

# تأثیر مکمل‌های کروم و اسید آلفا لیپوئیک بر تکثیر، بقا، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و پاسخ ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه تحت تنش حرارتی

حدیث میرزایی<sup>۱</sup>، علی آقائی<sup>۱\*</sup>، الهام حویزی<sup>۲</sup> و محمود نظری<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> ایران، ملاتانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، گروه علوم دامی

<sup>۲</sup> ایران، اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۴

## چکیده

زمینه و هدف: تأثیر همزمان مکمل‌های کروم و اسید آلفا لیپوئیک بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان (BMSCs) تاکنون مشخص نشده است. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر مکمل‌های کروم و اسید آلفا لیپوئیک بر تکثیر و بقا BMSCs جوجه گوشتی، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و پاسخ ایمنی سلول‌های کشت شده تحت تنش حرارتی طراحی شده است. BMSCs از جوجه یک‌روزه نژاد راس ۳۰۸ جدا و با بیان نشانگرهای سطحی با استفاده از فلوسایتومتری تایید شدند. گروه‌های آزمایشی شامل: سلول‌های بدون هیچ‌گونه تیماری، سلول‌هایی که دچار تنش حرارتی شدند، سلول‌های تحت تنش حرارتی تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و ۱۰۰ میکرومولار اسید آلفا لیپوئیک بصورت جداگانه و هم‌زمان. سپس، BMSCs از لحاظ مورفولوژی، بقا، سنجش فاکتورهای آنتی‌اکسیدان و میزان بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی مقایسه شدند. سلول‌های جدا شده از نظر ریخت‌شناسی، فیروپلاستی بودند و با استفاده از فلوسایتومتری و پتانسیل تمایزی تعیین هویت شدند. بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، GPX و TAC در گروه اسید آلفا لیپوئیک تحت تنش حرارتی مشاهده شد و برترتیب در گروه سلول‌های تیمار شده هم‌زمان ۴۵/۵۸ واحد بر میلی‌لیتر، ۱۱/۶۴، ۳۷/۲۲ و ۰/۴۵ واحد بر میلی‌گرم ارزیابی شد که در مقایسه با سایر گروه‌ها بطور معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) تغییر داشت. بیان IL-2، IL-6 و INF- $\gamma$  برترتیب در گروه تیمار هم‌زمان ۰/۹۷، ۰/۶۷ و ۲ ارزیابی شد که در مقایسه با سایر گروه‌ها تغییر معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) مشاهده شد. نتایج نشان داد که استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش حرارتی سبب بهبود پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اسید آلفا لیپوئیک، کروم، پاسخ ایمنی، وضعیت آنتی‌اکسیدانی.

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: [aghaei@asnruk.ac.ir](mailto:aghaei@asnruk.ac.ir)

## مقدمه

سپس به‌وسیله محققین دیگر (۱۴) بر اساس چسبندگی آن‌ها به سطح کشت جدا شدند. با توجه به ویژگی‌های مطلوب، محققین سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به‌عنوان منبع مناسبی برای استفاده در پژوهش‌های حیاتی و در زمینه‌های درمانی می‌دانند (۴). از جمله عوامل مهم و تأثیرگذار بر روند تکوین و زنده‌مانی سلول‌ها و به‌طبع موجودات زنده می‌توان به تنش‌های دمایی اشاره کرد. تنش

مغز استخوان بافت پیچیده‌ای شامل سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌توانند انواع سلول‌های خونی را ایجاد کنند و سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز توانایی تولید انواع دودمان‌های بافت همبند از قبیل: غضروف، استخوان و چربی را دارند (۳۰، ۱۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمی اولین بار به‌وسیله فریدنستین و همکاران در سال ۱۹۹۲ و

دوزهای بالا،  $\alpha$ -LA مجموعه‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی خاص را با ارزش دارویی بالقوه در برابر طیف بسیار گسترده‌ای از شرایط پیش پاتولوژیک و پاتوفیزیولوژیک نشان می‌دهد (۲۹).

استفاده از  $\alpha$ -LA باعث افزایش فعالیت SOD و کاهش فعالیت CAT در بافت معده موش صحرایی شد (۲۳). استفاده از غلظت‌های پایین (میکرومولار تا میلی‌مولار)،  $\alpha$ -LA برای سلول‌های سرطانی کشت شده نشان داد که باعث القا آپوپتوز، فعالیت آنتی‌اکسیدان، آزاد شدن  $H_2O_2$  و تحریک مکانیسم‌های پاسخ به تنش می‌شود. همچنین مکمل  $\alpha$ -LA بعنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کرده و وضعیت تنش اکسیداتیو را در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی بهبود می‌بخشد. علاوه بر این،  $\alpha$ -LA دارای خواص ضدالتهابی است و افزودن آن به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی بیان ژن‌های مرتبط با التهاب طحال را بهبود می‌بخشد (۲۷). همچنین نشان داده شده است که  $\alpha$ -LA می‌تواند آزادسازی سیتوکین‌های مختلف از جمله  $TNF\alpha$  و IL-6 را مهار کند (۲۷). کوبان و همکاران (۲۰۱۷)، گزارش کردند که  $\alpha$ -LA و DHLA قادر به کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطان سینه به روشی وابسته به غلظت هستند (۲۶). جوریرو و همکاران (۲۰۱۱)، نشان دادند که اسید آلفا لیپوئیک، کافئیک اسید و اسید S-۲-لیپویل-کافئیک باعث کاهش سیتوکین‌های پیش التهابی مانند  $TNF-\alpha$ ، IL-1 $\beta$  و IL-8 و افزایش سیتوکین‌های ضدالتهابی مانند IL-10 می‌شوند (۱۶). گزارش‌های مختلف نشان می‌دهند که اسید آلفا لیپوئیک و کافئیک اسید به روشی وابسته به دوز فعال‌سازی NF-kB ناشی از  $TNF-\alpha$  را هم در سلول‌های بافتی U937 انسان و هم در سلول‌های اندوتلیال آئورت انسان مهار می‌کنند (۴۰). کاهش IL-8 پس از درمان سلول‌های HepG2 و Huh7 با لیپوئیک اسید، کافئیک اسید و اسید S-۲-لیپویل-کافئیک به دست آمد، نشان می‌دهد که می‌تواند از تهاجم تومور جلوگیری کند. گزارش شده

گرمایی یکی از مهم‌ترین عوامل تنش‌زای محیطی است، که باعث عملکرد ضعیف، عدم تعادل سیستم اکسیدان/آنتی‌اکسیدان، وضعیت ایمنی و سلامتی در سلول‌ها و بافت‌های طیور می‌شود. همچنین، تنش گرمایی باعث ترشح کورتیکواسترون و کاتکول آمین‌ها و آغاز پراکسیداسیون لیپید در غشای سلولی می‌شود (۳۳). علاوه بر این، تنش گرمایی از طریق ترشح نشانگرهای التهابی مانند اینترلوکین ۶ (IL-6)، پروتئین واکنش پذیر C (CRP) و فاکتور غده بافت‌های مرده آلفا ( $TNF-\alpha$ ) باعث برهم خوردن وضعیت آنتی‌اکسیدان می‌شود (۱۸). پیشرفت‌های اخیر در زمینه بیوتکنولوژی، کشف اثرات تنش گرمایی بر سطوح مولکولی را ممکن ساخته است (۳۵، ۱۸). ارزیابی بیان ژن بینشی در مورد چگونگی واکنش سلول‌ها به تنش گرمایی ارائه می‌دهد. از این‌رو، شناسایی رویکردهای برای بهبود اثرات تنش گرمایی بر سلامت و تولید طیور اخیراً مورد توجه قرار گرفته است (۲۴). روش‌های مختلفی برای کاهش اثرات مضر تنش گرمایی بر وضعیت سلامت بافت طیور در دسترس است، مانند استفاده از افزودنی‌های خوراکی از جمله روش‌های رایج و اقتصادی می‌باشند (۱۱، ۱). در این میان اسید آلفا لیپوئیک ( $\alpha$ -LA) یا ۱،۲-dithiolane-3-pentanoic acid یک ترکیب دیتیول طبیعی است که بصورت آنزیمی در میتوکندری از اسید اکتانوئیک سنتز می‌شود و نقش مهمی در متابولیسم انرژی میتوکندری دارد. در داخل سلول‌ها به دو شکل مختلف اکسید شده ( $\alpha$ -LA) و احیا شده (دی هیدرولیپوئیک اسید، DHLA) وجود دارد.  $\alpha$ -LA محلول در آب و چربی است، بنابراین بطور گسترده‌ای در گیاهان و حیوانات جذب شده و از طریق غشای سلولی و سیتوزول منتقل می‌شود (۱۳). در شرایط تنش  $\alpha$ -LA مستقیماً از طریق رفع رادیکال‌های آزاد، تشکیل باند با فلزات و بطور غیرمستقیم از طریق بازیافت سایر آنتی‌اکسیدان‌های سلولی مانند گلوکاتیون، آسکوربات و ویتامین E به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند (۲۹). در

است  $\alpha$ -LA سمیت عصبی ناشی از مس را در کشت‌های سلولی کاهش می‌دهد (۳۶).

