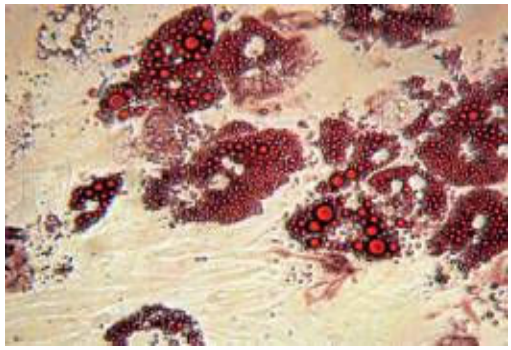
تصویر ۱ـ ج: با تکثیر سلولی از طریق سه پاساژمتوالی، ریخت فیبروبلاستی سلول‌ها همچنان حفظ شد(بزرگنمایی ۱۰۰ با میکروسکوپ نوری)



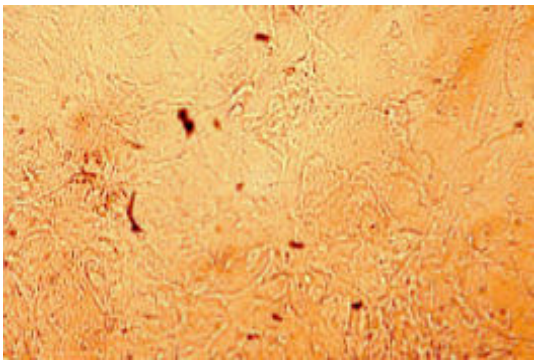
تصویر ۲ـ الف: ترشح ماتریکس معدنی (رنگ‌آمیزی الیزارین رد، بزرگنمایی ۲۵۰ با میکروسکوپ نوری)



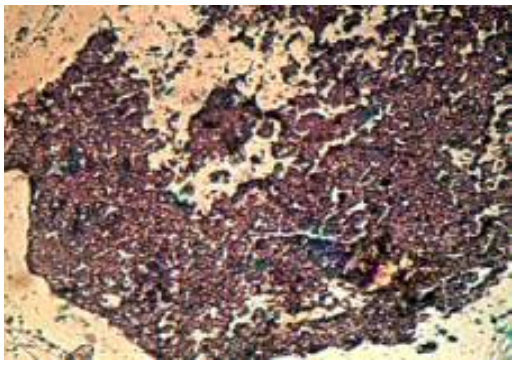
تصویر ۲ـ ب: در گروه کنترل توده قرمز مشاهده نشد (رنگ‌آمیزی الیزارین رد، بزرگنمایی ۲۵۰ با میکروسکوپ نوری)



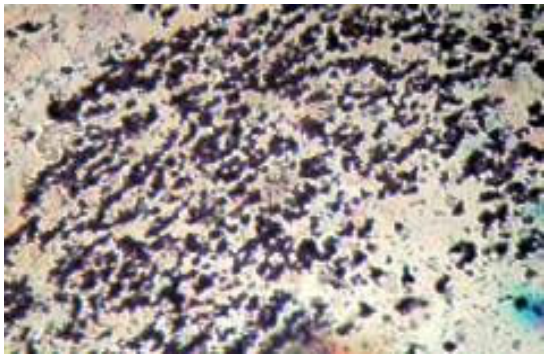
تصویر ۳ـ الف: مشاهده قطرات چربی قرمز رنگ در سیتوپلاسم سلول‌ها (رنگ‌آمیزی اویل رد، بزرگنمایی ۱۰۰ با میکروسکوپ نوری)



تصویر ۳ـ ب: عدم وجود قطرات چربی در سلول‌های کنترل منفی (رنگ‌آمیزی اویل رد، بزرگنمایی ۱۰۰ با میکروسکوپ نوری)



تصویر ۴ـ الف: رنگ شدن ماتریکس خارج سلولی که شامل مواد زمینه‌ای غضروف است به رنگ بنفش (رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو، بزرگنمایی ۲۵۰ با میکروسکوپ نوری)



تصویر ۴ـ ب: در گروه کنترل ماتریکس خارج سلولی که شامل مواد زمینه‌ای غضروف است مشاهده نشد (رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو، بزرگنمایی ۲۵۰ با میکروسکوپ نوری)

بحث و نتیجه‌گیری

مغز استخوان منبع غنی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی است و امروزه در اکثر مطالعه‌های تجربی و کلینیکی توجه محققین را به خود جلب کرده است (۲۴). نمونه مغز استخوان جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در جوجه، همچون حیوانات آزمایشگاهی دیگر می‌توان از استخوان‌های ران و درشت نی به دست آورد. زیرا به دلیل بزرگ بودن این استخوان‌ها شانس به دست آوردن مغز استخوان بیشتر است(۲۵). در مطالعه حاضر با کشت مغز استخوان استخراج شده از استخوان درشت و نازک نی جوجه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در آن جداسازی و تکثیر شد تا توانایی آنها در تمایز به سه رده استخوانی، غضروفی و چربی ارزیابی گردد.

