مقاله پژوهشی

جداسازی، تکثیر و بهینه سازی کشت سلول‌های فیبروبلاست تخم مرغ SPF

محمد مهدی رمضانی[۱]، علی اصغر رزم آرای ایرانق[۱]، رضا آقایی[۲] و ناصر رزم آرایی*[۳]

۱- دانش آموخته دکتری دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، ایران
۲- گروه دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران
۳- آزمایشگاه سلولی مولکولی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمالغرب، ایران

*نویسنده مسئول: دکتر ناصر رزم آرایی، دکتری تخصصی، nasserrazmaraii@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۲/۲۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۵/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۶/۱۸

چکیده

مقدمه و هدف: سلول‌های کشت‌شده طیور، بویژه سلول‌های فیبروبلاست می‌توانند منبع مفیدی برای محققین مختلف در زمینه مطالعات دارویی, کشت ویروس‌های طیور، انسان و هم چنین تولید واکسن‌های ویروسی را فراهم آورند. کشت این سلول‌ها نیازمند وجود یک محیط پایه بهینه می‌باشد و در حال حاضر گزینه‌های محدودی برای این محیط‌های پایه وجود دارد.

روش کار: این مطالعه با هدف جداسازی سلول‌های فیبروبلاست از جوجه‌های SPF، ارزیابی رشد و تکثیر این سلول‌ها در سه محیط کشت DMEM با گلوکز بالا، DMEM با گلوکز پایین و محیط کشت RMI1640 که با غلظت‌های مختلفی از سرم جنین گوساله (FBS) غنی شده بودند، انجام گردید.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در رشد و تکثیر فیبروبلاست‌های کشت‌شده در محیط کشت DMEM با گلوکز بالای غنی شده با ۱۰ درصد FBS در مقایسه با محیط کشت‌های DMEM با گلوکز پایین و محیط کشت RMI1640 که با ۱۰ درصد FBS غنی شده بودند، وجود داشت ($P<0.05$). اما تفاوت معنی‌داری در نتایج زمان دو برابر شدن این سلول‌ها در سه محیط کشت، مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد که براحتی می‌توان در آزمایشگاه سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه را جداسازی نموده و با استفاده از محیط کشت DMEM با گلوکز بالای با ۱۰ درصد FBS تکثیر داد. نتایج این مطالعه می‌تواند در تحقیقات مختلف دارویی و ویروس‌شناسی و همچنین تولید واکسن‌های مختلف ویروسی مورد استفاده محققین قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: کشت سلول، تخم مرغ SPF، فیبروبلاست جنین جوجه، DMEM, RMI1640

مقدمه

سلول‌های بنیادی جنینی (ESC) سلول‌هایی هستند که از توده سلولی داخلی بلاستوسیست در انسان و همچنین حیوانات مختلف دیگر نظیر انواع پستانداران و پرندگان و ماهی‌ها مشتق شده‌اند. این سول‌ها می‌توانند به عنوان یک ابزار ارزشمند برای بررسی رشد و تکثیر، بازسازی و ترمیم بافتی و همچنین علوم مختلف کاربردی مورد استفاده قرار گیرند. سلول‌های بنیادی جنینی دارای ویژگی‌های منحصر به فردی هستند و مهمترین آنها خود بازسازی و توانایی تولید اندودرم، مزودرم و اکتودرم در شرایط *in vitro* و *in vivo* می‌باشند (Khiabani *et al.*; Xiong *et al.*, 2020).

اگرچه تا به امروز تلاش‌های قابل توجهی برای تهیه رده سلول‌های بنیادی جنینی انجام شده است، ولی فقط موفق به تولید رده ESC در موش سوری (Evans and Kaufman, 1981) ، موش صحرایی (Iannaccone *et al.*, 1994)، انسان و میمون‌ها (Thomson *et al.*, 1995) گردیده است. سلول‌های جدا شده از بلاستودرم تخم بارور شده در مرحله دهم جنینی (ده روزگی) در جنین مرغ معمولاً به عنوان سلول‌های بنیادی جنینی مرغ (CESC) نامیده می‌شوند (Sun *et al.*,

2019) و این نوع سلول‌ها دارای مقادیر نسبتاً کمی از سیتوپلاسم و یک هسته شفاف بزرگ می‌باشند (Zhang *et al.*, 2018).

سلول‌های بنیادی جنینی مرغ نیز دارای بسیاری از ویژگی‌های خود تجدید پذیری و تمایز چند خطی نظیر سلول‌های بنیادی جنینی در پستانداران می‌باشند. آنها می‌توانند برخی از نشانگرهای پرتوان مانند آلکالین فسفاتاز (AKP) و آنتی ژن-۱ جنینی خاص مرحله ای (SSEA-1, Stage-specific embryonic antigen) را بیان نمایند. همچنین تراتوما با سه لایه جوانه در داخل بدن جنین در شرایط آزمایشگاهی را تولید نمایند (Intarapat and Stern, 2013). سلول‌های بنیادی جنینی مرغ فرصت ایده آلی را برای مطالعات سمیت سلولی داروهای جدید، تولید پرندگان تراریخته مبتنی بر سلول، تولید واکسن برای بیماری های ویروسی طیور و انسان و همچنین ارائه درک بهتر در مورد تحقیقات پایه و غیره را فراهم می‌آوردند (Han *et al.*, 2015).

در آزمایشگاه می‌توان سلول‌های بلاستودرمی جوجه را کشت داد و با حفظ ویژگی‌های خود در شرایط آزمایشگاهی نگهداری نمود (López-Díaz *et al.*, 2016). با این وجود هنوز لاین سلول‌های بنیادی جنینی مرغ ایجاد نشده است زیرا حفظ حالت تمایز نیافته آنها برای مدت طولانی در شرایط آزمایشگاهی و همچنین تولید کایمراهای خط زایا بسیار دشوار می‌باشد (Aubel and Pain, 2013). برای ایجاد پروتکل‌های استاندارد در کشت CESCs و دستکاری ژنتیکی و همچنین تحقیقات بیولوژیکی، لازم است که تغییرات در شرایط کشت سلولی به حداقل برسد. بر همین اساس رویکردها و پیشنهادات مختلفی برای بهینه‌سازی استراتژی جداسازی و طراحی سیستم‌های کشت طولانی مدت برای رده سلولی CESC وجود دارد (Farzaneh *et al.*, 2017). فیبروبلاست و فیبروسیت، هر دو، در حقیقت یک نوع سلول می‌باشند و بسته به نوع و میزان سوخت و ساز بافتی، ممکن است به صورت فعال شده یعنی فیبروبلاست یا کمتر فعال شده یعنی فیبروسیت مشاهده شوند (LeBleu and Neilson, 2020).

