Research on Animal Production, Vol. 14, No. 42, Winter 2024 p: 62-67

"Research Paper"

Isolation, Identification and Cultivation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue of Laying Hens

Farhang Ahmadian[1], Mehrdad Irani[2] and Abdollah Mohammadi-Sangcheshmeh[3]

1- Ph.D. student, Department of Animal Science, QaemShahr branch, Islamic Azad University, QaemShahr, Iran
2- Assistant Professor, Department of Animal Science, QaemShahr branch, Islamic Azad University, GhaemShahr, Iran, (corresponding author: M.irani1968@gmail.com)
3- Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Iran
Received: 26 June, 2023 Accepted: 10 February, 2023

Extended Abstract

Introduction and Objective: Today, the intensity and speed of production in the laying hens causes multiple anomalies such as bone and skeletal problems which leads to heavy economic losses. Conducting studies on stem cells obtained from laying hens can improve our knowledge and understanding of the differentiation and molecular mechanisms at cellular level in these birds. For this reason, the aim of this study was to extract mesenchymal stem cells from the fat tissue of laying hens and culture these cells in laboratory conditions.

Material and Methods: In this research, mesenchymal stem cells were isolated in a laboratory environment under sterile conditions from fat tissue of laying hens (Hy-Line strain-w36). Then in an standard culture conditions the mentioned cells were separated from other cells by treatment of collagenase enzyme. The obtained cells after several steps of centrifugation and purification were cultured in DMEM-F12 medium containing 10% fetal bovine serum. During 21 days, cell growth process (PDT) and cell colony formation test were performed to evaluate the performance of isolated cells and the ability of cell growth and proliferation.

Results: About 3 to 4 days after culturing the cells, the adherent cells filled 70-80% of the flask. Cells were passaged up to 14 times with normal morphology. To check the speed of cell growth, this test was repeated in passages 2, 4, and 8 in order to investigate the decrease in the ability of cells to grow with increasing age. The average cell growth rate (PDT) for passages 2, 4, and 8 was 37.03, 60.92, and 101.42%, respectively, which indicates the relationship between stem cells' ability to reproduce and self-renew with their age. After 9 days of cell culture, the number of colonies formed from passage 2 and 5 with concentrations of 175, 350, and 520 cells per 2 cm in 6-well plates were counted as 22, 62 and 84, respectively.

Conclusion: The results of this research showed that mesenchymal stem cells extracted from the fat tissue of laying hens have the ability to maintain their basic characteristics during multiple cell divisions and can maintain their morphological structure and specific characteristics such as growth elated function.

Keywords: Bone differentiation, Genistein, Mesenchymal stem cell, Laying hen

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.61186/rap.14.42.62]

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

"مقاله پژوهشی"

جداسازی، شناسایی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی مرغ تخم‌گذار

فرهنگ احمدیان[۱]، مهرداد ایرانی[۲] و عبدالله محمدی سنگ چشمه[۳]

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران
۲- استادیار گروه علوم دامی، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران، (نویسنده مسوول: M.irani1968@gmail.com)
۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۵
صفحه: ۶۲ تا ۶۷

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: امروزه شدت و سرعت تولید در مرغان تخم گذار باعث بروز ناهنجاری‌های متعدد از جمله مشکلات استخوانی و اسکلتی شده است که زیان اقتصادی سنگینی را به‌دنبال دارد. انجام مطالعات روی سلول‌های بنیادی استحصال شده از مرغان تخم‌گذار می‌تواند باعث بهبود شناخت و درک ما از مکانیسم‌های تمایزی و مولکولی در سطح سلولی در این پرندگان شود. به‌همین منظور هدف از این مطالعه، استحصال سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی مرغان تخم گذار و کشت این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، سلول‌های بنیادی مزانشیمی طی شرایط استریل در محیط آزمایشگاه از بافت چربی احشایی مرغان تخم‌گذار (سویهٔ های‌لاین **w-36**) جداسازی شد. سپس در شرایط محیط کشت استاندارد، سلول‌های موردنظر به‌وسیله تیمار با آنزیم کلاژناز از سایر سلول‌ها جدا شده بود. سلول‌های استحصال شده پس از چند بار سانتریفیوژ کردن و خالص‌سازی، در محیط کشت DMEM-F12 حاوی سرم جنین گاوی ۱۰٪ کشت داده شد. در طول ۲۱ روز، برای بررسی عملکرد سلول‌های جدا شده و توانایی رشد و تکثیر سلولی، روند رشد سلول‌ها و چگونگی تشکیل کلنی سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌ها تا ۱۴ بار با مورفولوژی طبیعی پاساژ داده شدند. برای بررسی سرعت رشد سلول‌ها این آزمون در پاساژهای ۲، ۴ و ۸ تکرار شد تا کاهش توانایی رشد سلول‌ها با افزایش سن، مورد بررسی قرار گیرد.