سلول‌های جدا شده، مورفولوژی فیبروبلاستی دارند و محکم به سطح ظروف کشت می‌چسپند و توانایی تکثیر بالایی داشته و قادر هستند جمعیت‌های سلولی با مورفولوژی یکنواخت با پتانسیل تمایز به بافت‌های مختلف را تولید کنند.

از معیارهای مهم در تشخیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی حضور شناساگرهای مربوط به این سلول‌ها و عدم حضور شناساگرهای مربوط به سلول‌های بنیادی خون‌ساز است، اما تا کنون در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جوجه شناسه‌ای معرفی نشده است. به همین دلیل محققین معتقدند که در چنین مواردی بهترین آزمون تشخیصی سلول، بررسی توان تمایزی آنهاست(۵) که با توجه به نتایج تحقیق حاضر مبنی بر توان تمایزی سلول‌های جدا شده، ماهیت بنیادی مزانشیمی آنها به خوبی روشن است. نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی این گونه حیوانی از نظر تمایز، سه ظرفیتی بوده و قادر هستند با فراهم شدن شرایط مناسب در محیط آزمایشگاه، به سه ردهٔ استخوانی، غضروفی و چربی تمایز یابند. در کشت تمایز به چربی، شاید مهم‌ترین نکته قابل توجه مشاهده اولین قطرات چربی ۲ روز پس از آغاز کشت در اغلب سلول‌ها بود. این قطرات به تدریج در مدت ۱ هفته در سایر سلول‌ها نیز ظاهر شدند. هم‌چنین تشکیل توده‌های سلولی در کشت تمایز به استخوان مشاهده شد که نشان دهنده پتانسیل بالای تمایز این سلول‌ها به چربی و استخوان می‌باشد. در تحقیق حاضر، حدود نیم میلی‌لیتر مغز استخوان آسپیره شده از استخوان درشت و نازک نی، بدون حذف گلبول‌های قرمز آن کشت گردید و با انجام چند پاساژ، جمعیتی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ریخت‌شناسی فیبروبلاستی ظاهر گردید.

در برخی مطالعه‌ها برای جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان به منظور حذف گلبول‌های قرمز از روش بارگیری مغز استخوان بر روی فایکول و سپس چندین مرحله سانتریفوژ استفاده شده است(۲۶). از معایب این روش این است که در حین جمع‌آوری لایه سلول‌های هسته‌دار، بخشی از آنها در لوله سانتریفوژ باقیمانده و دور ریخته می‌شود. هم‌چنین دو مرحله سانتریفوژ به مدت ۲۵

دقیقه سبب می‌شود که سلول‌ها در خارج از بدن موجود زنده و انکوباتور تحت استرس دمایی محیط و استرس مکانیکی حاصل از سانتریفوژ قرار گیرند،لذا برای کشت با این روش، یعنی؛ سانتریفوژ گرادیان، معمولاً مغز استخوان بیشتر(در حدود۴ میلی‌لیتر) لازم است که آسپیره کردن این مقدار مغز استخوان از حیوان، خود استرس‌زا است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از میزان کم مغز استخوان (نیم میلی‌لیتر) و بدون استفاده از سانتریفوژ گرادیان نیز می‌توان سلول بنیادی مزانشیمی را استخراج و تکثیر کرد. در مجموع می‌توان گفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان جوجه همانند سایر رده‌ها قادرهستند با فراهم شدن شرایط مناسب در محیط آزمایشگاهی به سلول‌های ردهٔ استخوانی، غضروفی و چربی تمایز یابند. علاوه بر آن توانایی زیاد آنها برای تمایز به سلول‌های آدیپوسیت قابل توجه است و می‌توان جهت تحقیقات کاربردی در زمینه سلول‌های چربی از آن استفاده کرد.

نتایج بررسی‌های تمایز نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان جوجه می‌توانند به عنوان یک منبع قابل حصول آسان، کم هزینه و بدون مشکلات اخلاقی، جهت تحقیقات کاربردی در زمینه سلول‌های آدیپوسیت و بافت چربی و پژوهش‌های مربوطه باشند.

نتایج این تحقیق می‌تواند در پیشبرد تحقیقات انسانی و پرورش حیوانات برای پیوند عضو به انسان مؤثر و کمک کننده باشد. به علاوه این نتایج می‌تواند در جهت پرورش پرندگان مقاوم به بیماری‌هایی چون؛ آنفولانزای مرغی مورد استفاده قرار گیرند. این نتایج جدید، مهم و دارای کاربردهای فراوانی در تأمین سلامت انسان و حیوانات است. جهت توسعه استراتژی‌هایی با کاربرد درمانی به خصوص در زمینه سلول‌های فوق‌الذکر، درک بهتر و کامل‌تری از رفتار این نوع سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی و در بدن لازم است.