با تغییر ترکیبات محیط کشت سلولی می‌توان ظرفیت تکثیر سلولی فیبروبلاست جنین جوجه (DF-1) را بهبود بخشید. متابولیسم اسیدهای آمینه و چربی‌ها دارای نقش بسیار مهمی در رشد این سلول‌ها می‌باشند. با بررسی تفاوت‌ها در اجزای محیط کشت‌های مختلف و افزودن ترکیبات مغذی می‌توان نسبت به بهینه محیط کشت برای رشد بهتر سلول‌های DF-1 استفاده نمود ودر یک مطالعه با تغییرات مختلف در محیط کشت، توانستند رشد سلول‌های DF-1 بهبود دهند و در ادامه تکثیر ویروس بیماری بورس عفونی طیور (IBDV) را با این محیط بهینه‌سازی شده به‌طور چشمگیری افزایش دادند. و توانستند با بررسی متابولیت‌های داخل محیط کشت، بهینه سازی محیط کشت سلول‌ها و تکثیر ویروس IBDV بمنظور تولید واکسن را بهبود ببخشند (Lin *et al.*, 2019).

این مطالعه با هدف جداسازی سلول‌های فیبروبلاست از جوجه¬های SPF، ارزیابی رشد و تکثیر این سلول¬ها در سه محیط کشت DMEM با گلوکز بالا، DMEM با گلوکز پایین و محیط کشت RMI1640 که با غلظت¬های مختلفی از سرم جنین گوساله غنی شده بودند، انجام گردید.

روش مطالعه

کشت سلولی فیبروبلاست تخم مرغSPF: برای سلول‌های فیبروبلاست اولیه از جنین جوجه ۸ تا ۱۲ روزگی استفاده گردید. جنین‌ها از تخم‌های SPF استخراج شدند. اندام های جنینی بریده شده و احشاء آنها نیز تخلیه گردید و چندین بار با محلول PBS استریل (pH= 7.4) شستشو داده شدند. سپس با استفاده از قیچی و اسکالپل به قطعاتی به اندازه یک میلی‌متر خرد شدند و این قطعات بافتی با استفاده از دستگاه همزن و آهنربا به مدت ۵ دقیقه در محلول تریپسین (w/v) ۲/۵ ٪ قرار گرفتند و در مرحله آخر تریپسین با افزودن FBS غیرفعال گردید. فرآیند هضم چندین بار تکرار گردید تا اتصالات سلول‌های جنینی به یکدیگر کاملا از بین رفته سلول‌ها بصورت سلول‌های منفرد شناور در آیند. در نهایت، سوسپانسیون حاوی سلول‌های هضم شده توسط یک استرینر یا صافی سلول فیلتر شدند. مایع حاوی سلول‌های شناور به فالکون‌های استریل درب‌دار منتقل گردید و با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا سلول‌ها رسوب نمایند. سلول‌ها دو بار با PBS شستشو شدند و در نهایت در ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت سلولی DMEM با گلوکز بالا معلق شدند. محیط کشت سلول با ۱۰٪ FBS غنی گردید و آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها و بمنظور جلوگیری از رشد قارچ، به همان نیستاتین استفاده گردید و مقدار ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی فیبروبلاست در فلاسک کشت سلولی T-25 استریل کشت داده شدند سپس فلاسک‌های کشت برای تکثیر سلول‌های فیبروبلاست در انکوباتور CO_2 دار نگهداری شدند.

بهینه‌سازی محیط کشت سلول: دو مرحله برای فرآیند بهینه سازی وجود داشت. در مرحله اول، سلول‌ها با استفاده از سه محیط پایه شامل: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium، DMEM (گلوکز پایین)، Dulbecco's Dulbecco's Modification of Eagle's Medium، DMEM (گلوکز بالا) و RPMI 1640 که همگی با ۵ درصد FBS غنی شده بودند، رشد داده شدند. بعد از رشد و جداسازی سلول‌های فیبروبلاست به مرحله دوم

منتقل شدند و در این مرحله با استفاده از چهار غلظت مختلف FBS شامل ۲/۵ ، ۵ ، ۷/۵ و ۱۰ درصد و سه محیط کشت مختلف بترتیب کشت داده شدند.

تریپسینیزاسیون: در یک هود ایمنی بیولوژیک، محیط‌های T-flask دور ریخته شد، دو بار با سالین بافر فسفات (PBS) شسته شد، ۱ میلی لیتر تریپسین اضافه شد و در انکوباتور CO_2 به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. پس از جداسازی سلولی (با بررسی زیر میکروسکوپ)، ۴ میلی لیتر محیط تازه اضافه شد و سلول‌ها با فلاشینگ ملایم همگن شدند.

شمارش سلول: مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی تریپسین شده، بر روی یک لام تمیز، قرار داده می‌شد و با ۱۰ میکرولیتر از رنگ تریپان بلو مخلوط می‌شد. و با استفاده از لام هموسیتومتر تعداد کل سلول‌ها و تعداد سلول‌های زنده شمارش می‌گردید و عدد حاصل در ضرایب رقت ضرب می شد. در طول این مطالعه، تمام مراحل به صورت کاملا استریل و با استفاده از یک هود آزمایشگاهی کلاس دو انجام گردید. از ۱۲ فلاسک T 25 سانتی‌متر مربعی که برچسب‌گذاری شده بودند، به ۴ فلاسک اول مقدار ۹ میلی‌لیتر محیط کشت سلولی DMEM (گلوکز بالا) و یک غلظت از غلظت‌های چهارگانه FBS اضافه گردید و به ۴ فلاسک دوم مقدار ۹ میلی‌لیتر محیط کشت سلولی DMEM (گلوکز پایین) و یک غلظت از غلظت‌های چهارگانه FBS و به ۴ فلاسک سوم نیز مقدار ۹ میلی‌لیتر محیط کشت سلولی RPMI 1640 و یک غلظت از غلظت‌های چهارگانه FBS اضافه گردید و در ادامه به هر فلاسک مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی تریپسنه شده (۲۰×۱۰^۴ سلول در میلی‌لیتر) تلقیح شد و فلاسک‌ها در انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۵ درصد CO_2 درصد انکوبه شدند.