از دیگر افزودنی‌های خوراکی جیره طیور می‌توان به کروم (Cr) اشاره کرد که یک عنصر معدنی ضروری است، این عنصر و نمک‌های آن کاربردهای گسترده‌ای در تغذیه و صنایع مختلف دارد (۳۲). کروم سه ظرفیتی Cr (III) پایدارترین شکل در عرضه مواد غذایی و در داخل بدن است (۳۲). کروم برای متابولیسم کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و پروتئین‌ها در پرندگان ضروری می‌باشد، زیرا یک جز فعال فاکتور تحمل گلوکز را تشکیل می‌دهد، که باعث تأثیر متابولیکی انسولین می‌شود (۳۲). استفاده از کروم در اثر عواملی که معمولاً عامل تنش‌زا نامیده می‌شوند، به‌ویژه در هنگام فشارهای مختلف تغذیه‌ای، متابولیکی و جسمی در حال افزایش است. آزمایشات مختلف نشان داده‌اند که مکمل غذایی کروم می‌تواند اثرات مخرب تنش گرمایی در طیور را کاهش دهد (۳۴). کروم می‌تواند از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود از پراکسیداسیون لیپید ناشی از تنش گرمایی جلوگیری کند، به‌ویژه هنگامی که به جیره غذایی طیور اضافه شود. از دیگر مکانیسم‌های عملکردی کروم، کاهش سرکوب سیستم ایمنی در زمان تنش می‌باشد (۶). کروم از طریق القای انتشار سیتوکین‌ها، پاسخ ایمنی در حیوانات، از جمله طیور را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مکمل کروم از طریق تأثیر بر بیان ژن  $\text{IFN-}\gamma$  در بافت طحال جوجه‌های گوشتی، در تعدیل سیستم ایمنی نقش دارد (۵). مکمل کروم از افزایش ترشح  $\text{TNF-}\alpha$ ، سطوح پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو ناشی از  $\text{H}_2\text{O}_2$  و سطوح بالای گلوکز در سلول‌های U937 کشت شده جلوگیری کرد (۲۱) که به نظر می‌رسد با اثر آنتی‌اکسیدانی آن مرتبط باشد. نتایج مطالعه ژا و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که انتقال نانوکروم (CrNano)، پیکولینات کروم (CrPic) و کلریدکروم ( $\text{CrCl}_3$ ) در سلول‌های Caco-2 عمدتاً از طریق مسیرهای انتقال غیرفعال انجام می‌شود (۳۹). علاوه بر این، CrNano راندمان جذب بسیار بالاتری

نسبت به CrPic و  $\text{CrCl}_3$  در سلول‌های Caco-2 نشان داد. گزارش شده که جذب کروم کمپلکس شده با برخی لیگاندهای آلی افزایش می‌یابد (۱۱).

با توجه به مطالب مورد اشاره در ارتباط با تنش حرارتی و تنش اکسیداتیو ناشی از آن، که وضعیت ایمنی و در نتیجه سلامتی و عملکرد پرنده را تحت تأثیر قرار می‌دهد و نیز خواص آنتی‌اکسیدانی اسید آلفا لیپوئیک و نقش کروم در متابولیسم گلوکز که با کاهش اثرات ناشی از تنش اکسیداتیو همراه است، همچنین کاربرد سلول‌های بنیادی، تاکنون تأثیر همزمان مکمل‌های کروم و اسید آلفا لیپوئیک بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه گوشتی مشخص نشده است. لذا مطالعه حاضر، با هدف بررسی تأثیر مکمل‌های کروم و اسید آلفا لیپوئیک بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان جوجه گوشتی، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و پاسخ ایمنی سلول‌های کشت شده تحت تنش حرارتی و دستیابی به یک منبع با ارزش سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بمنظور استفاده در روش‌هایی هم‌چون؛ شبیه‌سازی، انتقال ژن و یا مطالعه بیماری‌های ویروسی در پرندگان طراحی شده است. همچنین از آن‌ها می‌توان جهت استفاده در تحقیقات واکسن، تست‌های تشخیصی ویروس‌شناسی، ژن درمانی، حفظ گونه‌های با ارزش پرندگان در حال انقراض، درمان بیماری‌های پرندگان و درمان بیماری‌های مشترک انسان و طیور بهره جست.

## مواد و روشها

**جداسازی و تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه:** در مطالعه حاضر از جوجه یک‌روزه نژاد راس ۳۰۸ استفاده شد. جوجه‌ها توسط کلروفورم بیهوش و استخوان پا جدا شدند و با PBS (سیگما، آمریکا) محتوی ۳٪ پنی‌سیلین / استرپتومایسین شسته و به محیط (DMEM (Dulbecos Modified Eagle Medium) Gibco، آمریکا) منتقل شدند. قسمت اپی‌فیزها قطع و با

**فلوسایتومتري:** به این منظور از سلول‌های پاساژ ۳ استفاده شد. پس از شستشو سلول‌ها با PBS، غلظت مناسب از آنتی‌بادی‌های کنژوگه -MBS8582781 (Clini Sciences, CD29 (0), CD44 (Clini Sciences, 8400-02), CD34 (Clini Sciences, E3451), CD31 (Clini Sciences) را در محیط تاریک به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها در یخچال و دور از نور نگهداری گردید و جهت فلوسایتومتري به آزمایشگاه ارسال شدند.

**تقسیم بندی گروه‌های مورد آزمایش:** گروه‌های آزمایشی شامل: گروه ۱ (سلول‌های تحت تنش حرارتی که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار اسید آلفا لیپوئیک تیمار شدند)، گروه ۲ (سلول‌های تحت تنش حرارتی که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات تیمار شدند)، گروه ۳ (سلول‌های تحت تنش حرارتی که همزمان با غلظت ۱۰۰ میکرومولار اسید آلفا لیپوئیک و ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات تیمار شدند)، گروه ۴ (سلول‌های تحت تنش حرارتی (HS) و گروه ۵ (گروه کنترل که سلول‌ها بدون هیچ گونه تیماری نگه‌داری می‌شوند).

**اعمال تنش حرارتی:** پس از پاساژ سوم سلول‌ها تعداد  $10^4 \times 4$  در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه کشت شدند و تنش حرارتی به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۹ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد اعمال گردید.

**بررسی سمیت سلولی:** بمنظور سنجش سمیت، بقای سلول و مطالعات تکثیر تست MTT مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که از مرحله‌ی اضافه کردن MTT (سیگما، آمریکا)، کار در شرایط تاریکی انجام شد و هر غلظت از ترکیب در ۵ چاهک تکرار شد. از سوی دیگر هر آزمایش، در سه تکرار مجزا صورت گرفت. این تست برای اسید آلفا لیپوئیک با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار و پروپیونات کروم با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار روی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان جوجه انجام شد.

استفاده از سرنگ انسولین مغز استخوان خارج شد و از مش ۴۰ و ۷۰ میکرومتری عبور داده شد و رسوب سلولی با محیط DMEM، محتوی ۱۰٪ FBS (Gibco، آمریکا) سوسپانسیون و در فلاسک کشت T25 (SPL 70025، کره) در شرایط ۵٪ دی‌اکسید کربن و ۳۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بمنظور تکثیر سلولی، اولین پاساژ سلولی با استفاده از ترپسین/EDTA (Gibco، آمریکا) انجام گرفت.

**تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به آدیپوسایت:** سلول‌ها به تعداد  $10^4 \times 4$  cell/well در پلیت‌های ۲۴ خانه (SPL، کره) به مدت ۳ هفته با محیط آدیپوژنیک تیمار شدند. محیط آدیپوژنیک شامل محیط DMEM، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک اسید، ۷-۱۰ مولار دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین و ۱۰ درصد FBS بود. بمنظور تشخیص واکوئل‌های چربی از رنگ آمیزی اوایل رد استفاده شد. برای این رنگ آمیزی در ابتدا سلول‌ها با فرمالین ۴٪ به مدت ۱ ساعت تثبیت و سپس با اتانول ۷۰٪ شستشو شدند و با محلول رنگی اوایل رد ۰/۵٪ در الکل ایزوپروپیل ۹۹٪ به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ آمیزی شدند.

**تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به استئوبلاست:** سلول‌ها به تعداد  $10^4 \times 4$  cell/well در پلیت‌های ۲۴ خانه به مدت ۳ هفته با محیط استئوژنیک تیمار شدند. محیط تمایز به سمت استئوبلاست شامل DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک ۳-فسفات، دگزامتازون ۸-۱۰ مولار و بتا گلیسرول فسفات ۱۰ میلی‌مولار بود. بمنظور ارزیابی تمایز، رنگ آمیزی برای تشخیص رسوب کلسیمی صورت گرفت. برای ارزیابی تمایز استئوژنیک، از رنگ آمیزی اختصاصی آلیزارین رد استفاده شد. برای این رنگ آمیزی سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با متانول در دمای اتاق تثبیت و با رنگ آلیزارین رد ۱٪ در آب آمونیاکی ۲۵٪ به مدت ۲ دقیقه رنگ آمیزی شدند.

نمودن با استفاده از دستگاه پلیریدر (Bioteck، آمریکا)، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۵ نانومتر قرائت گردید. بمنظور تعیین غلظت پروتئین در نمونه‌ها از منحنی استاندارد پروتئین سرم آلبومین گاوی با غلظت‌های ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. پس از رسم منحنی استاندارد تغییرات جذب نمونه‌های استاندارد در برابر غلظت آن‌ها، فرمول خط، استخراج شد و با استفاده از فرمول خط، غلظت نمونه‌های مجهول محاسبه گردید.

#### بررسی بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی در گروه‌های مختلف:

الگوی بیان mRNA ژن اینترلوکین ۲، اینترلوکین ۶ و IFN- $\gamma$  دخیل در ایمنی با استفاده از qRT-PCR (ABI، آمریکا)، انجام شد. برای استخراج RNA سلول‌ها با استفاده از تریازول لیز شدند و بعد از استخراج با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo، آمریکا)، بررسی غلظت و خلوص انجام شد. برای سنتز cDNA از TaqMan Reverse Transcription استفاده شد. برای هر نمونه ۴۰ نانوگرم از cDNA سنتز شده با ۱۰ میکرولیتر از Power SYBER Green master mix و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر مخلوط و Ct هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار StepOne محاسبه و نرمالیزاسیون با استفاده از ژن GAPDH انجام گرفت و هر آزمایش سه بار تکرار گردید. برای طراحی پرایمر اختصاصی برای ژن‌های مورد نظر ابتدا با استفاده از سایت NCBI، توالی نوکلئوتیدی مربوط به رونوشت‌های ژن‌های مورد مطالعه بدست آمد. پس از بررسی مناطق مختلف رونوشت از جمله محل آگزون و اینترون، محل مناسب بصورت آنالین و بوسیله‌ی نرم‌افزار Olig7 محل‌یابی شد. با کمک نرم‌افزار Primer BLAST از سایت NCBI شرایط اختصاصی بودن و دینامیکی پرایمر بررسی شد. پرایمرهای بکار رفته در این مطالعه دارای خصوصیات ذکرشده در جدول ۱ می‌باشند.

**بررسی و سنجش فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی:** به این منظور در گروه‌های مختلف، سلول‌های بنیادی مغز استخوان در پلیت ۲۴ خانه تیمار و در پایان دوره با استفاده از بافر ریپا، لیز شدند. تمامی مراحل برای جلوگیری از دناتوره شدن و لیز شدن پروتئین‌ها، بر روی یخ انجام شد. در ابتدا با استفاده از روش برادفورد مقدار کل پروتئین موجود در نمونه محاسبه و سپس سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)، گلوکاتیون پراکسیداز (GPx)، گلوکاتیون احیاء، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) مورد سنجش قرار گرفت. TAC، بر اساس توانایی آنتی‌اکسیدانی نمونه در احیا یون فریک به فروس و ایجاد کمپلکس آبی طراحی شده که با روش فتومتریک قابل ارزیابی است. فعالیت آنزیم SOD به کمک سنجش مهار احیای نیتروپترازولیوم (NBT) در حضور SOD در طوح موج ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت. فعالیت CAT براساس روش رنگ‌سنجی مبتنی بر واکنش پراکسید هیدروژن تجزیه نشده با مولبیدات آمونیوم برای تولید رنگ زرد، که حداکثر جذب در طول موج ۳۷۴ نانومتر را دارد، اندازه‌گیری شد. گلوکاتیون پراکسیداز، اکسیداسیون گلوکاتیون توسط هیدروپراکسید را کاتالیز می‌کند. در حضور گلوکاتیون ردوکتاز و NADPH، گلوکاتیون اکسید شده بلافاصله با اکسیداسیون NADPH به NADP<sup>+</sup> به شکل احیا شده تبدیل می‌شود. کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

#### ارزیابی مقدار پروتئین به روش برادفورد: بمنظور تعیین

مقدار پروتئین در نمونه‌ها از روش برادفورد استفاده شد. بدین منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر نمونه‌ی حاصل از لیز سلولی و ۲۰ میکرولیتر آب مقطر (بلانک) بصورت دو بار تکرار در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. سپس به نمونه‌ها و بلانک مقدار ۴۰ میکرولیتر معرف برادفورد و ۱۴۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد و پس از مخلوط

جدول ۱- توالی و خصوصیات آغازگرهای رفت و برگشت استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

ژن	شماره دسترسی	آغازگرها توالی (۵'-۳')	طول محصول (جفت باز)
$\gamma$ IFN-	NM_205149.1	F: 5'- AACAACTTCCTGATGGCGTGA -3' R: 5'- GCTTTCGCTGGATTCTCAAGT -3'	۸۹
IL-6	NM_204628.2	F: 5'- TTATTACGTAGTCAACGCCA -3' R: 5'- GTGGAGTTCTTCAGCCTTAT -3'	۱۹۳
IL-2	NM_204153.1	F: 5'- TTGGCTGTATTCGGTAGCA -3' R: 5'- GTGACTCCTGGGTCTCAGT -3'	۱۶۹
GAPDH	NM_204305.2	F: 5'- GCCGTTGACGTGCAG -3' R: 5'- TTCTCAGCCTTGACAGTG -3'	۲۲۱

## روش آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها

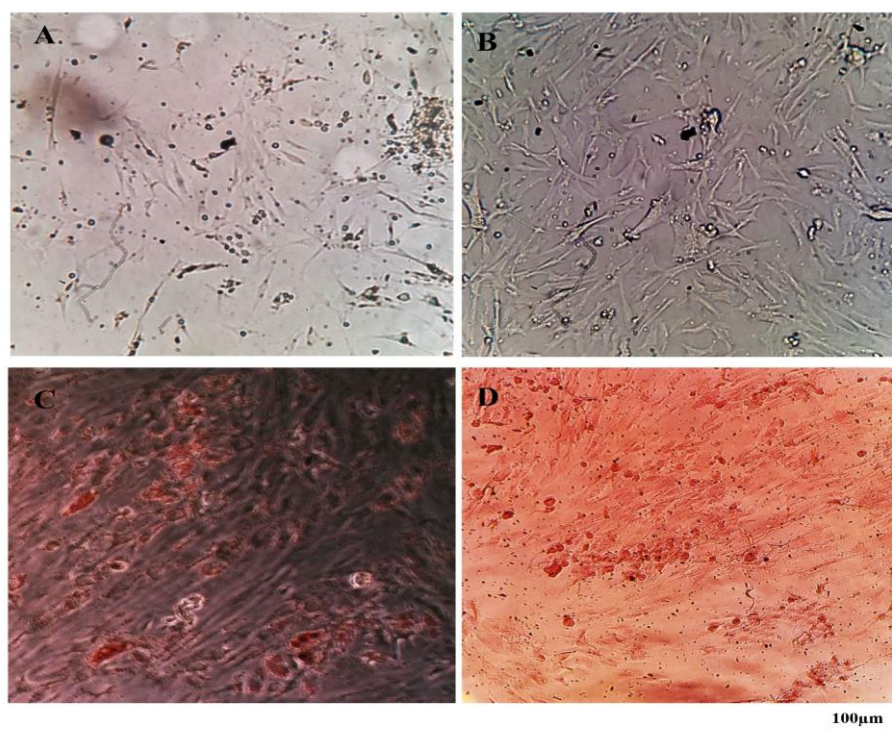
نتایج حاصل از این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Tukey انجام و سطح معنی‌داری ۵ صدم در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SAS و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

## نتایج

بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان جوجه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه در طی روند استحصال و پس از کشت (پاساژ صفر) و در طی پاساژهای متوالی بصورت روزانه توسط میکروسکوپ معکوس مورد مشاهده و عکس‌برداری قرار گرفتند. این سلول‌ها از لحاظ مورفولوژی و تراکم نیز مورد بررسی قرار گرفتند. همانگونه که در تصویر ۱ مشاهده می‌شود شکل کشیده و دوکی آن‌ها با مورفولوژی سلول‌های فیروبلاستی، توانایی چسبندگی، برقراری اتصالات محکم به کف فلاسک و مورفولوژی طبیعی قابل مشاهده بود. در مراحل اولیه استحصال، شکل سلول‌ها نامنظم، با کشیدگی کمتر و با تعداد کمی سلول‌های غیراختصاصی همراه بود که

پاساژهای سلولی بعدی منجر به جداسازی سلول‌های غیر اختصاصی گردید، به نحوی که در پاساژ سوم کلیه سلول‌ها اختصاصی با مورفولوژی دوکی بودند. همچنین سلول‌ها تمایل بالایی را جهت تکثیر و برقراری اتصال با سلول‌های مجاور نشان دادند. بعلاوه تراکم بالای سلول‌ها که نشان‌دهنده رشد نرمال آن‌ها است، قابل توجه بود. این سلول‌ها بدون رنگ‌آمیزی هستند؛ بنابراین کنتراست کمی با بستر زمینه دارند (شکل ۱ A و B).