تقدیر و تشکر

از همکاری صمیمانه گروه بیوشیمی انستیتو پاستور ایران که در انجام این تحقیق نهایت همکاری را داشتند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

Isolation, Culture and Differentiation of Chicken Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Kadivar M[*], Piryaei F[**], Ramezani M[***]

[*]Assistant Professor of Biotechnology, Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran,Iran.
[**] MSc in Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Center of Tehran, Iran.
[***]Assistant Professor of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Ashtian Branch, Iran.

Received:12/09/2009
Accepted:05/10/2009

Corresponding Author: Mehdi Kadivar
Email: kadivar@pasteur.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: At the present time, the importance of stem cells, especially mesenchymal stem cells, is of utmost importance for scientists. Mesenchymal stem cells are adult stem cells which can divide into a variety of different cells. Regarding this, it is of importance in preclinical studies. The aim of this study was the isolating of mesenchymal stem cells derived from chicken bone marrow and assessing their ability for differentiation. These cells can be used in the studies related to tissue engineering and gene therapy.

Materials & Methods: This was an experimental study which was conducted at Pasteur institute of Iran in 2008-2009. In this study, 15-day old Raf chickens were used. For cultivating the mesenchymal stem cells, bone marrows of the legs and tibia were extracted with flashing technique. After the cell cultivation and proliferation, a part of the cells was frozen in liquid nitrogen. In order to make sure that these cells were mesenchymal stem cells. The cells were differentiated into three lines of bone, cartilage and adipose. Specific staining was done for histological analysis.

Results: Chicken bone marrow is a potential source of adult stem cells. Stem cells derived from bone marrow could differentiate to Osteocyte, Chondrocyte and Adipocyte cells.

Conclusion: For the first time, results of this research indicated that stem cells derived from chicken's bone marrow are an important source of stem cells. They have the potential for differentiation; are cost effective, have a simple isolating method and are free of bioethical problems.

Keywords: Stem cells, Cell differentiation, Chicken, Bone Marrow

REFERENCES:

1.Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, et al. Human umbilical cord blood as source of transplantable hepatic progenitor cells. Stem Cells 2003; 21: 217-27.
2.Hezog EL, Chail Krasus DS. Plasticity of marrow derived stem cell. Blood 2003; 102: 3483-93.
3.Jäger M, Wild A, Lensing-Ho¨hn S, Krauspe R. Influence of different culture solutions on osteoblastic differentiation in cord blood and bone marrow derived progenitor cells. Biomed Tech 2003; 48: 241-4.
4.Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: Stem cells and their niches. Science 2000**;** 287: 1427-30.
5.Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. Science 1999; 284: 143-7.
6.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; 33: 1402-16.
7.Abboud M, Xu F, La Via M. Study of early hematopoietic precursors in human cord blood. Exp Hematol 1992; 20: 1043-47.
8.Marcassus PB, Cousin B, Caton D, Louis NK. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site specific differences. Exprimental Cell Research 2006; 312: 727-36.
9.Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science1999; 283: 534-7.
10.Friedenstein AJ, Latzinik NA, Gorskaya YF, Luria EA. Bone-marrow stromal colony formation requires stimulation by hematopoietic cell. Bone Mineral 1992; 18: 199-213.
11.Friedentein AJ, Chailakhjan PK, Lalxkina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea–pig bone marrow and spleen cells. Cell issue Kinet 1970; 3: 393-403.
12.Friedenstein AG, Gorskaja GF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and erradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol 1976; 4: 267-74.
13.Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science 2000; 290: 1775-9.
14.Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cell 2004; 22(4):625-34.
15.Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood 2004; 103: 1669-75.
16.Brton FM. Freezing eukaryotic cells in liquid nitrogen. Molecular Biology Protocols 2000; 12: 1265-78.
17.Benayahu D, Akavia UD, Shur I. Differentiation of bone marrow stroma- derived mesenchymal cells. Curr Med Chem 2007; 14(2):173-9.
18.Shih-Chieh H. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. Stem Cells 2002; 20: 249-58.
19.Nadri S, Soleimani M, Hossni 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: 723-9.
20.Kogler G, Sensken S, Wernet P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. Exp Hematol 2006; 34(11):1589-95**.**
21.Gong Z, Niklason EL. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow derived mesenchymal stem cell (hMSCs). The Faseb Journal 2008; 22(6): 1635-48.
22.Inguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. Experimental and Biological Medicine (Maywood) 2001; 226(6): 507–20.
23.Weiss ML, Mitchell KL, Hix JE, Medicetty S, El-Zarkouny SZ, Grieger DS, et al. Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. Exp Neurol 2003; 182: 288–99.
24.Sekia I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 4397-402.
25.Zuk PA, Zhu M, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 2002; 13: 4279-95.
25. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res 1998; 238: 265-272.