یافته‌ها: حدود ۳ الی ۴ روز بعد از کشت، سلول‌های چسبیده ۷۰-۸۰ درصد فلاسک را پر کردند. میانگین روند رشد سلول‌ها در پاساژهای ۲، ۴ و ۸ به ترتیب برابر ۳۷/۰۳، ۶۰/۹۲ و ۱۰۱/۴۲ درصد که نشان دهنده ارتباط، توانایی تکثیر و خود نوسازی سلول‌های بنیادی با سن آن‌ها بود. بعد از گذشت ۹ روز از کشت سلولی، تعداد کلنی‌های تشکیل شده از سلول‌های حاصل از پاساژهای ۲ و ۵ با غلظت‌های ۱۷۵، ۳۵۰ و ۵۲۰ سلول در هر سانتی‌متر مربع پلیت ۶ خانه‌ای به‌ترتیب برابر با ۲۲، ۶۲ و ۸۴ کلنی بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی استحصال شده از بافت چربی مرغان تخم‌گذار، توانایی حفظ خصوصیات بنیادی خود در طی تقسیمات سلولی متعدد را دارند و می‌توانند ساختار مورفولوژیکی و خصوصیات خاص خود از جمله عملکرد مربوط به رشد را حفظ نمایند.

واژه های کلیدی: بافت‌چربی، سلول بنیادی مزانشیمی، کشت سلولی، مرغ تخم‌گذار

مقدمه

تولید جهانی گوشت مرغ به‌طور چشمگیری رشد داشته و تقاضای مصرف کنندگان برای گوشت و تخم‌مرغ با کیفیت بالا در سال‌های اخیر به‌طور مداوم افزایش یافته است (Aliborzi et al., 2016; Arjmandi & Smith, 2002). با این‌حال، انتخاب ژنتیکی برای افزایش راندمان تولید باعث اختلالات اسکلتی، تجمع چربی اضافی و تحلیل عضلانی در پرندهای سویه‌های تجاری می‌شود و در مجموع این موارد در حال حاضر از مسائل مهم مدیریتی و اقتصادی در صنعت طیور به‌حساب می‌آیند (Bai et al., 2013; Braun et al., 2010; Broumandania et al., 2022). کمبود کلسیم در جیره مرغ‌های تخم‌گذار علاوه بر کاهش استحکام پوسته تخم‌مرغ، منجر به کاهش و سپس توقف تخم‌گذاری مرغ‌ها می‌شود. مرغ‌های جوان با سن کمتر از ۳۰ هفته، گاهی از عارضه قفس رنجوری رنج می‌برند و مرغ‌های مسن‌تر نیز به عارضه ترد و شکننده بودن استخوان مبتلا می‌شوند. هر دو عارضه ناشی از اختلال در سوخت و ساز کلسیم می‌باشد (Ansari Pirsaraei et al., 2022; Pourreza J, 2005). اثرات خستگی مرغان تخم‌گذار در قفس در پایان دوره تخم‌گذاری شدیدتر است. استخوان‌های این مرغ‌ها بسیار شکننده هستند و به‌راحتی می‌شکنند (Beck & Hansen, 2004). خستگی مرغان تخم‌گذار در قفس مهمترین بیماری اسکلتی است که در جوجه‌های بالغ یافت می‌شود. عامل اصلی که باعث شدت پوکی استخوان می‌شود مدت زمانی است که پرندگان در حالت باروری مداوم هستند. فلذا مدت زمان تولید، نه تعداد تخم‌گذاری، یکی از مهمترین عامل‌ها در شدت بیماری به‌حساب می‌آید (Whitehead, 2004).

