

## Impacts of cell culture methods on proliferation, morphology and differentiation of chicken bone marrow-derived mesenchymal stem cells

M. Ramezani\*

F. Piriaei\*\*

\*Assistant Professor of Biology, Ashtian Branch, Islamic Azad University, Ashtian, Iran

\*\*MSc. of Zoology, Payam-e- Noor University, Tehran Central Branch, Tehran, Iran

### \*Abstract

---

**Background:** By attention to the practical importance of the stem cells screening and culture, this study was conducted on chicken bone marrow mesenchymal stem cells.

**Objective:** This study was performed to determine the effect of screening and cultural methods on the cell morphology and differentiation.

**Methods:** This was an experimental study carried out at Pasture institute in 2009. One milligram aspirated bone marrow from tibia of a two-week old Raf chicken was cultured in low-glucose DMEM, 10% FBS, penicillin and streptomycin using both direct (without RBC removal) and Ficol (with RBC removal) mounted culture methods. After 4 passages, the bone marrow cells of two cell culture methods were compared for their morphology and differentiation into bone, cartilage, and adipose. Data were statistically analyzed by ANOVA test.

**Findings:** In direct cell culture, more colonization compared with Ficol mounting method, was observed and most cells showed fibroblastic morphology. Also, the results were indicative of higher yields of differentiation into bone (21%), cartilage (27%), and adipose (40%) in direct method.

**Conclusion:** According to our results, the application of direct culturing system for screening and proliferation of mesenchymal stem cells seems to be a better protocol to screen the chicken bone marrow mesenchymal stem cells compared to Ficol mounting method.

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

---

**Corresponding Author:** Mina Ramezani, Department of Biology, Ashtian Branch, Islamic Azad University, Ashtian, Iran

**Email:** ramezani@mail.aiu.ac.ir

**Tel:** +98-862-7224373

**Received:** 21 Sep 2010

**Accepted:** 9 Mar 2011

## مقایسه تأثیر دو روش کشت سلولی بر مورفولوژی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان جوجه

دکتر مینا رمضانی\*

فاطمه پیریایی\*\*

\* استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان

\*\* کارشناس ارشد علوم جانوری دانشگاه پیام نور مرکز تهران

آدرس نویسنده مسؤول: آشتیان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست‌شناسی، تلفن ۰۸۶۲-۷۲۲۴۳۷۳

Email: ramezani@mail.aiou.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۸

### \* چکیده

**زمینه:** نظر به اهمیت عملی جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی، این مطالعه بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه انجام شد. **هدف:** این مطالعه به منظور تعیین اثر روش‌های جداسازی و کشت سلولی بر مورفولوژی و تمایز سلول‌های حاصل انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۸ در انستیتو پاستور ایران انجام شد، ابتدا ۱ میلی‌لیتر مغز استخوان اسپرته شده از درشت‌نی جوجه‌های نژاد Raf (گوشتی) با سن متوسط ۲ هفته، به روش کشت مستقیم (بدون حذف گلبول‌های قرمز) و روش بارگیری بر فایکول (به منظور حذف گلبول‌های قرمز) در محیط کشت DMEM با درصد گلوکز پایین، سرم جنین گاوی ۱۰٪، پی‌سی‌لین و استروپتومایسین کشت شد. سپس سلول‌های پاساژ ۴ حاصل از دو سیستم کشت، از لحاظ مورفولوژی، تمایز به استخوان، چربی و غضروف مقایسه شدند. داده‌ها با آزمون آماری آنوای یک طرفه تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** در سیستم کشت مستقیم در مقایسه با سیستم کشت با روش بارگیری بر فایکول، کلون‌زایی بیش‌تری اتفاق افتاد و اغلب سلول‌ها مورفولوژی فیبروبلاستی داشتند. سلول‌های حاصل از روش کشت مستقیم به ترتیب ۲۱، ۲۷ و ۴۰ درصد بیش‌تر به استخوان، غضروف و چربی تمایز یافتند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سیستم کشت مستقیم، روش مناسب‌تری برای تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه محسوب می‌شود.