زمان دو برابر شدن سلول‌ها: بعد از رشد سلول‌های فیبرو بلاست، بهترین فلاسک از هر یک از محیط کشت‌ها که بیشترین تعداد سلول را داشتند انتخاب شدند و سلول‌های هر یک از این فلاسک‌ها بطور مجزا تریپسنه شدند و تعداد ۱۰×۱۰^۴ سلول در هر میلی‌لیتر به سه چاهک از میکروپلیت ۲۴ خانه منتقل گردید و بترتیب به هشت چاهک اول از محیط کشت سلولی DMEM (گلوکز بالا)، به هشت چاهک دوم محیط کشت سلولی DMEM (گلوکز پایین) و به هشت چاهک سوم محیط کشت سلولی RPMI 1640 اضافه گردید و به تمام چاهک‌ها از بهترین غلظت FBS (۱۰ درصد) اضافه گردید. فلاسک‌ها در انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت ۵ درصد CO_2 درصد انکوبه شدند. و هر دوازده ساعت یکی از چاهک‌های هشت گانه هر یک از گروه‌ها تریپسینه می شد و تعداد سلول‌ها شمارش می‌گردید و بعد از گذشت ۹۶ ساعت که کار شمارش آخرین فلاسک از گروه‌های سه گانه به اتمام رسید نتایج زمان دوبرابر شدن سلول‌ها تعیین گردید.

نتایج

شمارش تعداد سلول‌های فیبروبلاست: شمارش تعداد سلول‌های فیبروبلاست زنده جدا شده از هر نمونه جنینی در ابعاد ۵×۵ میلی‌متر از جنین جوجه‌های ۸ تا ۱۲ روزگی نشان داد که تعداد سلول‌های فیبروبلاست زنده در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و عملاً می‌توان از جنین روزهای هشتم تا دوازدهم برای جداسازی سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه استفاده نمود (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج جدا سازی سلول‌های فیبروبلاست از جنین های ۸ تا ۱۲ روزگی

سن جنین جوجه (روز)	تعداد سلول فیبروبلاست زنده جدا شده از هر نمونه به ابعاد ۵×۵ میلی‌متر از جنین							AVE	SDV	SEM
	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴	نمونه ۵	نمونه ۶	نمونه ۷			
هشتم	500×10^3	510×10^3	510×10^3	510×10^3	501×10^3	519×10^3	508×10^3	508427	6399	914
نهم	510×10^3	500×10^3	51×10^3	519×10^3	508×10^3	505×10^3	507×10^3	508429	5798	828
دهم	510×10^3	500×10^3	515×10^3	511×10^3	500×10^3	510×10^3	509×10^3	508500	6423	918
یازدهم	510×10^3	504×10^3	500×10^3	510×10^3	517×10^3	510×10^3	510×10^3	508457	4905	701
دوازدهم	500×10^3	512×10^3	510×10^3	499×10^3	512×10^3	510×10^3	516×10^3	508429	6425	918

AVE = میانگین هندسی، SDV = انحراف معیار و SEM = خطای میانگین استاندارد

نتایج بررسی میزان تکثیر فیبروبلاست‌ها در پاساژ چهارم در سه محیط کشت مختلف شامل محیط کشت‌های DMEM با گلوکز بالا، DMEM با گلوکز پایین و محیط کشت RMI1640 که تمامی محیط‌های کشت سلولی واجد ۵ درصد FBS بودند و با میزان ۵ درصد گاز CO_2 و رطوبت ۱۰۰ درصد انکوبه شده بودند، نشان داد که تعداد فیبروبلاست‌ها در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا تفاوت

معنی‌داری ($p<0.5$) با دو گروه DMEM با گلوگز پایین و محیط کشت RMI1640 دارد (جدول ۲). نتایج بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف FBS در رشد و تکثیر فیبروبلاست‌ها نشان دادکه غلظت ۱۰ درصد FBS بهترین و مناسب‌ترین غلظت FBS برای تکثیر سلول‌های فیبروبلاست می‌باشد (جدول ۳ و شکل ۱). شکل‌های ۲ تا ۴ نیز به ترتیب بیانگر بررسی زمان دوبرابر شدن فیبروبلاست‌ها در هر سه محیط کشت، بررسی میزان زنده ماندن سلول‌ها در محیط کشت با گلوگز بالا و پایین و بررسی میزان رشد سلول‌ها پس از انجماد در ازت می‌باشد.

جدول ۲. میانگین سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت های مختلف در پاساژ چهارم

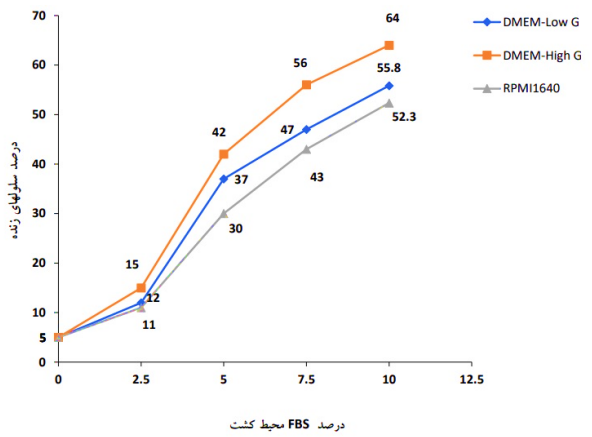
گروه‌ها	تعداد سلول ($\times ۱۰^{۵}$)	Ave	SDV	SEM	حداکثر	حداقل
DMEM-Low G-1	۵۶	۵۶	۱/۸	۰/۷۲	۵۹	۵۴
DMEM-Low G-2	۵۵					
DMEM-Low G-3	۵۷					
DMEM-Low G-4	۵۹					
DMEM-Low G-5	۵۴					
DMEM-Low G-6	۵۴					
DMEM-High G-1	۵۸	۵۸†	۱/۲	۰/۵۱	۶۰	۵۸
DMEM-High G-2	۵۷					
DMEM-High G-3	۶۰					
DMEM-High G-4	۵۷					
DMEM-High G-5	۶۰					
DMEM-High G-6	۵۸					
RPMI1640-1	۵۶	۵۵	۱/۸	۰.۷۳	۵۸	۵۲
RPMI1640-2	۵۵					
RPMI1640-3	۵۶					
RPMI1640-4	۵۸					
RPMI1640-5	۵۵					
RPMI1640-6	۵۲					

هر گروه شامل ۶ نمونه بوده و † بیانگر وجود تفاوت معنی‌داری ($p<0.05$) در تعداد سلول‌های فیبروبلاست بین گروه DMEM-High G با سایر گروه‌ها را نشان می‌دهد.