مطالعات روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در طیور می‌تواند بینش بنیادی ما برای فهم بهتر فرایند رشد اسکلتی، رشد ماهیچه‌ها و تجمع چربی در پرنده‌ها را به‌دنبال داشته باشد. سلول‌های بنیادی، سلول‌های غیرتخصصی در بدن هستند که توانایی تبدیل‌شدن به سلول‌های تخصصی با کارکرد ویژه را دارند. از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغ که موردتوجه اکثر محققان قرارگرفته است، می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی اشاره نمود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از نوع سلول‌های بنیادی پرتوان هستند، یعنی تحت شرایط مناسب، این سلول‌ها می‌توانند به سلول‌های عصبی، سلول‌های چربی، سلول‌های غضروفی، سلول‌های عضلانی و سلول‌های استخوانی تمایز یابند (Braun et al., 2010). سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از بافت چربی جدا می‌شوند می‌توانند همه مارکرهای معمول برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بیان کنند و علاوه بر این می‌شود آن‌ها را در

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.61186/rap.14.42.62]

مقیاس وسیع بدون درد و یا عمل به‌شدت تهاجمی، جدا کرده و تحمل آپوپتوزی بالایی را هم نشان دهند. در حالیکه در مورد سلول‌های بنیادی مغز استخوان، جمعیت سلولی، حداکثر طول عمر و چندتوانی سلول‌های بنیادی جدا شده با افزایش سن کاهش می‌یابد (Ertaş et al., 2012). سلول‌های بنیادی مشتق از چربی می‌توانند به تعداد ۵۰۰۰ سلول از یک گرم بافت چربی جدا شوند. در حالیکه فقط ۰/۰۱ درصد سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان پس از سانتریوفیوژ، از این بافت جدا می‌گردند. بنابراین سلول‌های استحصال شده از بافت چربی می‌توانند ۵۰۰ بار بیشتر از مقدار مشابه از سلول‌های مغز استخوان مشتق شوند (Francis et al., 2010). سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی و سلول‌های استرومایی مغز استخوان از نظر بیان ژن و قدرت تمایز شبیه به هم عمل می‌کنند اما سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی از توانایی خودتکثیری بالاتری برخوردار هستند (Kingham et al., 2007). سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخوان، با سرعت بیشتری در شرایط آزمایشگاهی گسترش می‌یابند. این سلول‌ها عملکرد بالایی دارند و در حال حاضر رایج‌ترین سلول‌های کشت داده شده برای ترمیم و بازسازی بافت استخوان هستند (Vallée et al., 2009).

یکی از چالش‌ها در مطالعات بر روی سلول‌های بنیادی، نحوه استخراج و کشت سلول‌های مذکور می‌باشد. این مسئله در مورد سلول‌های بنیادی مرغ‌های تخم‌گذار به‌دلیل سن بالاتر و در نتیجه توانایی کمتر سلول‌های بنیادی آنها چالش بزرگتری محسوب می‌شود. از این‌رو، هدف از این آزمایش جداسازی و کشت این سلول‌ها به‌منظور درک بهتر از رفتارشناسی و عملکرد آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از چربی احشایی سه قطعه مرغ تخم‌گذار سویه، های‌لاین (w-36) استفاده شد. به‌منظور نمونه‌برداری، پرنده‌ها ابتدا کشتار شدند و پس از ضدعفونی با الکل ۷۰٪، در زیر هود لامینار کلاس II، تحت شرایط استریل محوطه شکمی آن‌ها باز شد. از چربی احشایی آن‌ها به‌وسیله وسایل جراحی استریل، نمونه چربی جدا شد. هر نمونه به‌طور جداگانه در یک فالکون حاوی محلول فسفات بافر سالین (PBS) به‌همراه ۱۰٪ سرم گوساله جنینی (FBS) قرار داده شد. محلول تهیه شده حاوی آنتی‌بیوتیک پن استرپ و ضد قارچ فانجیزون جهت جلوگیری از آلودگی سلول‌ها بود. آنتی‌بیوتیک و ضدقارچ، ۳ برابر مقدار استاندارد به محلول اضافه شد. نمونه چربی استحصال شده در زیر هود لامینار کلاس II، دوباره با محلول PBS شسته شد و سپس به‌صورت مکانیکی توسط اسکالپر خرد شد. نمونه چربی ریز شده بازهم با PBS شسته شد و به داخل فالکون منتقل شد. سپس هم حجم چربی حاصله، آنزیم کلاژناز ۰/۱٪ تیپ ۱ به آن افزوده شد و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار گرفت. در این مدت چندین بار فالکون با دست به‌خوبی تکان داده شد تا مخلوط همگن شود. بعد از مرحله تجزیه آنزیمی، نهایتاً فالکون‌ها با دور ۱۲۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا سلول‌های بنیادی ته‌نشین شوند. روغن و بافت چربی به‌آرامی دور ریخته شد و سپس سلول‌های ته‌نشین شده پس از پیپتاژ شدن و شناور شدن در محیط، به فلاسک‌های T25 مخصوص کشت سلولی حاوی محیط کشت DMEM-F12 به‌همراه ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک منتقل شدند و در نهایت داخل انکوباتور با دمای حدود ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان پنج درصد CO2 قرار گرفتند. یک روز بعد از جداسازی سلول‌ها، محیط کشت فلاسک‌ها تعویض شد و بعد از شستشو، محیط جدید به‌همراه ۱۰ درصد FBS به فلاسک اضافه شده و مورفولوژی و ساختار سلول‌ها در زیر میکروسکوپ بررسی شد که سلول‌ها ساختاری دوکی شکل داشتند و به کف فلاسک چسبیده بودند.