**کلیدواژه‌ها:** سلول بنیادی مزانشیمی، کشت، تمایز، جوجه

### \* مقدمه :

امروزه خصوصیات، ویژگی و اهمیت سلول‌های بنیادی بر کسی پوشیده نیست. سلول بنیادی، نوعی سلول سوماتیکی است که می‌تواند در محیط کشت به صورت نامحدودی تکثیر یابد یا به سلول‌های تخصص یافته تبدیل شود. به همین دلیل این سلول‌ها می‌توانند به عنوان منبع پایان‌ناپذیری برای تمام سلول‌های بدن محسوب شوند.<sup>(۱)</sup> سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های نامتمایزی هستند که در میان سلول‌های متمایز و اختصاصی یک بافت یا اندام یافت می‌شوند، قادر به تکثیر خود هستند و می‌توانند به انواع سلول‌های اختصاصی آن بافت یا اندام متمایز شوند. نقش اساسی این سلول‌ها در موجود زنده،

حفظ و ترمیم بافتی است که در آن حضور دارند.<sup>(۲-۴)</sup> سلول‌های بنیادی مغز استخوان به دو دسته سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) تقسیم می‌شوند. سلول‌های بنیادی خون‌ساز، سلول‌هایی با عمر طولانی یا عمر کوتاه هستند.<sup>(۵)</sup> سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌هایی چندتوان با قدرت بالا در تولید هستند که اکثراً با شناساگرهای ویژه سطحی شناسایی می‌شوند. این سلول‌ها نه تنها خاصیت خودتجدیدی با مورفولوژی فیبروبلاستی شکل را تا حدود ۲۰ تا ۳۰ پاساژ حفظ می‌کنند، بلکه همچنان توانایی تمایز به انواع بافت‌های همبند مثل ماهیچه، استخوان، غضروف،

استفاده از سرنگ و سر سوزن شماره ۱۹ مغز استخوان خارج شد و در ۲ میلی لیتر محیط کشت معلق شد. سپس سلول‌های مزانشیمی با دو روش کشت مستقیم و بارگیری بر فایکول جدا شدند.

برای کشت به روش مستقیم، فالكون حاوی مغز استخوان به مدت ۴ دقیقه و در دور ۱۲۰۰rpm سانتریفوژ شد. پلیت سلولی حاصل در ۱ میلی لیتر محیط جدید معلق گردید. سوسپانسیون سلولی، در محیط کشت DMEM با درصد گلوکز پایین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد در سی سی پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در سی سی استروپتومایسین (سیگما، آمریکا) در داخل فلاسک ۲۵ سانتی متر مربع کشت شد.

جهت کشت به روش بارگیری بر فایکول، مغز استخوان آسپیره شده با ۲ میلی لیتر محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی رقیق شد و به آرامی بر روی محلول فایکول (Inotrain) بارگذاری شد. پس از ایجاد محلول دو فاز، فالكون حاوی مغز استخوان با دور ۱۲۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. با ایجاد گرادیان غلظت توسط محلول فایکول، سلول‌های هسته‌دار موجود در یک لایه ظریف بین گلبول‌های قرمز و پلاسما به آرامی برداشته شده و در فالكون‌های ۱۵ سی سی ریخته شدند. سپس با ریختن حجم مساوی از محلول بافر فسفات به منظور خنثی کردن اثر سمی فایکول در سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. پس از خارج کردن مایع رویی، پلیت سلولی تشکیل شده در کف فالكون در ۵ سی سی محیط کشت معلق و در ۱۰ میلی لیتر محیط حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد در سی سی پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در سی سی استروپتومایسین داخل فلاسک ۲۵ سانتی متری کشت داده شد.

سپس سلول‌ها جهت تکثیر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز کربنیک انکوبه شدند. پس از ۴۸ ساعت، محیط رویی سلول‌ها که حاوی سلول‌های خونی شناور و سلول‌های نجسبیده بود، دور ریخته و محیط جدید اضافه

تاندون، چربی، بافت‌های کبدی و عصبی را تا تقسیم‌های بالا حفظ می‌کنند.<sup>(۷،۶)</sup> به دلیل اهمیت سلول‌های مزانشیمی در سلول درمانی، محققین همواره در صدد یافتن راهی مناسب برای جداسازی و تکثیر این سلول‌ها از مغز استخوان نمونه‌های حیوانی بوده‌اند.<sup>(۸-۱۳)</sup> با توجه به ضرورت و اهمیت سلول‌های بنیادی در زندگی و کاربرد آن در زمینه‌های مختلف علوم پزشکی، تحقیق‌های بسیاری در زمینه سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسان و حیوان‌هایی مثل گاو، خوک، بز و گوسفند انجام شده است،<sup>(۱۴-۱۹)</sup> ولی هنوز بررسی و گزارش مستندی برای مؤثرترین روش جداسازی، کشت و تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان جوجه انجام نشده است.