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های آدیپوسایت: قدرت تمایز سلول‌های بنیادی به آدیپوسایت یکی از ویژگی‌های فنوتیپی مهم بمنظور تایید بنیادی و چندتوان بودن سلول‌های بنیادی جداسازی شده در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. در سلول بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان جوجه بعد از قرار گرفتن در معرض محیط تمایز آدیپوژنیک، واکوئل چربی تشکیل شد و این واکوئل‌ها به تدریج افزایش یافت. واکوئل‌های چربی حاوی تری‌گلیسیرید می‌باشند که به راحتی با رنگ‌آمیزی Oil red قابل تایید هستند. تمایز آدیپوسایت از سلول‌های بنیادی مغز استخوان از طریق این رنگ‌آمیزی و مشاهده وزیکول‌های چربی به رنگ قرمز به کمک میکروسکوپ معکوس در روز ۲۱ تمایز آدیپوژنیک تایید شد (شکل ۱ C).

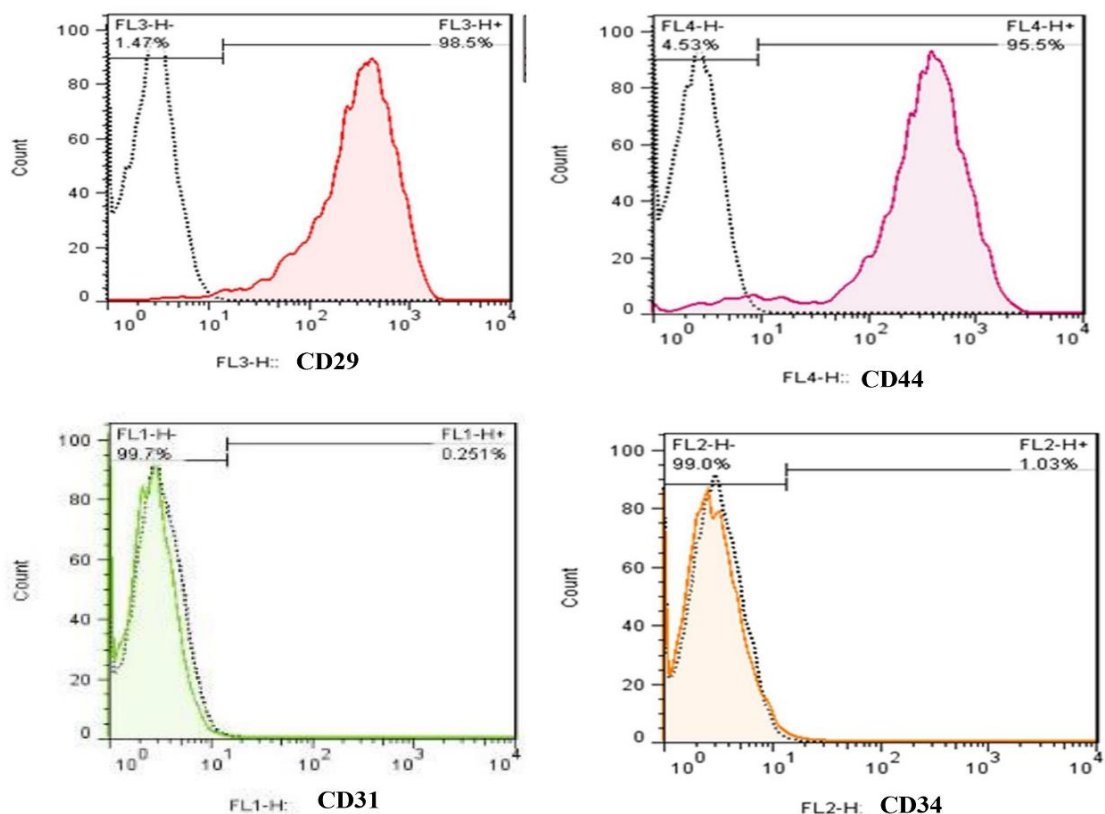


شکل ۱- بررسی بررسی مورفولوژی BMSCs توسط میکروسکوپ معکوس. A. BMSCs که در پاساژ اول بعد از کشت، اتصال و رشد سلول‌ها را نشان می‌دهد. B. BMSCs در پاساژ سوم. C. بررسی تمایز BMSCs به سلول‌های آدیپوسایت با رنگ آمیزی اوایل رد. D. بررسی تمایز BMSCs به سلول‌های استئوبلاست با رنگ آمیزی آلیزارین رد.

جداسازی می‌باشد. مشخص شده است که سلول‌های بنیادی مشتق شده از مغز استخوان، بیان نشانگرهای سطحی CD29 و CD44 و عدم بیان نشانگرهای خونساز CD34 و CD31 را نشان می‌دهند. در این مطالعه بیان و عدم بیان نشانگرهای سطحی با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی و روش فلوسایتومتری ارزیابی شد. بر اساس نتایج فلوسایتومتری سلول‌های پاساژ سوم نشانگر CD29 را در حدود ۹۸/۵ درصد و نشانگر CD44 در حدود ۹۵/۵ درصد بیان داشتند، که این نشانگرها به‌عنوان نشانگر مثبت برای سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان در نظر گرفته می‌شوند. نشانگر CD34 که یک نشانگر منفی است در حدود ۱/۰۳ درصد و نشانگر منفی CD31 در حدود ۰/۲۵ درصد بیان داشتند (شکل ۲).

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های استئوبلاست: سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط استئوژنیک در مدت ۲۱ روز به سلول‌های استئوبلاست تمایز داده شدند. بعد از تمایز، سلول‌های استئوبلاست کلسیم-فسفات تولید می‌کنند؛ که با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد قابل شناسایی می‌باشند. تشکیل سلول‌های استئوبلاست از طریق این رنگ‌آمیزی و مشاهده رسوبات ذخیره کلسیمی به رنگ قرمز به کمک میکروسکوپ معکوس در روز ۲۱ تمایز تایید شد (شکل ۱ D).

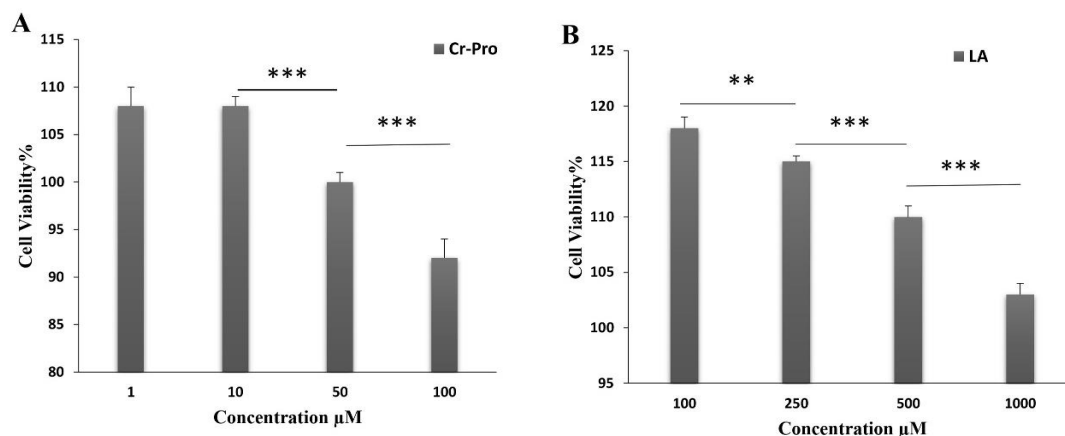
بررسی نشانگرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان با استفاده از فلوسایتومتری: بیان یا عدم بیان نشانگرهای پروتئینی سطحی یکی از مهم‌ترین روش‌های تایید فنوتیپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از



شکل ۲- بررسی نشانگرهای BMSCs با استفاده از فلوسایتومتری بعد از پاساژ سوم. میزان بیان نشانگر CD29 در حدود ۹۸/۵ درصد بود. میزان بیان نشانگر CD44 در حدود ۹۵/۵ درصد بیان داشت. نشانگر CD31 در حدود ۰/۲۵ درصد بیان داشت. نشانگر CD34 در حدود ۱/۰۳ درصد بیان داشت.