پاساژ سلولی

با تعویض منظم محیط کشت، سلول‌ها به تراکم مناسب می‌رسند، لذا جهت انتقال به فلاسک بزرگ‌تر و تکثیر سلول‌ها، پاساژ سلولی انجام می‌گیرد. به‌منظور انجام پاساژ سلولی، محیط رویی فلاسک را خالی کرده و کمی با PBS شستشو داده شد. آنگاه PBS به‌طور کامل به‌وسیله سمپلر خارج گردید. برای فلاسک T25 مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر تریپسین به فلاسک اضافه کرده و به‌مدت دو دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. تریپسین برای سلول‌ها کشنده است و باید سریع خنثی شود که به‌همین منظور مقدار دو الی سه میلی‌لیتر محیط کشت به فلاسک اضافه می‌گردد. آنگاه سلول‌های کنده شده و محیط داخل فلاسک را داخل یک فالکون ریخته و با دور ۱۲۰۰rpm به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ کرده تا سلول‌ها ته فالکون ته‌نشین شوند. بعد از سانتریفیوژ مایع روی سلول‌ها را دور ریخته و رسوب سلولی را در مقدار کمی محیط کشت کامل (DMEM به‌همراه FBS) پیپتاژ می‌کنیم. آنگاه میزان مناسب از سلول‌ها برداشته و به فلاسک منتقل می‌کنیم و فلاسک را درون انکوباتور قرار می‌دهیم. به این ترتیب سلول‌های یک فلاسک T25 به دو فلاسک T25 دیگر یا یک فلاسک T75 منتقل می‌شوند و این‌گونه تعداد سلول‌ها در طی پاساژ دادن افزایش می‌یابد.

بررسی روند رشد سلولی

برای این‌منظور سلول‌های پاساژ ۲، ۴ و ۷ توسط تریپسین ۰/۰۵ ٪ کنده شدند و با غلظت ۵۰۰۰ سلول، در هر خانه پلیت ۲۴ خانه کشت شدند. سپس در هر روز ۳ خانه از پلیت با ۳ بار تکرار شمارش شد و این عمل به‌مدت ۱۲ روز ادامه داشت. در نهایت منحنی رشد برای هر پاساژ ترسیم شد و همچنین زمان دو برابر شدن سلول‌ها (PDT[1]) به‌وسیله فرمول (۱) محاسبه شد.

(۱)

$$PDT = \frac{\text{زمان کشت (CT)}}{\text{تعداد سلول های ۲ برابر شده (PDN)}}$$

$$PDN = \log\frac{N}{N0} \times 3.31$$

که در این معادله، N تعداد سلولها در پایان زمان کشت است و N0 تعداد سلول‌ها در ابتدای زمان کشت می‌باشد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-25]
[DOI: 10.61186/rap.14.42.62]