نکته مهم در ارتباط با سلول‌های بنیادی مزانشیمی، خاصیت کلون‌زایی (تکثیر سلول بنیادی مزانشیمی در شرایط مناسب و ایجاد جمعیتی از سلول‌های یکسان) است.<sup>(۲۰،۲۱)</sup> بدیهی است که معیارهای مختلفی در ایجاد شرایط مناسب برای کلون‌زایی لازم است. یکی از آن‌ها، تعداد سلول‌های اولیه جدا شده از مغز استخوان (تراکم سلولی) است.

لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر روش‌های جداسازی و کشت سلولی بر مورفولوژی و تمایز سلول‌های حاصل انجام شد.

### \* مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۸ در انستیتو پاستور ایران انجام شد. جهت استخراج سلول‌های مغز استخوان، تعداد ۱۰ قطعه جوجه نژاد Raf به سن تقریبی ۲ هفته با کلروفرم بی‌هوش شدند. سپس استخوان‌های ران و درشت نی آن‌ها جدا و عضله‌ها و بافت نرم اطراف پاک شد و در داخل محیط DMEM (Dulbecos Modified Eagle Medium) قرار گرفت. لوله محتوی استخوان‌های ران و درشت نی بر روی یخ قرار داده شده و به زیر هود استریل منتقل شد. دو انتهای استخوان‌ها قطع و با

شد و سپس محیط غضروف ساز که شامل محیط کشت DMEM، ۱۰ درصد FBS محتوی ۱۰۰ نانوگرم دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اسید L-اسکوربیک ۲ فسفات، ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر عامل رشد ترانسفورمینگ بتا (سیگما، آمریکا) و ۱ واحد از ترکیب انسولین- ترانسفرین- سلنیت سدیم (Gibco) بود، به مدت ۲۱ روز به سلول‌ها اضافه شد. در این مدت هر سه روز یک بار محیط سلول‌ها تعویض شد. برخی از کشت‌ها به عنوان گروه شاهد، محیط معمولی DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی دریافت کردند.

در پایان ۲۱ روز، تمایز سلول‌ها با روش هیستوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای استخوان از رنگ آمیزی آلیزارین رد، برای چربی از رنگ آمیزی اویل رد و برای غضروف از رنگ آمیزی تولوئیدین بلو استفاده شد.

جهت مطالعه تمایز به استخوان تک لایه سلولی با بافر فسفات شسته شده و به مدت ۲۰ دقیقه با پارافرمالدئید ۴ درصد فیکس شد و سپس رنگ آمیزی با محلول رنگی آلیزارین رد (۲ گرم پودر آلیزارین رد در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در ادامه سلول‌ها با آب مقطر شسته شدند و پس از خشک شدن با میکروسکوپ معکوس مشاهده شدند. پس از رنگ آمیزی با آلیزارین رد، با استفاده از میکرومتر چشمی، درصد مناطق رنگی (معدنی شده) در دو سیستم کشت سلولی تعیین شد و میانگین آن‌ها از نظر آماری مورد مقایسه قرار گرفت.

برای مطالعه تمایز به چربی، ابتدا سلول‌ها ثابت شده و در مجاورت رنگ اویل رد (۰/۳۶ گرم پودر رنگ اویل رد در ۱۰۰ میلی لیتر ایزوپروپانول ۶۰ درصد (سیگما، آمریکا) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از شستشوی سلول‌ها با آب مقطر و خروج رنگ اضافی، لام‌ها خشک شده و با میکروسکوپ مشاهده شدند. پس از رنگ آمیزی با اویل رد، درصد مناطق رنگی (قطرات چربی) در دو سیستم کشت سلولی با استفاده از میکرومتر چشمی تعیین و میانگین آن‌ها از نظر آماری مقایسه شد.