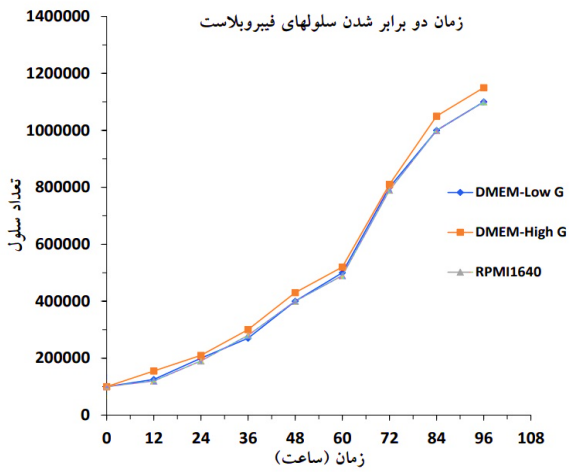
جدول ۳. تاثیر غلظت های مختلف FBS بر روی درصد زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت های مختلف در پاساژ اول

گروه‌ها	میزان FBS محیط کشت				
	۰%	**۲/۵%**	**۵%**	**۷/۵ %**	**۱۰%**
DMEM-Low G	۵	۱۲	۳۷€	۴۷	۵۵/۸
DMEM-High G	۵	۱۵	۴۲**†	۵۶**†	۶۴**†
RPMI1640	۵	۱۱	۳۰	۴۳	۵۲/۳

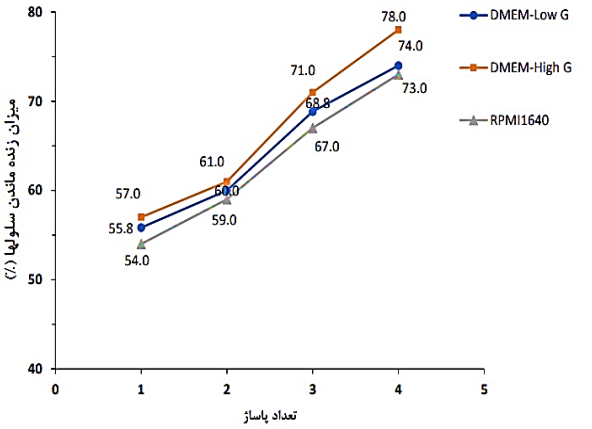
† بیانگر وجود تفاوت معنی دار با $P<0.05$ در مقایسه با گروه DMEM-Low G ، علامت ** نشاندهنده وجود تفاوت معنی‌دار با $P<0.01$ در مقایسه با گروه RPMI1640 و علامت € نشاندهنده وجود تفاوت معنی دار با $P<0.05$ در مقایسه با گروه RPMI1640 می‌باشد و تمامی آزمایش‌های در سه تکرار انجام گردیده است.



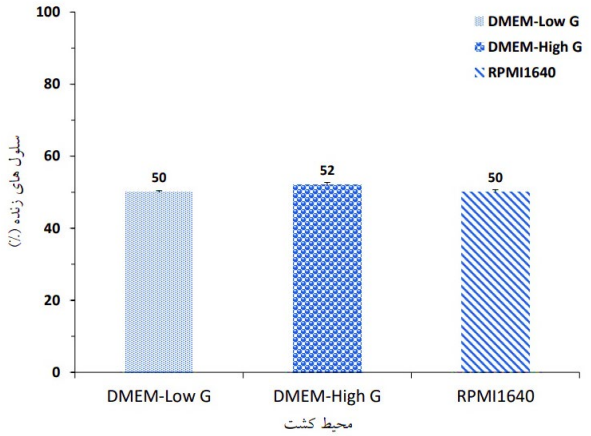
شکل ۱. بررسی درصد سلول‌های زنده فیبروبلاست به غلظت FBS در هر سه محیط کشت



شکل ۲. بررسی زمان دو برابر شدن فیبروبلاست‌ها در هر سه محیط کشت



شکل ۳. بررسی میزان بقای سلول‌های فیبروبلاست‌ها در هر سه محیط کشت



شکل ٤. بررسی میزان رشد و زنده‌مانی سلول‌های زنده فیبروبلاست پس از انجماد در ازت مایع

بحث

کشت سلولی فیبروبلاست جنین مرغ یک تکنیک آزمایشگاهی اساسی است که به طور گسترده در ویروس شناسی، واکسن شناسی، زیست شناسی مولکولی، میکروبیولوژی و همچنین در زمینه بیوتکنولوژی استفاده می شود (Farzaneh *et al.*, 2017). در این مطالعه آزمایشگاهی تاثیر سه محیط کشت مختلف شامل محیط کشت‌های DMEM با گلوکز بالا، DMEM با گلوکز پایین و RMI1640 با غلظت‌های مختلف FBS بصورت کنترل شده از نظر pH، سطح CO_2، دما، رطوبت و جریان O_2 در شرایط *in vivo* برای رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست جنین مرغ مورد بررسی قرار گرفتند.

جنین مرغ یا پرندگان دیگر مدل مناسبی برای مطالعات جنین شناسی، زیست شناسی رشد و تولید پروتئین های دارویی می‌باشد. علاوه بر این، سلول‌های بنیادی پرندگان فرصتی عالی برای تولید پرندگان تراریخته مبتنی بر سلول و همچنین منبع قدرتمندی از سلول‌ها برای تولید واکسن‌های مختلف ویروسی پرندگان مانند آنفلوانزا (Smitha *et al.*, 2008)، نیوکاسل (Shittu *et al.*, 2016)، سندرم کاهش تخم مرغ (Razmarai Iranagh *et al.*, 2023)و ...و همچنین بیماری‌های ویروسی انسانی مانند سرخک ، سرخچه و اوریون (Kowalzik *et al.*, 2018). را فراهم می‌آورد. علاوه بر این، تحقیقات در زمینه علوم بنیادی از جمله آزمایش حساسیت‌های دارویی، ردیابی سلولی و همچنین آزمایشات سمیت سلولی ارائه می‌نماید (Farzaneh *et al.*, 2017).

محیط کشت ترکیبی از مواد مغذی و بافر مختلف می‌باشد سلول‌ها برای رشد طبیعی به این مواد نیاز دارند محیط‌های کشت بر اساس انواع سلول‌ها مورد مطالعه می‌تواند متفاوت باشد. محیط کشت مهم ترین

معیار در تکنیک کشت سلولی می‌باشد و انتخاب مناسب برای نیل به هدف تحقیق ضروری است. محیط‌های کشت به دو دسته طبیعی و مصنوعی تقسیم می‌شوند. محیط کشت طبیعی از مواد بیولوژیکی مانند عصاره جنین، پلاسما و سرم عصاره های بافتی و عصاره های جنین مرغ، جگر، طحال و عصاره مغز استخوان تشکیل شده اند، همچنین مایعات بیولوژیکی مانند لنف، مایع آمنیوتیک و مایع جنب نیز به عنوان محیط کشت استفاده می‌شوند. محیط‌های کشت مصنوعی نیز حاوی محیط‌های پایه و مکمل‌ها، سرم‌های مختلف، فاکتورهای رشد و هورمون های مختلف می‌باشند (Yao and Asayama, 2017; Hekmat *et al.*, 2021).