۱، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار پروپیونات کروم، زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مغز استخوان ۱۰۰٪ بوده است و این ماده در غلظت‌های ذکر شده اثر توکسیک نداشت ولی در غلظت ۱۰۰ میکرومولار زنده‌مانی سلول‌ها به ۹۲ درصد رسید. همچنین در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار اسید آلفا لیپوئیک، زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مغز استخوان بیشتر از ۱۰۰٪ بود و هیچ گونه اثرات توکسیک در این غلظت‌ها مشاهده نشد (شکل ۳).

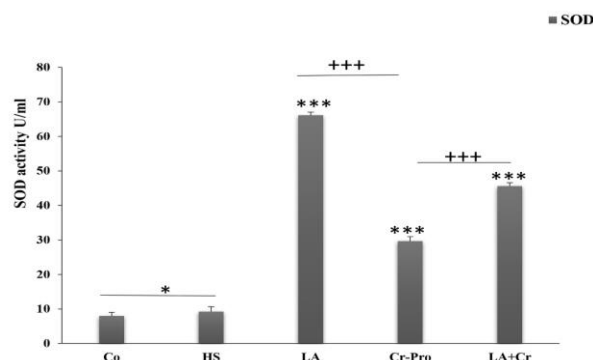
بررسی زنده‌مانی سلول‌ها به روش MTT: در این بخش اثرات پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک بر بقاء سلول‌های بنیادی مغز استخوان جوجه با تست MTT در مقایسه با گروه‌های کنترل بررسی شد. در این آزمایش، میانگین درصد بقای سلولی به‌دست آمده از سلول‌هایی که تحت تاثیر غلظت‌های مختلف پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک قرار گرفتند، با میانگین درصد زنده‌مانی سلول‌های نمونه کنترل مقایسه شدند. بر اساس نتایج در غلظت‌های



شکل ۳- نتایج مربوط به بررسی بقای سلول‌های بنیادی مغز استخوان جوجه با استفاده از MTT در ۲۴ ساعت بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف A. پروپیونات کروم و B. اسید آلفا لیپوئیک. (\*= $P \leq 0.05$ , \*\*= $P \leq 0.01$ , \*\*\*= $P \leq 0.001$ ). آلفا لیپوئیک= LA و پروپیونات کروم= Cr-Pro.

نتایج حاصل از بررسی تغییرات میزان فعالیت آنزیم SOD سلول‌های مغز استخوان جوجه تیمار شده در گروه‌های مورد آزمایش پس از محاسبه میزان فعالیت آنزیم SOD در گروه کنترل، سلول‌های مغز استخوان تحت تیمار ۲۴ ساعته با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک بصورت جداگانه و هم‌زمان قرار گرفتند. میزان فعالیت آنزیم SOD در گروه سلول‌های تحت تنش حرارتی ۹/۲۲ واحد بر میلی‌لیتر ارزیابی شد که نسبت به سلول‌های کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ( $P \leq 0.05$ ). میزان فعالیت آنزیم SOD در گروه سلول‌های تیمار شده با پروپیونات کروم تحت تنش حرارتی ۴۵/۵۸ واحد بر میلی‌لیتر ارزیابی شد، که در مقایسه با گروه HS و تیمار شده با پروپیونات کروم بطور معنی‌داری افزایش ( $P \leq 0.001$ ) و در مقایسه با گروه تیمار شده با اسید آلفا لیپوئیک بطور معنی‌داری ( $P \leq 0.001$ ) کمتر بود (شکل ۴).

نتایج حاصل از بررسی تغییرات میزان فعالیت آنزیم SOD سلول‌های مغز استخوان جوجه تیمار شده در گروه‌های مورد آزمایش پس از محاسبه میزان فعالیت آنزیم SOD در گروه کنترل، سلول‌های مغز استخوان تحت تیمار ۲۴ ساعته با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک بصورت جداگانه و هم‌زمان قرار گرفتند. میزان فعالیت آنزیم SOD در گروه سلول‌های تحت تنش حرارتی ۹/۲۲ واحد بر میلی‌لیتر ارزیابی شد که نسبت به سلول‌های کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ( $P \leq 0.05$ ). میزان فعالیت آنزیم SOD در گروه سلول‌های تیمار شده با پروپیونات کروم تحت تنش حرارتی نسبت به گروه HS بصورت معنی‌داری

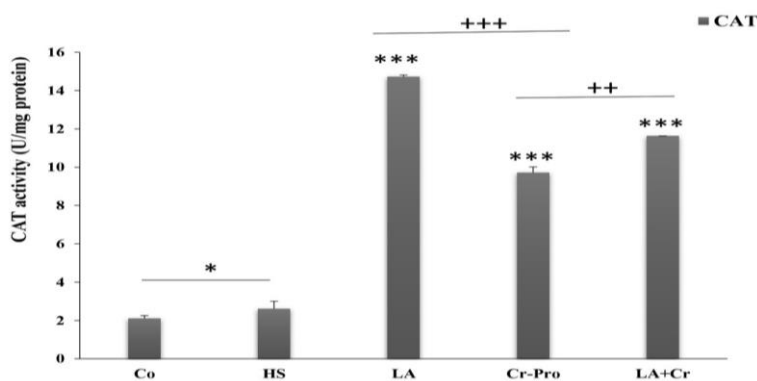


شکل ۴- مقایسه مقدار فعالیت آنزیم SOD در گروه کنترل و تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک در سلول‌های بنیادی مغز استخوان بعد از ۲۴ ساعت (\*= $P \leq 0.05$ , \*\*= $P \leq 0.01$ , \*\*\*= $P \leq 0.001$ ). اسید آلفا لیپوئیک= LA، پروپیونات کروم= Cr-Pro، تنش حرارتی= HS (\*= $P \leq 0.05$ , \*\*= $P \leq 0.01$ , \*\*\*= $P \leq 0.001$ ). مقایسه با کنترل، += مقایسه گروه‌های مختلف).

بصورت معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) افزایش یافته است (شکل ۵). همچنین میزان فعالیت این آنزیم در گروه سلول‌های تیمار شده با اسید آلفا لیپوئیک تحت تنش حرارتی نسبت به گروه HS و سایر گروه‌ها بطور معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) افزایش نشان داد بطوری‌که بیشترین میزان فعالیت در این گروه مشاهده شد. در گروه سلول‌های تیمار شده هم‌زمان با پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک تحت تنش حرارتی میزان فعالیت CAT،  $64/11$  واحد بر میلی‌گرم پروتئین ارزیابی شد؛ که در مقایسه با گروه HS و گروه تیمار شده با پروپیونات کروم بطور معنی‌داری افزایش ( $P \leq 0/001$ ) و در مقایسه با گروه تیمار شده با اسید آلفا لیپوئیک بطور معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) کمتر بود (شکل ۵).

نتایج حاصل از بررسی تغییرات میزان فعالیت آنزیم CAT سلول‌های مغز استخوان جوجه تیمار شده در گروه‌های مورد آزمایش

پس از محاسبه میزان فعالیت آنزیم CAT در گروه HS، سلول‌های مغز استخوان تحت تیمار ۲۴ ساعته با غلظت  $100$  میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک بصورت جداگانه و هم‌زمان قرار گرفتند. میزان فعالیت آنزیم CAT در گروه سلول‌های تحت تنش حرارتی  $2/61$  واحد بر میلی‌گرم پروتئین ارزیابی شد، که نسبت به سلول‌های کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ( $P \leq 0/05$ ). میزان فعالیت آنزیم CAT در گروه سلول‌های تیمار شده با پروپیونات کروم تحت شوک حرارتی نسبت به گروه HS



شکل ۵- مقایسه مقدار فعالیت آنزیم CAT در گروه کنترل و تیمار با غلظت  $100$  میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک در سلول‌های بنیادی مغز استخوان بعد از ۲۴ ساعت ( $P \leq 0/05$ ،  $* = P \leq 0/01$ ،  $** = P \leq 0/001$ ،  $*** = P \leq 0/001$ )، اسید آلفا لیپوئیک = LA، پروپیونات کروم = Cr-Pro، تنش حرارتی = HS (\* = مقایسه با کنترل، + = مقایسه گروه‌های مختلف).