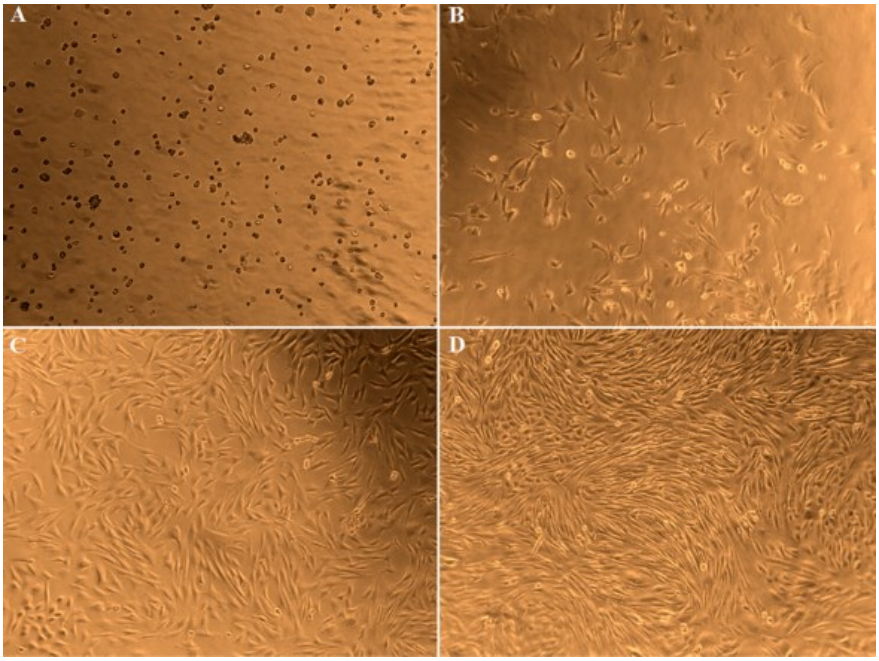
آزمون تشکیل کلنی (CFU-Assay)

یکی از روش‌های مرسوم برای بررسی توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در خود نوسازی و تشکیل کلنی، بررسی روند رشد سلول‌ها در پلیت‌های کشت سلولی می‌باشد. در این روش سلول‌ها در پاساژهای ۲ و ۵ با غلظت‌های ۱۷۵، ۳۵۰ و ۵۲۰ سلول در هر cm^2 در پلیت ۶ خانه کشت شدند. سپس سلول‌ها به‌مدت نه روز در دمای ۳۷° C و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. پس از گذشت نه روز، ابتدا محیط روی سلول‌ها تعویض شد و شستشو با PBS صورت گرفت و سلول‌ها با محلول ۳ به ۱ متانول–استیک اسید به‌مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند تا تثبیت گردند. در نهایت محلول ذکر شده خارج گردید و ۱ml محلول ۱٪ کریستال ویوله در اتانول ۱۰۰٪ به هر پلیت اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه کریستال ویوله خارج گردید و سطح پلیت با آب شسته شد. تعداد کلنی‌ها شمارش و همچنین تصاویر میکروسکوپی تهیه گردید.

نتایج و بحث

در این مطالعه، ما برای اولین بار سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از بافت چربی مرغان تخم‌گذار استحصال نمودیم. سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی، دوکی شکل بوده که به سرعت تکثیر می‌شوند و در یک الگوی گردابی مشابه سلول‌های جدا شده از سلول‌های موش بودند (Greendale et al., 2002). این سلول‌ها همانند سلول‌های سلول‌های بنیادی موش توانایی خودنوسازی و تکثیر از تعداد معدودی سلول را دارند. این مطالعه همچنین نشان داد که سلول‌های بنیادی مرغان تخم‌گذار نیز دارای ۲ ویژگی مهم تعیین کننده (mesenchymal stem cells) MSC شامل توانایی تکثیر سریع و اتصال به سطوح برای رشد می‌باشند (Hinenoya et al., 2013).

در این آزمایش پس از جداسازی سلول‌های مزانشیمی از بافت چربی، سلول‌ها در فلاسک‌های ۲۵ میلی‌لیتری کشت داده شدند.