فیبروبلاست‌ها از فراوان‌ترین سلول‌های بافت همبند هستند و می‌توانند انواع رشته‌های بافت همبند و مواد آلی ماده زمینه‌ای را تولید نمایند. این سلول‌ها دارای هسته بیضوی و روشن و کروماتین ظریف، غالبا یک یا دو هستک واضح و ارگانهای دخیل در پروتئین سازی بصورت گسترده می‌باشند. در مواردی که فعالیت سلول کاهش می‌یابد، اندازه سلول کوچکتر شده و هسته آن پر رنگ و بصورت دوکی شکل دیده می‌شود که در این حالت فیبروسیت نیز می‌نامند. فیبروسیتها درصورت تحریک قابل برگشت به حال فعال می‌باشند (LeBleu and Neilson, 2020). اطلاعات زمینه‌ای در مورد فیبروبلاست و فیبروسیت نشان می دهد هر دو، در حقیقت یک نوع سلول می‌باشند، منتهی بسته به نوع و میزان سوخت و ساز بافتی، ممکن است بصورت فعال شده یعنی فیبروبلاست یا واجد فعالیت کمتر یعنی فیبروسیت دیده شوند. در سالهای اخیر، عقیده بر این است که هر دو نوع فیبروبلاست نامیده شوند. پسوند بلاست در زیست شناسی سلولی به سلول بنیادی یا سلولی که از نظر سوخت و ساز فعال است گفته می‌شود (LeBleu and Neilson, 2020). فیبروبلاست‌ها بسته به محل استقرار و میزان فعالیت، به اشکال مختلفی دیده شوند. فیبروبلاست‌هایی متعلق به بافتهای دیگر، اگر به بافت جدیدی پیوند زده شوند تا چندین نسل خاطرات مربوط به بافتی را که به آن تعلق داشته اند را حفظ خواهند کرد اگر چه ممکن است از نظر ریخت شناسی این تغییرات محسوس نباشد. منشا جنینی عملکرد اصلی فیبروبلاستها ترشح مواد پیش ساز ماتریکس برون سلولی برای حفظ انسجام ساختاری بافت همبندی می باشد. فیبروبلاستها پیش سازهای لازم برای ساخت کلیه ترکیبات ماتریکس برون سلولی از جمله ماده زمینه ای و رشته های آن را ترشح می نمایند. مانند سایر سلولهای بافت همبندی فیبروبلاستها نیز از مزانشیم مشتق شده اند. بنابراین پروتئین فیلامنتی واسط بنام ویمنتین را ترشح می‌کنند که بعنوان یک شاخص برای شناسایی منشا مزودرمی (میان پوستی) آنها بکار می‌رود (Blakaj and Bucala, 2012).

سلولهای اپی تلیال تحت شرایطی تحت روند " تبدیل اپیتلیومی-مزانشیمی"(Epithelial-mesenchymal transition(EMT قادر هستند به فیبروبلاست‌ها تبدیل شوند. و برعکس فیبروبلاست‌ها نیز قادرند تحت شرایطی به سلولهای اپی تلیال تبدیل شوند. که این روند بنام "تبدیل مزانشیمی –اپیتلیومی" Mesenchymal-epithelial transition(MET) نامیده می‌شود. فیبروبلاستها دارای سیتوپلاسمی منشعب می باشند که یک هسته بیضی شکل لکه دار دارای ۱-۲ هستک را احاطه نموده است. فیبروبلاستهای فعال بواسطه شبکه اندوپلاسمیک خشن گسترده خود شناخته می شوند. فیبروبلاستهای غیرفعال که فیبروسیت نیز نامیده می شوند کوچکتر و دوکی شکل می باشند. شبکه اندوپلاسمیک خشن آنها گستردگی کمی دارد. اگرچه فیبروبلاستهادر یک سطح بزرگ بصورت پراکنده و جدا از هم قرار می گیرند ولی درصورت تراکم زیاد آرایشی بشکل خوشه های موازی بخود می گیرند. فیبروبلاست‌ها کلاژنها، گلیکوزآمینوکلیکانها، فیبرهای مشبک و ارتجاعی و گلیکوپروتئینهای موجود در ماترکس برون سلولی و سیتوکین TSLP را می‌سازند (Alberts, 2017).

فیبروبلاست‌های در حال رشد، تقسیم شده و ماده زمینه‌ای را می‌سازند. آسیب‌های وارده به بافت فیبروبلاست‌ها را تحریک کرده و تقسیم میتوز را القا می‌نماید. بر خلاف سلول‌های اپی تلیال، فیبروبلاست‌ها تک لایه های سلولی پهن تشکیل نداده و با اتصال تک قطبی از یک طرف به لایه بازال محدود نشده اند، دارای توانایی مهاجرت انفرادی در لایه ساب استراتوم بوده و نمای بیرونی موجود زنده را شکل می‌دهند. اگرچه فیبروبلاست ها در برخی مواقع در تشکیل لایه بازال مشارکت دارند(مثلاً میوفیبروبلاست‌ها در روده که زنجیره - ۲ α حامل اجزای لامینین را ترشح می‌کنند و فقط در اپیتلیوم نواحی مربوط به فولیکول‌ها حضور ندارند). (Lana *et al.*, 2013).

طول عمر فیبروبلاست که در جنین مرغ اندازه گیری شده است، ۳±۵۷ روز می‌باشد. فیبروبلاست های اولیه جدا شده از بافت دارای مزایای منحصر به فرد بسیاری برای استفاده به عنوان سلول‌های تغذیه کننده برای متابولیسم بافت حیوانی در طول رشد جنین هستند، اما ممکن است به دلیل همسانی کم و تکثیر ناپایدار، چندین اثر نامطلوب بر آزمایش‌های دیگر داشته باشند. این نوع سلول اغلب برای انتقال ژن، تکثیر ویروس‌های مختلف و یا آزمایش های دارویی به عنوان سلول‌های هدف مورد استفاده قرار می‌گیرند (Weissman-Shomer and Fry, 1975).

بسیاری از خطوط سلولی پیوسته فیبروبلاستی، نظیر T۳۳، STO، DF-1، و غیره برای تکثیر پایدار ایجاد شده‌اند و هنوز نمی‌توانند از سلول‌های متفرقه به دلیل منشاء پلی کلونال آن اجتناب کنند. لذا برای رفع این مشکل، بسیاری از تحقیقات از یک سلول برای ایجاد خطوط سلولی با همسانی بسیار بالا تحت عنوان رده سلولی تک کلون شده استفاده می‌کنند (Zhao *et al.*, 2018).