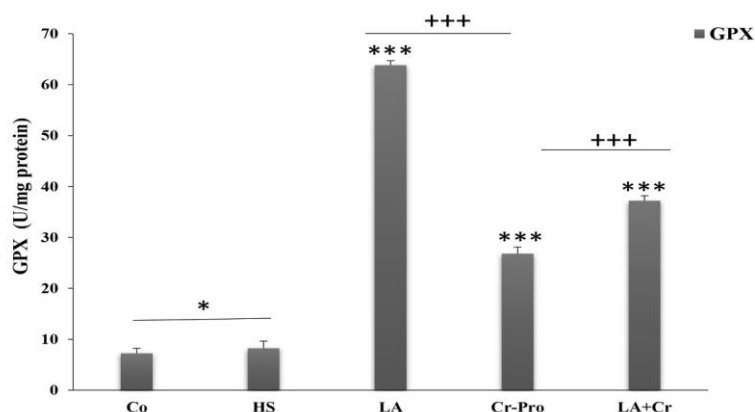
واحد بر میلی‌گرم پروتئین ارزیابی شد. میزان فعالیت آنزیم GPX در گروه سلول‌های تیمار شده با پروپیونات کروم تحت تنش حرارتی نسبت به گروه HS بصورت معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) افزایش یافته است (شکل ۶). همچنین میزان فعالیت این آنزیم در سلول‌های تیمار شده با اسید آلفا لیپوئیک تحت تنش حرارتی نسبت به گروه HS و سایر گروه‌ها بطور معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) افزایش نشان داد بطوری‌که بیشترین میزان فعالیت در این گروه مشاهده شد.

نتایج حاصل از بررسی تغییرات میزان فعالیت آنزیم GPX سلول‌های مغز استخوان جوجه تیمار شده در گروه‌های مورد آزمایش

پس از محاسبه میزان فعالیت آنزیم GPX در گروه کنترل، سلول‌های مغز استخوان تحت تیمار ۲۴ ساعته با غلظت  $100$  میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک بصورت جداگانه و هم‌زمان قرار گرفتند. میزان فعالیت آنزیم GPX در گروه سلول‌های تحت تنش حرارتی  $8/23$

بطور معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) افزایش و در مقایسه با گروه تیمار شده با اسید آلفا لیپوئیک بطور معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) کمتر بود (شکل ۶).

در گروه سلول‌های تیمار شده هم‌زمان با پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک تحت تنش حرارتی میزان فعالیت GPX، ۲۲/۳۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین ارزیابی شد که در مقایسه با گروه HS و گروه تیمار شده با پروپیونات کروم

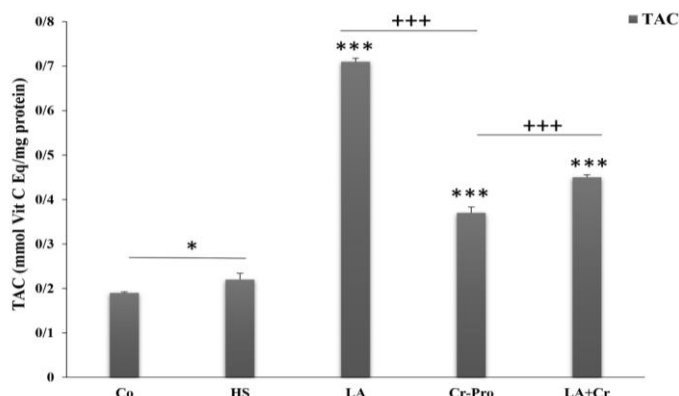


شکل ۶ - مقایسه مقدار فعالیت آنزیم GPX در گروه کنترل و تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک در سلول‌های بنیادی مغز استخوان بعد از ۲۴ ساعت ( $P \leq 0/05$ ،  $P \leq 0/01$ ،  $P \leq 0/001$ ). اسید آلفا لیپوئیک = LA، پروپیونات کروم = Cr-Pro، تنش حرارتی = HS (\* = مقایسه با کنترل، + = مقایسه گروه‌های مختلف).

همچنین میزان فعالیت این آنزیم در سلول‌های تیمار شده با اسید آلفا لیپوئیک تحت شوک حرارتی نسبت به گروه HS و سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) افزایش نشان داد؛ به‌طوری‌که بیشترین میزان فعالیت در این گروه مشاهده شد. در گروه سلول‌های تیمار شده هم‌زمان با پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک تحت تنش حرارتی میزان فعالیت TAC، ۴۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین ارزیابی شد؛ که در مقایسه با گروه HS و گروه تیمار شده با پروپیونات کروم بطور معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) افزایش و در مقایسه با گروه تیمار شده با اسید آلفا لیپوئیک بطور معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) کمتر بود (شکل ۷).

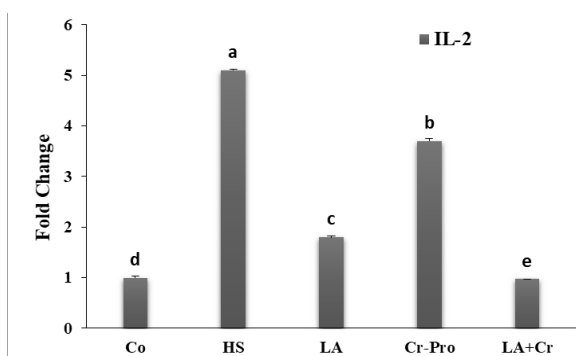
نتایج حاصل از بررسی تغییرات میزان فعالیت آنزیم TAC سلول‌های مغز استخوان جوجه تیمار شده در گروه‌های مورد آزمایش

پس از محاسبه میزان فعالیت آنزیم TAC در گروه کنترل، سلول‌های مغز استخوان تحت تیمار ۲۴ ساعته با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک بصورت جداگانه و هم‌زمان قرار گرفتند. میزان فعالیت آنزیم TAC در گروه سلول‌های تحت تنش حرارتی ۰/۲۲ واحد بر میلی‌گرم پروتئین ارزیابی شد. میزان فعالیت آنزیم TAC در گروه سلول‌های تیمار شده با پروپیونات کروم تحت شوک حرارتی نسبت به گروه HS بصورت معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) افزایش یافته است (شکل ۷).



شکل ۷- مقایسه مقدار فعالیت آنزیم TAC در گروه کنترل و تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک در سلول‌های بنیادی مغز استخوان بعد از ۲۴ ساعت ( $P \leq 0.05$ ،  $P \leq 0.01$ ،  $P \leq 0.001$ ). اسید آلفا لیپوئیک = LA، پروپیونات کروم = Cr-Pro، تنش حرارتی = HS (=\*) مقایسه با کنترل، += مقایسه گروه‌های مختلف).

نتایج حاصل آنالیز بیان ژن IL-2 در سلول‌های مغز استخوان جوجه تیمار شده در گروه‌های مورد آزمایش

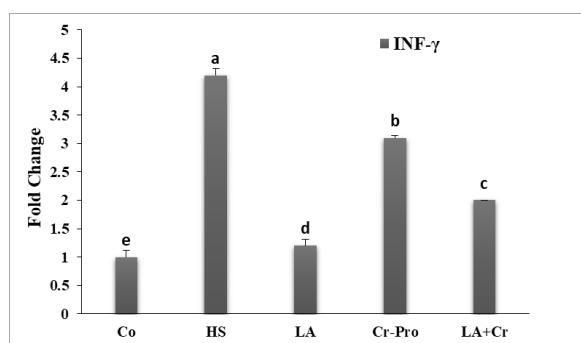


شکل ۸- مقایسه میزان بیان ژن IL-2 با استفاده از روش qRT-PCR در گروه کنترل و تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک در سلول‌های بنیادی مغز استخوان جوجه بعد از ۲۴ ساعت. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی و نرمالایزر استفاده شد. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مختلف تفاوت آماری معنی‌داری دارند ( $P \leq 0.05$ ). اسید آلفا لیپوئیک = LA، پروپیونات کروم = Cr-Pro، تنش حرارتی = HS.