شد. هر ۳ روز یک بار محیط سلول‌ها تعویض و این کار تا زمانی که کف پلیت به وسیله سلول‌ها پر شود، تکرار شد. در این زمان، سلول‌ها پاساژ داده شدند. بدین ترتیب که سلول‌ها با تریپسین-EDTA جدا و به نسبت ۱:۲ تقسیم شدند (سلول‌های یک فلاسک ۲۵ بین دو فلاسک ۲۵ تقسیم شد) این کار تا پاساژ چهارم ادامه یافت و از سلول‌های این پاساژ برای بررسی‌های بیشتر یعنی بررسی توان تمایز سلول‌ها استفاده شد.

در مرحله بعد به منظور اطمینان از ماهیت سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان جوجه و نیز بررسی توان تمایزی آن‌ها، از آزمون تمایز به استخوان، چربی و غضروف استفاده شد.

برای تمایز به استخوان و چربی، ۵۰۰۰ سلول پاساژ ۴، در هر یک از خانه‌های ظروف کشت ۶ چاهکی در داخل محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. پس از یکنواخت شدن سلول‌ها، محیط آن‌ها با محیط تمایز به استخوان جای‌گزین شد و کشت تمایزی سلول به مدت ۲۱ روز، هر ۳ روز یک بار تعویض شد. محیط تمایز به استخوان شامل DMEM، ۱۰ درصد FBS محتوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر L-اسید اسکوربیک ۲ فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون و ۱۰ میلی مولار بتا-گلیسرول فسفات (سیگما، آمریکا) بود. محیط تمایز به چربی شامل DMEM، ۱۰ درصد FBS حاوی ۱۰ نانومولار دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر ایندومتاسین، ۰/۵ میلی مولار ۳-ایزوبوتیل ۱-متیل گزانتین (سیگما، آمریکا) و ۱ واحد از ترکیب انسولین- ترانسفرین- سلنیت سدیم (Gibco) بود. برخی از خانه‌های پلیت ۶ چاهکی به عنوان گروه شاهد، محیط معمولی DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی دریافت کردند.

برای تمایز به غضروف، ۲۰۰ هزار سلول پاساژ ۴ از فلاسک کشت به لوله ۱۵ میلی لیتری از جنس پروپیلن منتقل و در دور ۱۸۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و توده کوچک سلولی در ته لوله تشکیل

در پاساژ یک، تک لایه سلولی حاوی مورفولوژی‌های متنوعی شامل سلول‌های چند وجهی، کشیده و ستاره‌ای شکل بود. با انجام پاساژ دو جمعیت سلول‌های کشیده فیبروبلاستی افزایش یافت. در پاساژ سه، کشت سلول‌ها از لحاظ مورفولوژی یکنواخت‌تر شد، ولی با این وجود تعداد زیادی سلول گرد در کنار تک لایه فیبروبلاستی دیده شد.

جهت بررسی تمایز به استخوان، سلول‌های پاساژ چهار که به مدت ۲۱ روز در محیط استئوژنیک قرار گرفته بودند، با روش رنگ‌آمیزی آلیزارین رد ارزیابی شدند. نتیجه رنگ‌آمیزی، قرمز شدن مواد خارج سلولی معدنی بود. کشت سلول‌های حاصل از سیستم کشت مستقیم به طور تقریباً یکنواخت ( $2/4 \pm 85$  درصد) قرمز رنگ شد، در حالی که در سلول‌های جدا شده به روش بارگیری بر فایکول، تنها  $1/9 \pm 64$  درصد مناطق کشت رنگ گرفت که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ).

در بررسی تمایز به چربی، در سلول‌های پاساژ چهار که به مدت ۳ هفته در محیط آدیپوژنیک قرار گرفته بودند، قطره‌های چربی به تدریج ظاهر شدند. برای اثبات چربی بودن این قطره‌ها از رنگ‌آمیزی اوایل رد استفاده شد. در گروه سلول‌های جدا شده به روش کشت مستقیم، تعداد سلول‌های چربی  $3/2 \pm 95$  درصد و سلول‌های جدا شده به روش بارگیری بر فایکول  $1/7 \pm 55$  درصد و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ).

تمایز به غضروف در سلول‌های پاساژ چهار که به مدت ۲۱ روز در محیط کندروژنیک قرار گرفته بودند، با رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو ارزیابی شد. در سلول‌های حاصل از سیستم کشت مستقیم به طور تقریباً یکنواخت ( $3/4 \pm 92$  درصد) هسته‌ها بنفش رنگ شد، در حالی که در سلول‌های جدا شده به روش بارگیری بر فایکول، تنها  $1/5 \pm 65$  درصد مناطق کشت رنگ گرفت که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ).