نتایج مطالعه ما بوضوح نشان داد که جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا و با ۱۰ درصد FBS سطح کارایی بالاتری نسبت به محیط‌های کشت DMEM با گلوکز پایین و RPMI1640 با ۱۰ درصد FBS را دارد. این نتایج همسو با مطالعات سان چانگو (Sun *et al.*, 2019) در سال ۲۰۱۸ و کانگ (Kong *et al.*, 2013) در سال ۲۰۱۳ می‌باشد که در مطالعاتشان برای جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه از محیط کشت DMEM با گلوکز بالا و با ۱۰ درصد FBS استفاده نموده بودند. همچنین ارب (Erb *et al.*, 2016) و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که محیط کشت DMEM با گلوکز بالا و با ۵ درصد سرم گوساله غیر فعال شده توسط حرارت نیز می‌تواند برای جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه مورد استفاده قرار گیرد. اینتراپت (Intarapat and Stern, 2013) و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که از محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد FBS می‌توان برای جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه استفاده نمود.

مطالعه آزمیر و همکاران در سال ۲۰۰۹ با انجام یک سری فرآیند بهینه سازی با آزمایش آن بر روی چندین محیط کشت و همچنین با دستکاری اجزای محیط کشت که بی کربنات سدیم و سرم بودند، نشان داد که رده سلول فیبروبلاستی جنین جوجه DF-1 در محیط کشت DMEM دارای بالاترین تراکم کشت سلولی و کمترین زمان دو برابر شدن را به خود اختصاص داده و مشخصات رشد رده سلولی DF-1 مورد بررسی قرار گرفت (Arifin *et al.*, 2008).

همچنین مطالعات پارک (Park and Han, 2000) و همکاران درسال ۲۰۰۰، شی یو (Shiue *et al.*, 2009) همکاران در سال ۲۰۱۸ نیز نشان داند که با استفاده از محیط کشت DMEM با۱۰ درصد FBS می‌تواند محیط مناسبی برای جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه را فراهم آورد.، ویو و همکاران (Wu *et al.*, 2010) و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز با استفاده از محیط کشت DMEM و ۵ درصد FBS توانستند جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه را انجام دهند.

مس و همکاران (Maas *et al.*, 2006) و همکاران در سال ۲۰۰۶ از محیط کشت DMEM و ۵ درصد FBS برای تکثیر لاین سلولی DF-1 (سلول فیبروبلاست جنین جوجه) استفاده نمودند ولی برای جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه از محیط کشت GMEM/EMEM با ۵ درصد سرم گوساله استفاده نمودند.

ویو و همکاران (Wu *et al.*, 2009) و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که محیط کشت DMEM موجب تحریک فعالیت آلکالین فسفاتاز، رسوب ترکیبات معدنی در ماتریکس و افزایش چشمگیر تمایز استخوان زایی در مقایسه با RPMI 1640 در سلول‌های مشتق شده از لایه پریستوم سگ می شود. بنابراین، می توان مشخص کرد که DMEM به عنوان یک محرک در محیط کشت عمل کرده و که اجازه تمایز استخوانی به سلول‌های پریستوم سگ را می دهد.

بررسی زمان دو برابر شدن سلول‌های فیبرو بلاست در سه محیط کشت مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. نتایج مطالعه جان-شان (Jun-Shun *et al.*, 2007) و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که زمان دو برابر شدن سلول‌های فیبروبلاست گوش آهوی نژاد مونتجاک سیاه به ترتیب در محیط DMEM (گلوکز پایین)، DMEM (گلوکز بالا) و RPMI-1640 کشت داده شده بودند که مشابه نتایج مطالعه ما بود ولی قسمت دوم نتایج آنها که نشان دهنده رشد سلولی بهتر سلول‌های فیبرو بلاست در محیط کشت DMEM با گلوکز پایین بود در حالیکه نتایج مطالعه ما رشد سلولی بیشتر سلول‌های فیبروبلاست در DMEM با گلوکز بالا را نشان می‌داد که با نتایج مطالعه ما متفاوت بود و علت این تفاوت می‌تواند مربوط به تفاوت گونه‌ای حیوانات تحت آزمایش در دو مطالعه باشد.

بای و همکاران (Bai *et al.*, 2011) و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که با استفاده از محیط کشت MEM با ۱۰ درصد FBS می‌توان عمل جدا سازی و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه را انجام داد و در ادامه با استفاده از این محیط کشت خط سلولی جدیدی را برای سلول‌های فیبروبلاست جنین تولید نمایند. مطالعه وو ایکس (Zhang *et al.*, 2018) و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داد که محیط کشت Ham F12 برای رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه مناسب تر از محیط‌های کشت DMEM و D/F12 می-باشد و دلیل احتمالی این نتایج می‌تواند وجود انواع بیشتری از اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و عناصر کمیاب ضروری برای تامین نیازهای رشد تک کلون‌های فیبروبلاست جنین جوجه در محیط کشت Ham F12 باشد در حالیکه محیط کشت DMEM با گلوکز بالا محیطی است که برای کشت معمولی فیبروبلاست جنین جوجه استفاده می‌شود و حاوی مواد ضروری برای رشد طبیعی آنها است. با این حال، مواد مغذی مورد نیاز برای کشت سلول تک فیبروبلاست با آنچه که به طور معمول مورد نیاز است متفاوت است. همچنین مطالعه کاتایاما (Katayama *et al.*, 2021) و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان داد که آسیب DNA در فیبروبلاست‌های کشت‌شده در محیط کشت KAv-1 در مقایسه با محیط‌های کشت DMEM و ۱۹۹ کمتر بوده و این سلول‌ها نیز پویایی رشد بهبود یافته‌ای را در محیط کشت KAv-1 در مقایسه با محیط‌های کشت DMEM را ۱۹۹ نشان داد.

در این مطالعه، دریافت شد که که غلظت ۱۰ درصد FBS در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا بهترین شرایط را برای رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه فراهم می‌آورد و علت احتمالی آن می‌تواند به دلیل ترکیبات و مکمل‌های مغذی موجود در محیط کشت

سلولی باشد مونوکلونال CEF یک مرجع روش شناختی برای ایجاد فیبروبلاست‌های بیشتر جنینی مانند اردک و غاز فراهم می‌کند (Zhao *et al.*, 2018).