شکل ۱– مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مرغ تخم‌گذار (A): سلول‌های کشت شده (B): یک روز پس از کشت (تراکم ۳۰–۴۰ درصد) (C): سه روز پس از کشت (تراکم ۵۰–۶۰ درصد) (D): تراکم ۱۰۰ درصد

Figure 1. Morphology of mesenchymal stem cells of laying hen: seeded cells (A): 1th day of seeding (30-40% confluency) (B): third day of seeding (50-60% confluency) (C): 100% confluency

سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی مرغ تخم‌گذار پس از یک شبانه روز به کف فلاسک چسبیدند و به‌صورت تدریجی ظاهری دوکی شکل پیدا کردند، که این ناشی از افزایش اتصالات سلولی به سطح می‌باشد که موجب پهن شدن سلول‌ها می‌شود. بعد از حدود ۳ الی ۴ روز، سلول‌های چسبیده ۷۰ – ۸۰ درصد فلاسک را پر کردند و پاساژ داده شدند. از پاساژهای بعدی، به‌طور میانگین سلول‌ها هر ۷ روز به تراکم ۸۰–۹۰٪ می‌رسیدند. سلول‌های استحصال شده ۱۴ بار بعد از پاساژ دادن، ظاهری کاملا طبیعی داشتند و مورفولوژی خود را حفظ نمودند. از نظر اندازه هم سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از بافت چربی مرغ تخم‌گذار نسبت به سلول‌های مشابه استخراج شده از گونه‌هایی مثل انسان، گوسفند و شتر کوچک‌تر بوده و ظاهری ستاره‌ای دارند.

توانایی رشد و خودنوسازی و کلنی‌سازی سلول‌های بنیادی

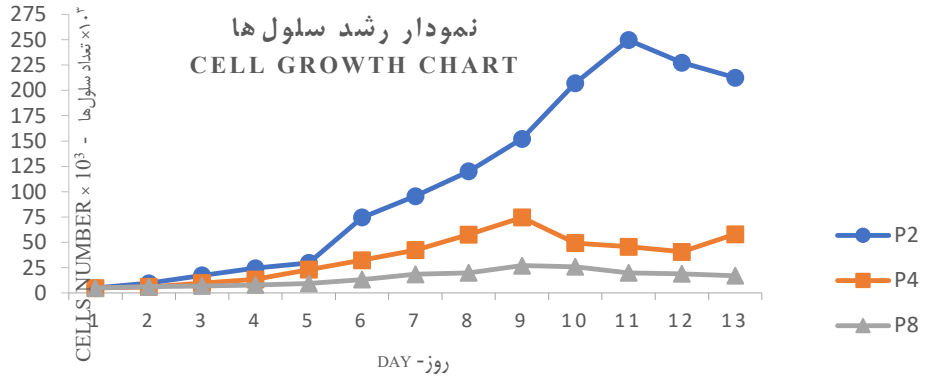
روند رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جوجه‌های گوشتی از طریق بررسی سرعت دو برابر شدن جمعیت سلول‌ها یا PDT انجام شد. بدین منظور تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه کشت شد و به‌مدت ۱۲ روز متوالی، سلول‌ها شمارش شدند تا منحنی رشد آن‌ها ترسیم گردد. این

1- Population Doubling Time

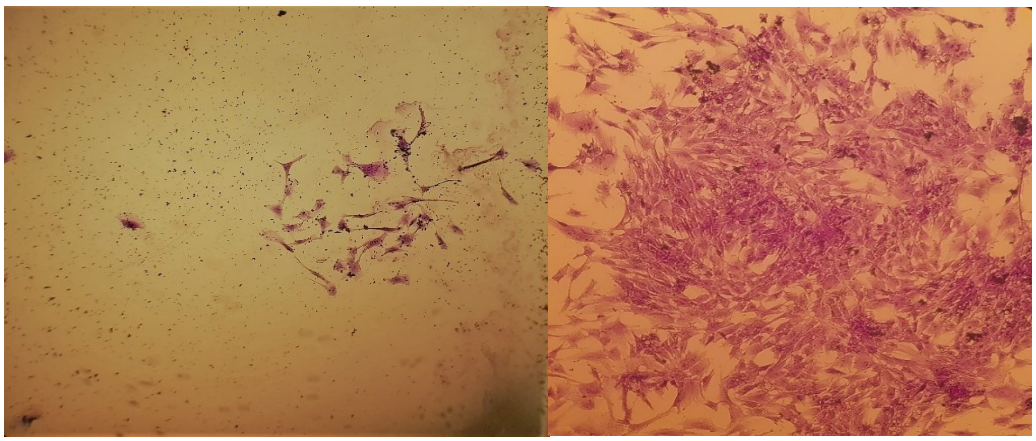
[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-25]
[DOI: 10.61186/rap.14.42.62]