جهت مطالعه تمایز به غضروف، پلیت سلولی به مدت ۲ ساعت در پارافمالدئید ۱۰ درصد ثابت شد و پس از انجام مراحل آبیگری و تهیه بلوک پارافینی، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شد و لام‌های به دست آمده به منظور مشاهده هسته، اسید موکوپلی ساکاریدها و موکوپلی ساکاریدهای سولفاته مترشحه از سلول‌های غضروفی با استفاده از رنگ تولوئیدین بلو (سیگما، آمریکا) رنگ‌آمیزی شد. سپس شمارش سلولی در دو گروه به وسیله میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار موتیک انجام و میانگین آن‌ها از نظر آماری مقایسه شد.

آزمایش‌ها حداقل ۵ بار تکرار شدند، تمام نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ۱۰ و آزمون آماری آنوای یک طرفه تحلیل و اختلاف  $P < 0/05$  معنی‌دار گزارش شد.

#### \* یافته‌ها:

مشاهده کشت سلول‌های مزانشیمی به روش مستقیم با میکروسکوپ معکوس نشان داد که در کشت اولیه پس از ۳ روز، اولین سلول‌ها با مورفولوژی دوکی به شکل کلونی و تعدادی سلول گرد و پهن دیده شدند. کشت اولیه پس از دو هفته به مرحله یکنواختی رسید. در این زمان تک لایه‌ای از سلول‌های عمدتاً کشیده فیبروبلاستی در کف ظرف کشت تشکیل شد. در پاساژ یک، سلول‌های شناور و سلول‌های غیردوکی به تعداد زیاد حذف شدند. در پاساژ دو، سلول‌های دوکی فیبروبلاستی تقریباً خالص شدند.

مشاهده کشت سلول‌های مزانشیمی به روش بارگیری بر فایکول با میکروسکوپ معکوس نشان داد که در کشت اولیه، سلول‌ها به صورت هتروژن بودند. پس از ۵ روز، اولین سلول‌ها با مورفولوژی دوکی شکل، ستاره‌ای، گرد و پهن دیده شدند. کشت اولیه پس از سه هفته به مرحله یکنواختی رسید. در این زمان تک لایه‌ای از سلول‌های عمدتاً کشیده فیبروبلاستی و تعدادی سلول گرد، پهن و ستاره‌ای در کف ظرف کشت تشکیل شد.

## \* بحث و نتیجه گیری:

این مطالعه نشان داد که روش کشت مستقیم روش مناسبی برای کشت و جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه است؛ چرا که درصد بیش تری از سلول‌ها به سلول‌های استخوانی، غضروف و چربی تمایز یافتند.

محققین پیشین بارها از خصوصیات چسبندگی به پلاستیک، تمایز و مورفولوژی دوکی فیبروبلاستی برای ارزیابی مزانشیمی بودن سلول‌های جدا شده از مغز استخوان استفاده کرده‌اند.<sup>(۳۲)</sup> نتایج حاضر اولین گزارش مبنی بر وجود برخی تفاوت‌های معنی‌دار بین سلول‌های حاصل از دو روش کشت است.

در روش اول، کشت به طور مستقیم و بدون حذف گلبول‌های قرمز انجام شد. در روش دوم برای جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان جوجه پیش از کشت مغز استخوان، به منظور حذف گلبول‌های قرمز از روش بارگیری مغز استخوان بر روی فایکول و چندین مرحله سانتریفوژ استفاده شد. از معایب این روش این است که دو مرحله سانتریفوژ به مدت حدود ۱۵ دقیقه سبب می‌شود سلول‌ها در خارج از بدن یا انکوباتور بمانند و تحت تغییرات دمایی محیط و فشار مکانیکی حاصل از سانتریفوژ قرار گیرند. همچنین در حین جمع‌آوری، مغز استخوان بیش‌تری لازم است که آسیب‌ر کردن این مقدار مغز استخوان از حیوان، خود آسیب‌زا است.