مزایای فیبروبلاست‌های جنینی مرغ شامل زنده‌مانی زیاد و خلوص بالا، دسترسی آسان، احتمال کم آلودگی باکتریایی و چسبندگی قوی به سطح ظرف کشت سلولی می‌باشد و به دلیل تحمل متفاوت سلول‌های فیبروبلاست و اپیتلیال در برابر تریپسینیزاسیون براحتی می‌توان سلول‌های اپیتلیال همراه سلول‌های فیبروبلاست را حذف نمود زیرا سلول‌های فیبروبلاست هنگام هضم با تریپسین زودتر از فلاسک‌ها جدا می‌شوند و پس از عبور دوباره به سرعت به کف فلاسک‌ها می‌چسبند، درحالی که سلول‌های اپیتلیال به سختی به کف فلاسک‌ها می‌چسبنداتصال ناپایداری دارند و هنگام ارتعاش از سطح جدا می شوند. لذا پس از ۲-۳ پاساژ می‌توان یک خط فیبروبلاست خالص بدست آورد (Bai *et al.*, 2011). ویژگی‌های بیولوژیکی و ژنتیکی این سلول‌ها طی کشت‌های آزمایشگاهی پس از چندین پاساژ تغییر نماید، بنابراین حداقل تعداد پاساژها برای محافظت از رده‌های سلولی در برابر انحطاط توصیه می‌شود.

نتایج مطالعه تونگ (Thong *et al.*, 2006) و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد که بازسازی سه نسل بعدی کراتینوسیت‌های کشت داده شده در محیط کشت DMEM بسیار سریعتر از محیط کشت RPMI-1640 انجام می‌شود و میکروبافت‌ها سریعتر با یکدیگر ادغام شده و کلنی‌های بزرگ‌تری از ریز بافت‌ها را روی بستر تشکیل می‌دهند. محتوای بالاتر اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها در موجود در محیط کشت DMEM ممکن است این سلول‌ها را قادر به ترشح پروتئین و تامین انرژی برای چسبندگی بیشتر تامین نماید، که احتمالاً از بازسازی سه بعدی کراتینوسیت‌ها پشتیبانی می‌کند. این نتایج بوضوح نشان داد که تغییر محیط‌های کشت سلولی می‌تواند به شدت بر ویژگی‌های کشت‌های سلولی تاثیر بگذارد.

انتخاب محیط بسیار مهم است و به نوع و کاربرد سلول‌ها بستگی دارد. این معمولاً توسط چیزی ساخته می شود که قبلاً توسط دیگران در ادبیات برای همان سلول‌ها استفاده می‌شد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه یک سیستم جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست اولیه جنین اردک را توصیف می‌کند. که می‌تواند در امر تحقیقات پایه، آزمایش اثرات مختلف ترکیبات شیمیایی و دارویی و همچنین کشت انواع ویروس‌ها مورداستفاده قرار گیرد. همچنین کشت سلول دارای مزایای متعددی شامل مقرون به‌صرفه‌تر بودن، سرعت‌بالای تولید، نیاز کمتر به پرسنل، در دسترس بودن، فاقد عوارض ایجاد حساسیت‌زایی می‌باشد و در صورت تبدیل این سلول‌ها به رده سلولی می‌تواند به ابزار بسیار کارا در امر تحقیقات و پژوهش و همچنین تولید داروها و واکسن‌های مختلف ویروسی تبدیل گردد بنابر این بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که استفاده از محیط کشت DMEM با گلوکز بالا که توسط ۱۰ درصد FBS غنی شده یک روش مناسب برای جداسازی و تکثیر رده فیبروبلاستی جنین جوجه جهت استفاده در امور تحقیقات دارویی و سموم، تولید واکسن‌های ویروسی و تهیه آنتی‌ژن‌های مختلف و همچنین انجام طیف وسیعی از تحقیقات علوم زیستی مورداستفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمالغرب کشور جهت همکاری در انجام این تحقیق تقدیر وتشکر می‌گردد..

مراجع

Alberts, B. 2017. Molecular biology of the cell. Garland science.

Arifin, M.A., Mel, M., Raus, R.A., SharifahS., H. and Ideris, A. 2008. Comparison of growth rate and viability of df-1 cell line in different culture media.

Aubel, P. and Pain, B. 2013. Chicken embryonic stem cells: Establishment and characterization. Epiblast Stem Cells: Methods and Protocols: 137-150.

Bai, C., Wang, D., Li, C., Jin, D., Guan, W. and Ma, Y. 2011. Establishment and biological characteristics of a jingning chicken embryonic fibroblast bank. European journal of histochemistry: EJH, 55.(۱)

Blakaj, A. and Bucala, R. 2012. Fibrocytes in health and disease. In: Fibrogenesis & tissue repair. BioMed Central: pp: 1-4.

Erb, M., Camacho, D., Xie, W., Maslikowski, B., Fielding, B., Ghosh, R., Poujade, F.-A., Athar, M., Assee, S. and Mantella, L.-E. 2016. Extracellular signal-regulated kinase 2 and chop restrict the expression of the growth arrest-specific p20k lipocalin gene to g0. Molecular and Cellular Biology, 36(23): 2890-2902.

Evans, M.J. and Kaufman, M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. nature, 292(5819): 154-156.

Farzaneh, M., Attari, F., Mozdziak, P. and Khoshnam, S. 2017. The evolution of chicken stem cell culture methods. British poultry science, 58(6): 681-686.

Han, J.Y., Lee, H.C. and Park, T.S. 2015. Germline-competent stem cell in avian species and its application. Asian Journal of Andrology, 17(3): 421.

Hekmat, A., Hatamie, S. and Bakhshi, E. 2021. Probing the effects of synthesized silver nanowire/reduced graphene oxide composites on the structure and esterase-like activity of human serum albumin and its impacts on human endometrial stem cells: A new platform in nanomedicine. Nanomedicine Journal, 8.(۱)

Iannaccone, P.M., Taborn ,G.U., Garton, R.L., Caplice, M.D. and Brenin, D.R. 1994. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. Developmental biology, 163(1): 288-292.

Intarapat, S. and Stern, C.D. 2013. Chick stem cells: Current progress and future prospects. Stem Cell Research, 11(3): 1378-1392.

Jun-Shun, F., Yong, T., Mei-Ling, Z., Jian-Ming, L., Wei, H., Zhi-Zhong, Z. and Xiao-Rong, Z. 2007. Black muntjac fibroblast cell culture and interspecies embryo reconstruction in vitro. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 4(2): 157-162.

Katayama, M., Onuma, M. and Fukuda, T. 2021. Kav-1 is better suited to chick fibroblast culture than dmem or 199 media. The journal of poultry science, 58(4): 270-279.

Khiabani, N., Hekmat, A. and Banaei ,A. Synthesis and characterization of amyloid beta-lactoglobulin-mumijo-nanohydroxyapatite complex: A new composite for bone regeneration. Trends in Peptide and Protein Sciences, 8(1): 1-10 (e14).

Kong, B.-W., Lee, J., Bottje, W.G., Lassiter, K., Lee, J ,. Gentles, L.E., Chandra, Y.G. and Foster, D.N. 2013. Microarray analysis of early and late passage chicken embryo fibroblast cells. Poultry science, 92(3): 770-781.