آزمون در پاساژهای ۲، ۴ و ۸ تکرار شد تا کاهش توانایی رشد سلول‌ها با افزایش سن، مورد بررسی قرار گیرد. روند رشد و تکثیر سلول‌ها در پاساژ ۲ و ۴ شبیه هم بودند، هر چند در پاساژ ۸ رشد سلول‌ها بسیار کم بود. سلول‌ها در پاساژ دوم، بین روزهای ۱ تا ۵ روند رشد آهسته‌تری داشتند و در فاز تاخیری[1] بودند. عموما سلول‌ها قبل از اینکه وارد فاز رشد شوند، فاکتورهای رشد را سنتز می‌کنند که باید به غلظت آستانه[2] برسد و چنانچه سلول‌ها چگالی و یا توان بقا بالایی داشته باشند، ممکن است فاز تاخیری به‌کلی از بین برود (Greendale et al., 2002). این سلول‌ها بین روزهای ۵ تا ۱۱ رشد لگاریتمی داشتند و از روز یازدهم به بعد میزان رشد و تکثیر آنها کمتر از مرگ و میر سلولی بود. همچنین در پاساژ ۴ سلول‌ها تا روز ۴ در فاز تاخیری بودند و سپس تا روز ۹ رشد لگاریتمی داشتند و رشد آن‌ها همانند پاساژ دوم، پس از روز نهم کاهش یافت. اما در پاساژ ۸، توان رشد و تکثیر سلولی به‌طور موثری تحت تاثیر سن سلول‌ها قرار گرفت و تقریبا تا روز پنجم، نمودار رشد افزایشی نداشت و بعد از آن تا روز ۹ شاهد رشدی با شیب ملایم بودیم.

همچنین میانگین PDT برای پاساژ ۲، ۴ و ۸ به‌ترتیب برابر ۳۷/۰۳ و ۶۰/۹۲ و ۱۰۱/۴۲ می‌باشد که نشان دهنده ارتباط، توانایی تکثیر و خود نوسازی سلول‌های بنیادی با سن آن‌ها می‌باشد. با افزایش پاساژ سلولی به‌تدریج سرعت رشد سلول‌ها کم می‌شود و مدت زمان بیشتری برای دوبرابر شدن جمعیت آن‌ها نیاز است که این امر باعث تغییر مورفولوژی سلول‌ها می‌شود و سلول‌ها شکلی پهن گرفته و مورفولوژی دوکی خود را از دست می‌دهند.



شکل ۲- منحنی رشد سلول‌های بنیادی جوجه‌های گوشتی
Figure 2. Broiler stem cells Growth curve.



شکل ۳- کلنی سلولی در پاساژ ۲ با تراکم ۵۲۰/cm^2
Figure 3. Cell colony at passage 2 and density of 520/cm^2

شکل ۴- کلنی سلولی در پاساژ ۵ با تراکم ۵۲۰/cm2
Figure 4. Cell colony at passage 5 and density of 520/cm^2

منحنی رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا از چربی در مرغان تخم‌گذار در این مطالعه مشابه منحنی رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان جوجه‌ها بود (Kim et al., 2011; Ko, 2014). همچنین در خوکچه هندی، PDT سلول‌های جدا شده از مغز استخوان به ترتیب ۶۲,۹، ۶۵,۶ و ۹۱,۴ ساعت در پاساژ ۲ ، ۵ و ۸ بود (Khatri et al., 2009).

1- Lag phase
2- Critical concentration

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-25]
[DOI: 10.61186/rap.14.42.62]

همچنین از خصیصه‌های سلول‌های بنیادی، توانایی رشد و خود نوسازی می‌باشد که سنجش CFU روشی است که توان سلول‌ها در تکثیر و تشکیل کلنی را مورد بررسی قرار می‌دهد. بدین منظورلازم است که سلول‌ها با چگالی پایین کشت شوند تا کلنی‌های ایجاد شده به خوبی مشخص شوند. بدین جهت سلول‌های پاساژ ۲ و ۵ با غلظت‌های ۱۷۵، ۳۵۰ و ۵۲۰ سلول در هر cm^2 پلیت ۶ خانه کشت شدند و بعد از گذشت ۹ روز تعداد کلنی‌ها توسط نرم افزار OpenCFU-3.9.0 شمارش شد. سلول‌های کشت شده با غلظت ۱۷۵، ۳۵۰ و ۵۲۰ سلول در هر سانتی‌متر مربع در پاساژ ۲ به ترتیب ۱۰۷، ۱۳۶ و ۲۱۳ و در پاساژ ۵ به ترتیب ۲۲، ۶۲ و ۸۴ کلونی تشکیل دادند. این گزارش‌ها نشان می‌دهد که پتانسیل رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بسته به تعداد پاساژ و همچنین منبع بافتی سلول‌های جداسازی شده و منشأ گونه می‌تواند متفاوت باشد.