سلول‌های مغز استخوان تحت تیمار ۲۴ ساعته با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک بصورت جداگانه و هم‌زمان قرار گرفتند. میزان بیان ژن IL-2 در گروه کنترل، ۱ در نظر گرفته شد و بیان این ژن در گروه سلول‌های تحت تنش حرارتی ۵/۱ محاسبه شد که نسبت به گروه کنترل بطور معنی‌داری ( $P \leq 0.001$ ) افزایش نشان داد. میزان بیان ژن IL-2 در گروه سلول‌های تیمار شده با پروپیونات کروم تحت تنش حرارتی نسبت به گروه HS، ۷/۳ برآورد شد که بصورت معنی‌داری ( $P \leq 0.001$ ) کاهش یافته است (شکل ۸). همچنین میزان بیان این ژن در سلول‌های تیمار شده با اسید آلفا لیپوئیک تحت تنش حرارتی حدود ۱/۸ برآورد شد که نسبت به گروه HS و گروه تیمار شده با پروپیونات کروم بطور معنی‌داری کاهش نشان داد. ( $P \leq 0.001$ ) میزان بیان ژن IL-2 در گروه سلول‌های تیمار شده هم‌زمان با پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک تحت تنش حرارتی ۰/۹۷ ارزیابی شد که در مقایسه با میزان بیان این ژن در سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری ( $P \leq 0.001$ ) مشاهده شد. بطوری‌که کمترین میزان بیان ژن IL-2 در این گروه مشاهده شد (شکل ۸).

نتایج حاصل آنالیز بیان ژن IL-6 در سلول‌های مغز استخوان جوجه تیمار شده در گروه‌های مورد آزمایش سلول‌های مغز استخوان تحت تیمار ۲۴ ساعته با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک بصورت جداگانه و هم‌زمان قرار گرفتند. میزان بیان ژن IL-

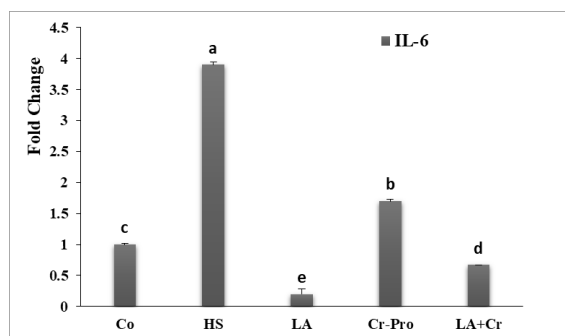
سلول‌های مغز استخوان تحت تیمار ۲۴ ساعته با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک به صورت جداگانه و هم‌زمان قرار گرفتند. میزان بیان ژن  $INF-\gamma$  در گروه کنترل، ۱ در نظر گرفته شد و بیان این ژن در گروه سلول‌هایی تحت شوک حرارتی ۴/۲ محاسبه شد که نسبت به سایر گروه‌ها بطور معنی‌داری افزایش نشان داد. میزان بیان ژن  $INF-\gamma$  در سلول‌های تیمار شده با پروپیونات کروم تحت تنش حرارتی ۳/۱ برآورد شد که نسبت به گروه HS بصورت معنی‌داری کاهش ( $P \leq 0/05$ ) یافته است (شکل ۱۰). همچنین میزان بیان این ژن در سلول‌های تیمار شده با اسید آلفا لیپوئیک تحت شوک حرارتی حدود ۱/۲ برآورد شد که نسبت به نمونه HS و سایر گروه‌ها بطور معنی‌داری کاهش نشان داد. میزان بیان ژن  $INF-\gamma$  در گروه سلول‌های تیمار شده هم‌زمان با پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک تحت شوک حرارتی ۲ ارزیابی شد که در مقایسه با گروه شوک حرارتی و گروه پروپیونات کروم کاهش ( $P \leq 0/01$ ) معنی‌داری و در مقایسه با گروه اسید آلفا لیپوئیک افزایش معنی‌داری ( $P \leq 0/05$ ) مشاهده شد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- مقایسه میزان بیان ژن  $INF-\gamma$  با استفاده از روش qRT-PCR در گروه کنترل و تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک در سلول‌های بنیادی مغز استخوان جوجه بعد از ۲۴ ساعت. از ژن  $GAPDH$  به‌عنوان کنترل داخلی و نرمالایزر استفاده شد. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مختلف تفاوت آماری معنی‌داری دارند ( $P \leq 0/05$ ). اسید آلفا لیپوئیک = LA، پروپیونات کروم = Cr-Pro، تنش حرارتی = HS.

پروپیونات کروم = Cr-Pro، تنش حرارتی = HS.

۶ در گروه کنترل، ۱ در نظر گرفته شد و بیان این ژن در گروه سلول‌های تحت تنش حرارتی ۳/۹ محاسبه شد که نسبت به گروه کنترل بطور معنی‌داری افزایش ( $P \leq 0/001$ ) نشان داد. میزان بیان ژن IL-6 در سلول‌های تیمار شده با پروپیونات کروم تحت تنش حرارتی ۱/۷ برآورد شد که نسبت به گروه HS بصورت معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) کاهش یافته است (شکل ۹). همچنین میزان بیان این ژن در سلول‌های تیمار شده با اسید آلفا لیپوئیک تحت تنش حرارتی حدود ۰/۲ برآورد شد که نسبت به نمونه HS و سایر گروه‌ها بطور معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) کاهش نشان داد. بطوری‌که کم‌ترین میزان بیان ژن IL-6 در این گروه مشاهده شد. میزان بیان ژن IL-6 در گروه سلول‌های تیمار شده هم‌زمان با پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک تحت تنش حرارتی ۰/۶۷ ارزیابی شد که در مقایسه با گروه HS و گروه پروپیونات کروم کاهش معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) و در مقایسه با گروه اسید آلفا لیپوئیک افزایش معنی‌داری ( $P \leq 0/001$ ) مشاهده شد (شکل ۹).



شکل ۹- مقایسه میزان بیان ژن IL-6 با استفاده از روش qRT-PCR در گروه کنترل و تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پروپیونات کروم و اسید آلفا لیپوئیک در سلول‌های بنیادی مغز استخوان جوجه بعد از ۲۴ ساعت. از ژن  $GAPDH$  به‌عنوان کنترل داخلی و نرمالایزر استفاده شد. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مختلف تفاوت آماری معنی‌داری دارند ( $P \leq 0/05$ ). اسید آلفا لیپوئیک = LA، پروپیونات کروم = Cr-Pro، تنش حرارتی = HS.

نتایج حاصل آنالیز بیان ژن  $INF-\gamma$  در سلول‌های مغز استخوان جوجه تیمار شده در گروه‌های مورد آزمایش

## بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان جوجه استحصال، شناسایی و تعیین هویت شدند. سپس این سلول‌ها تحت تاثیر تنش حرارتی قرار داده شده و با استفاده از غلظت‌های مناسب اسید آلفا لیپوئیک و پروپونات کروم بصورت مستقل و همزمان تیمار گردیدند. سپس زنده‌مانی سلول‌ها، بیان آنزیم‌ها و ژن‌های درگیر در فرایندهای استرس اکسیداتیو در گروه‌های مختلف بررسی و مقایسه شد.

استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است ابزار مفیدی برای هومئوستازی یا متعادل کردن مراحل رشد و نمو سلول‌ها باشد، بنابراین آن‌ها می‌توانند منبع موثری در استراتژی‌های درمانی محسوب گردند. دو مولکول آنتی‌اکسیدان طبیعی (یعنی اسید آلفا لیپوئیک و اسید کافئیک)، پتانسیل خوبی به‌عنوان مهارکننده‌های رشد سلول‌های تومور در شرایط آزمایشگاهی با اثر سمی وابسته به دوز و زمان دارند. نتایج مطالعات قبلی تایید کرد که کاهش قابل توجهی در تکثیر سلول‌های HepG2 پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون با اسید آلفا لیپوئیک (۱۰۰-۵۰۰ میکرومولار) نشان داد (۳۷). همچنین گزارش شده است  $\alpha$ -LA از طریق باند شدن با مس سمیت عصبی ناشی از مس را در کشت‌های سلولی کاهش می‌دهد (۳۶). انتقال نانوکروم، پیکولینات کروم و کلرید کروم در سلول‌های Caco-2، وابسته به غلظت، زمان و مستقل از دما بود، که نشان‌دهنده فرآیندهای انتقال غیرفعال در تک‌لایه‌های سلولی Caco-2 است. علاوه بر این کروم به شکل پیکولینات کروم بهتر از کلرید کروم معدنی در سلول‌های Caco-2 منتقل می‌شود (۳۹). کوبان و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که  $\alpha$ -LA و DHLA قادر به کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطان به روشی وابسته به غلظت هستند. پس از ۲۴ ساعت درمان با ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار  $\alpha$ -LA و DHLA، زنده ماندن سلول‌ها (سرطان سینه MCF-7) بطور معنی‌داری کاهش یافت (۲۶).

تنش اکسیداتیو با تولید رادیکال‌های آزاد بیش از حد مشخص می‌شود (۷). چندین سیستم آنتی‌اکسیدانی موثر در کنار هم برای جلوگیری از آسیب اکسیداتیو کار می‌کنند. دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی شامل SOD، GST، CAT، GSH، GPX،  $\alpha$ -توکوفرول، ویتامین C، بتاکاروتن و ویتامین A است (۲۵).