Kowalzik, F., Faber, J. and Knuf, M. 2018. Mmr and mmrv vaccines. Vaccine, 36(36): 5402-540.۷

Lana, J.F.S.D., Santana, M.H.A., Belangero, W.D. and Luzo, A.C.M. 2013. Platelet-rich plasma: Regenerative medicine: Sports medicine, orthopedic, and recovery of musculoskeletal injuries. Springer Science & Business Media.

LeBleu, V.S. and Neilson, E.G .۲۰۲۰ .Origin and functional heterogeneity of fibroblasts. The FASEB Journal, 34(3): 3519-3536.

Lin, J., Yi, X. and Zhuang, Y. 2019. Medium optimization based on comparative metabolomic analysis of chicken embryo fibroblast df-1 cells. RSC advances, 9(47 :(.۲۷۳۷۷-۲۷۳۶۹

López-Díaz, M.C., Buján-Varela, J. and Cadórniga-Valiño, C. 2016. Viable pluripotent chick blastodermal cells can be maintained long term in an alkaline defined medium. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 52: 385-394.

Maas, R ,.van Zoelen, D., Oei, H. and Claassen, I. 2006. Replacement of primary chicken embryonic fibroblasts (cef) by the df-1 cell line for detection of avian leucosis viruses. Biologicals, 34(3): 177-181.

Park, T.S. and Han, J.Y. 2000. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 56(4): 475-482.

Razmarai Iranagh, A., Razmaraii, N., Aghaei, R., Shayegh, J., Mousaviyan, M. and Ameghi Roudsary, A. 2023. Study on propagation and adaptation of eds-76 avian adenovirus in duck and spf primary embryonic chicken cell culture comparison to duck and spf embryonated chicken eggs. Archives of Razi Institute, 78(3): 1095-1105.

Shittu, I., Zhu, Z., Lu, Y., Hutcheson, J.M., Stice, S.L., West, F.D., Donadeu, M., Dungu, B., Fadly, A.M. and Zavala, G. 2016. Development, characterization and optimization of a new suspension chicken-induced pluripotent cell line for the production of newcastle disease vaccine. Biologicals, 44.۳۲-۲٤ :(۱)

Shiue, Y.L., Tailiu, J.J., Liou, J.F., Lu, H.T., Tai, C., Shiau, J.W. and Chen, L.R. 2009. Establishment of the long-term in vitro culture system for chicken primordial germ cells. Reproduction in Domestic Animals, 44(1): 55-61.

Smitha, K.A ,.Colvina, C.J., Webera, P.S., Spatzb, S.J. and Coussensa, P.M. 2008. High titer growth of human and avian influenza viruses in an immortalized chick embryo cell line without the need for exogenous proteases. Vaccine, 26: 3778-3782.

Sun, C., Wang, Y., Jin ,K., Song, J., Zuo, Q., Zhang, Y., Chen, G. and Li, B. 2019. Study on immortal conditions of chicken embryonic stem cells. Journal of Cellular Biochemistry, 120(2): 1376-1385.

Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A. and Hearn, J.P. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(17): 7844-7848.

Thong, K.T., Ismail, A.B., Basri, H., Tee, K.S. and Soon, C.F. 2006. The effects of culture substrates and media to the behavior of microtissues.

Weissman-Shomer, P. and Fry, M. 1975. Chick embryo fibroblasts senescence in vitro: Pattern of cell division and life span as a function of cell density. Mechanisms of ageing and development, 4: 159-166.

Wu, X., Lin, M., Li, Y., Zhao, X. and Yan, F. 2009. Effects of dmem and rpmi 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells. Cytotechnology, 59: 103-111.

Wu, Y., Ge, C., Zeng, W. and Zhang, C. 2010. Induced multilineage differentiation of chicken embryonic germ cells via embryoid body formation. Stem cells and development, 19(2): 195-202.

Xiong, C., Wang, M., Ling, W., Xie, D., Chu, X., Li, Y., Huang, Y., Li, T., Otieno, E. and Qiu, X. 2020. Advances in isolation and culture of chicken embryonic stem cells in vitro. Cellular reprogramming, 22(2): 43-54.

Yao, T. and Asayama, Y. 2017. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. Reproductive medicine and biology, 16(2): 99-117.

Zhang, L., Wu, Y., Li, X., Wei, S., Xing, Y., Lian, Z .and Han, H. 2018. An alternative method for long-term culture of chicken embryonic stem cell in vitro. Stem Cells International, 2018.

Zhao, R., Jin, J., Sun, X., Jin, K., Wang, M., Ahmed, M.F., Zuo, Q., Zhang, Y., Zhao, Z. and Chen, G. 2018. The establishment of clonally derived chicken embryonic fibroblast cell line (csc) with high transfection efficiency and ability as a feeder cell. Journal of Cellular Biochemistry, 119(11): 8841-8850.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 3, Issue 2, 2022 Pages 9-18

Article

The Isolation, propagation, and optimization of SPF egg fibroblast cell culture

Mohamad Mahdi Ramezani[1], Ali Ashar Razmaraei Iranagh[1], Reaza Aghaei[1], and Nasser Razmaraii[2,*]

[1] East Azerbaijan, Shabestar, Islamic Azad University, Iran
[2.] East Azarbaijan, Marand, Razi vaccine and serum research institute, northwestern branch, Iran

*Correspondence to Pejman Mortazavi, Ph.D., nasserrazmaraii@gmail.com

Received 10th May 2021 Revised 4th August 2022 Accepted 09th September 2022

Abstracts

Introduction and aim: Cultured poultry cells can provide a valuable resource for various researchers in the field of pharmaceutical studies, the culture of poultry and human viruses, as well as the production of viral vaccines. Avian cell culture requires an optimal basic medium and currently, there are limited options for this basic medium. This means that there is still room to improve an optimal basal medium for avian cell culture.

Methods: In this study, fibroblast cells were isolated from SPF chickens and the growth and proliferation of fibroblast cells were done in three culture mediums: DMEM with high glucose, DMEM with low glucose, and RMI1640 culture medium enriched with different concentrations of fetal calf serum (FBS), were evaluated.

Results: The results of this study showed that there is a significant difference in the growth and proliferation of fibroblasts cultured in DMEM culture medium with high glucose enriched with 10% FBS compared to DMEM culture medium with low glucose and RMI1640 culture medium enriched with 10% FBS. There were ($p<0.05$). However, no significant difference was observed in the doubling time of these cells in three culture media.

Conclusion: These results show that it is easy to isolate chicken embryo fibroblast cells in the laboratory and provide the necessary conditions for the growth and proliferation of these cells by using a DMEM culture medium with high glucose enriched with 10% FBS. The results of this study can be used by researchers in various pharmaceutical and virological research and the production of poultry viral vaccines.

Keywords: Cell culture, Chick Emberio Fibroblast, DMEM, RPMI1640, SPF