منابع

Aliborzi, G., Vahdati, A., Mehrabani, D., Hosseini, S. E., & Tamadon, A. (2016). Isolation, characterization and growth kinetic comparison of bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells of Guinea pig. *International journal of stem cells*, *9*(1), 15-123 .

Ansari Pirsaraei, Z., Hatefi, A., Zare Shahneh, A., & Deldar, H. (2022). Evaluation of beta-adrenergic agonist theophylline function in reducing inflammation on blood metabolites and egg quality traits in laying hens at the end of production period. *Research On Animal Production*, *13*(37), 114-121 .

Arjmandi, B. H., & Smith, B. J. (2002). Soy isoflavones' osteoprotective role in postmenopausal women: mechanism of action. *The Journal of nutritional biochemistry*, *13*(3), 130-137 .

Bai, C., Hou, L., Ma ,Y., Chen, L., Zhang, M., & Guan, W. (2013). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from chicken bone marrow. *Cell and tissue banking*, *14*(3), 437-451 .

Beck, M., & Hansen, K. (2004). Role of estrogen in avian osteoporosis. *Poultry science*, *83*(2), 200-206 .

Braun, J., Hack, A., Weis-Klemm, M., Conrad, S., Treml, S., Kohler, K., . . . Aicher, W. K. (2010). Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research*, *71*(10), 1228-1236 .

Broumandania, Z., Khosravinia, H., Masourei, B., & Parizadian, B. (2022). Effect of vitamin D3 and guanidinoacetic acid on performance, some physiological parameters, carcass characteristics and behavior of broilers affected by lactic acidosis. *Research On Animal Production (Scientific and Research)*, *13*(37), 10-21 .

Ertaş, G., Ural, E., Ural, D., Aksoy, A., Kozdağ, G., Gacar, G., & Karaöz, E. (2012). Comparative analysis of apoptotic resistance of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow and adipose tissue. *The Scientific World Journal*, *2012* .

Francis, M. P., Sachs, P. C., Elmore, L. W., & Holt, S. E. (2010). Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction. *Organogenesis*, *6*(1), 11-14 .

Greendale, G. A., FitzGerald, G., Huang, M.-H., Sternfeld, B., Gold, E., Seeman, T., . . . Sowers, M. (2002). Dietary soy isoflavones and bone mineral density: results from the study of women's health across the nation. *American journal of epidemiology*, *155*(8), 746-754 .

Hinenoya, H., Katsuyama, H., & Nohno, T. (2013). Genistein affects osteoblastic MC3T3-E1 cells both through estrogen receptor and BMP-Smad signaling pathways. *Kawasaki Med J*, *39*, 21-31 .

Khatri, M., O'Brien, T. D., & Sharma, J. M. (2009). Isolation and differentiation of chicken mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem cells and development*, *18*(10), 1485-1492 .

Kim, C. Y., Le, T. T., Chen, C., Cheng, J.-X., & Kim, K.-H. (2011). Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. *The Journal of nutritional biochemistry*, *22*(10), 910-920 .

Kingham, P. J., Kalbermatten, D. F., Mahay, D., Armstrong, S. J., Wiberg, M., & Terenghi, G. (2007). Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental neurology*, *207*(2), 267-274 .

Ko, K.-P. (2014). Isoflavones: chemistry, analysis, functions and effects on health and cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *15*(17), 7001-7010 .

Pourreza J, S. G., and Mehri. (2005). *Scott's Nutrition of the Chicken* (4th ed.). Arkan Publications .

Vallée, M., Côté, J.-F., & Fradette, J. (2009). Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathologie Biologie*, *57*(4), 309-317 .

Whitehead, C. C. (2004). Overview of bone biology in the egg-laying hen. *Poultry science*, *83*(2), 193-199 .

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.61186/rap.14.42.62]