معیار مورفولوژیکی یا فنوتیپی برای تشخیص تمایز جمعیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مطالعه حاضر، خاصیت آدیپوژنز، استئوژنز و کندروژنز آن‌ها و میزان تمایز سلول‌ها به این سه رده بود.<sup>(۳۳)</sup> اکثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت به راحتی ندول‌های استخوانی غنی از پروتئوگلیکان تولید می‌کنند که با روش آلیزارین رد رنگ پذیر هستند. بسیاری از کلونی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تحت شرایط کشت صحیح، قطره‌های 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، براساس نوع گونه و شرایط محیط کشت می‌توانند پروتئین‌های گلیکوزآمینو گلیکان را تولید کنند و به کندروسیت‌های بالغ تمایز یابند و با تولوئیدن بلو به رنگ بنفش در آیند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با میزان کمی مغز استخوان و بدون استفاده از گرادیان سانتریفوژی نیز می‌توان سلول بنیادی مزانشیمی استخراج و تکثیر کرد. در شرایط کشت به روش مستقیم، خاصیت کلون‌زایی سلولی که نتیجه آن تکثیر و افزایش جمعیت سلولی است بروز پیدا می‌کند. در حالی که در شرایط کشت به روش بارگیری بر روی فایکول، خاصیت کلون‌زایی سلول مزانشیمی به دلیل حضور سلول‌های غیر مزانشیمی به طور کامل بروز پیدا نمی‌کند و در نتیجه جمعیت آن‌ها رشد نکرده باقی می‌ماند.

در مجموع سلول‌های حاصل از کشت مستقیم مورفولوژی نتایج بهتری داشته‌اند و درصد بیش‌تری از آن‌ها توان تمایز به استخوان، چربی و غضروف را داشتند که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود. بنابر این می‌توان آن را به عنوان یک روش مناسب استخراج و کشت سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان جوجه معرفی کرد.

## \* مراجع:

1. Rider DA, Dombrowski C, Sawyer AA, et al. Autocrine fibroblast growth factor 2 increases the multipotentiality of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008 Jun; 26 (6): 1598-608
2. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000 Feb 25; 287 (5457): 1427-30
3. Jäger M, Wild A, Lensing-Hohn S, Krauspe R. Influence of different culture solutions on osteoblastic differentiation in cord blood and bone marrow derived

- progenitor cells. *Biomed Tech (Berl)* 2003 Sep; 48 (9): 241-4
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 Apr 2; 284 (5411): 143-7
5. Smith LG, Weissman IL, Heimfeld S. Clonal analysis of hematopoietic stem - cell differentiation in vivo. *Proc Natl Sci USA* 1991 Apr 1; 88 (7): 2788-92
6. Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology* 2008; 47 (2): 126-31
7. Izad panah R, Kaushal D, Kriedt C, et al. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cell. *Caner Res* 2008 Jun 1; 68 (11): 4229-38
8. Eslaminejad MB, Mirzadeh H, Mohamadi Y, Nickmahzar A. Bone differentiation of the 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
9. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, et al. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from Aug feline bone marrow. *Exp Hematol* 2002 Aug; 30 (8): 879-86
10. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997 Mar-Apr; 6 (2): 125-34
11. Shao X, Goh JC, Hutmacher DW, et al. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in rabbit model. *Tissue Eng* 2006 Jun; 12 (6): 1539-51
12. Jessop HL, Noble BS, Cryer A. The differentiation of a potential mesenchymal stem cells population within ovine bone marrow. *Biochem Soc Trans* 1994 Aug; 22 (3): 248S
13. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 2002 Mar; 307 (3): 321-7
14. Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 2002; 20 (3): 249-58
15. Nadri S, Soleimani M, Hossni RH, et al. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol* 2007; 51 (8): 723-9
16. 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 Nov; 34 (11): 1589-95
17. Gong Z, Niklason LE. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow derived mesenchymal stem cell (hMSCs). *FASEB J* 2008 Jun; 22 (6): 1635-48
18. Inguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental and Biological Medicine (Maywood)* 2001; 226 (6): 507-20
19. Weiss ML, Mitchell KE, Hix JE, et al. Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. *Exp Neurol* 2003 Aug; 182 (2): 288-99
20. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, 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
21. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK,

Latsinik NV and et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation 1974 Apr; 17 (4): 331-40

22. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells

from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. J Cell Biochem 1999 Mar 15; 72 (4): 570-85

23. Sun S, Guo Z, Xiao X, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. Stem Cells 2003; 21 (5): 527-35