SOD اصلی‌ترین آنزیم دفاعی است که تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید به پراکسید هیدروژن را کاتالیز می‌کند (۱۷). CAT به‌مراه SOD بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی است و در تثبیت تولید رادیکال‌های آزاد بیش از حد تولید شده در پاسخ به تنش گرمایی نقش دارد. کاتالاز تجزیه پراکسید هیدروژن تولید شده توسط SOD به آب و اکسیژن مولکولی را کاتالیز می‌کند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که قرار گرفتن در معرض دمای بالای محیط به دلیل ایجاد آسیب بافتی و ضایعات در سلول‌ها باعث افزایش فعالیت SOD، GSH-Px و CAT در سرم، کبد و ماهیچه جوجه‌های گوشتی می‌شود (۳). مکانیسم افزایش این سیستم‌های آنزیمی بسیار مهم است. قرار گرفتن در معرض افزایش دما باعث تولید رادیکال‌های آزاد بیش از حد می‌شود و برای مقابله با ضررهای آن، اقدام محافظتی کوتاه مدت از طریق سیستم آنتی‌اکسیدانی با آزادسازی آنزیم‌هایی مانند SOD، GSH-Px و CAT انجام می‌شود (۲۸).

فعالیت گلوکوتاتیون S-ترانسفراز (GST) با تجویز ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم  $\alpha$ -LA در بافت معده در معرض ایندومتاسین افزایش یافت. برخلاف بافت‌های تحت درمان با ایندومتاسین،  $\alpha$ -LA، لانزوپرازول و رانیتیدین باعث افزایش فعالیت SOD و کاهش فعالیت CAT شدند (۲۳).  $\alpha$ -LA ممکن است به‌عنوان یک عامل پیشگیرانه در نظر گرفته شود که آنزیم GST را فعال می‌کند. آنزیم‌های متصل به GSH، و GSH در بافت‌ها، به‌ویژه GPx و GST، به‌عنوان عوامل پیشگیرانه بالقوه برای خواص آنتی‌اکسیدانی و سم‌زدایی آن‌ها پیشنهاد شده‌اند (۲۵). کاپلان و همکاران

سیتوکین‌ها و گیرنده‌های Toll مانند (TLRs) نشانگرهای مهم ایمنی هستند. سیتوکین‌ها بر تنظیم ایمنی از طریق سلول‌های خون‌ساز نقش دارند. همچنین دفاع میزبان و هموستاز را تسهیل می‌کنند (۲۲). آن‌ها عمدتاً شامل اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها، فاکتورهای رشد (TGFs)، TNFs و کموکین‌های پپتیدی کوچک هستند.

سیتوکین‌ها پروتئین‌های کدکننده ژن ایمنی ضروری هستند که به‌عنوان مولکول‌های سیگنال‌دهی درون‌زا شناخته شده‌اند؛ که با چارچوب دفاع سلولی در برابر پاسخ التهابی ناشی از افزایش دما تداخل دارند (۲۰). ILها جزء گروه سیتوکین‌ها هستند که نقش عمده‌ای در تحریک پاسخ‌های ایمنی و التهاب دارند. آن‌ها از IL-1 تا IL-17 طبقه‌بندی شده‌اند و برای هر نوع نقش خاصی دارند. علاوه بر این، IL1، IL-2، IL-6، IL-8 و TNF $\alpha$  متعلق به خانواده سیتوکین‌های پیش التهابی هستند. آن‌ها نقش فعالی در پاسخ التهابی تحت دمای بالای محیط دارند (۱۹). بیان این سیتوکین‌های پیش التهابی تحت تنش گرمایی، احتمالاً از طریق فعال کردن عملکردهای ایمنی از طریق افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها در دمای بالای محیط، افزایش می‌یابد (۱۸). بیان بیش از حد و افزایش تکثیر ممکن است منجر به آسیب بافت شود. به خوبی شناخته شده است که ویتامین‌ها به کاهش اثرات منفی بر عملکرد رشد و ایمنی در پاسخ به تنش گرمایی به دلیل عملکرد سرکوب کننده آن‌ها در برابر بیان سیتوکین‌های پیش التهابی کمک می‌کنند (۳۸). بنابراین، در مناطق گرمسیری، مکمل این ویتامین‌های آنتی‌اکسیدانی در جیره غذایی بسیار توصیه می‌شود. در یک مطالعه اخیر، گزارش شده است که تنش گرمایی حاد در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ ساعت باعث افزایش بیان ژن IL-15 طحال در مرغ می‌شود (۳۵). این نشان می‌دهد که IL-15 به سرعت به تنش گرمایی واکنش نشان می‌دهد تا با تکثیر سلول‌های ایمنی به جوجه کمک کند تا هموستاز را حفظ کند.

(۲۰۱۲)، گزارش کردند  $\alpha$ -LA اثر بهبود بخشی بر سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو در بافت معده موش دارد. همچنین این اثرات محافظتی گوارشی و آنتی‌اکسیدانی  $\alpha$ -LA متناسب با دوز افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد  $\alpha$ -LA اثرات خود را بصورت وابسته به دوز اعمال می‌کند.

در دهه گذشته، تعداد فزاینده‌ای از تحقیقات با تمرکز بر اثر مکمل  $\alpha$ -LA بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در جوجه‌ها انجام شده است. گزارش شده است استفاده از  $\alpha$ -LA (۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در جیره) جوجه‌های گوشتی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، GPx و کاهش فعالیت MDA پلاسما می‌شود (۱۲). علاوه بر این، نشان داده شده است که استفاده از ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم  $\alpha$ -LA قابلیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد و استرس اکسیداتیو در کبد و ماهیچه‌های جوجه گوشتی نر نژاد راس را مهار می‌کند (۹). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تجویز داخل صفاقی  $\alpha$ -LA (۱۶-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) به مدت ۱۱ روز منجر به افزایش سطح گلووتاتیون کلیه در موش صحرائی می‌شود (۸). استفاده از  $\alpha$ -LA باعث افزایش قابل توجهی در فعالیت GPx کلیه و کبد و کاهش قابل توجه در سطوح SOD کلیه، کبد و قلب موش، در مقایسه با گروه‌های تحت تنش و کنترل شد (۳۱). با این حال تغییرات ناشی از  $\alpha$ -LA در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مانند افزایش GPx و کاهش SOD، در بافت‌های محیطی موش ممکن است به اثرات همه‌کاره آن‌ها که در سیستم اندام‌های مختلف مشاهده می‌شود کمک کند. یعنی اثر سودمند یا پرواکسیدانت  $\alpha$ -LA نه تنها به شرایط مدل مرتبط با تنش اکسیداتیو، بلکه به بافتی که برای محافظت در نظر گرفته شده است نیز بستگی دارد.

ایمنی یکی از جنبه‌های مهم طیور به دلیل ارتباط مستقیم آن با عملکرد تولید است. گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند که ایمنی تحت دمای بالای محیط سرکوب می‌شود (۱۰).

تنش اکسیداتیو، که از عدم تعادل بین سیستم‌های اکسیدان و آنتی‌اکسیدان ناشی می‌شود، باعث آسیب به سلول‌ها و بافت‌ها در حیوانات می‌شود (۷). در عین حال، نشان داده شده است که عدم تعادل در حالت تنش اکسیداتیو سطوح بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز را افزایش می‌دهد و باعث ایجاد یک سری مسیرهای سیگنالینگ می‌شود (۲).

جاین و کانان (۲۰۰۱) نشان دادند که استفاده از کروم (۱۰۰۰ نانومول در لیتر) از تحریک ترشح  $TNF-\alpha$  توسط اکسیدان شناخته شده  $H_2O_2$  در سلول‌های مونسیتی کشت شده جلوگیری می‌کند. بطور مشابه، مکمل کروم از افزایش تنش اکسیداتیو در مونسیت‌های تیمار شده با گلوکز بالا و  $H_2O_2$  جلوگیری کرد. این نشان می‌دهد که اثر مهاری کروم بر ترشح  $TNF-\alpha$  در مونسیت‌های تیمار شده با گلوکز بالا ممکن است با اثر بازدارندگی کروم بر تنش اکسیداتیو مرتبط باشد. در نتیجه، مطالعه آن‌ها برای اولین بار نشان دادند که کروم ترشح  $TNF-\alpha$  را در مدل کشت سلولی مونسیت U937 تحت درمان با گلوکز بالا مهار می‌کند. مطابق با نتایج فوق نتایج پژوهش حاضر نشان داد که شرایط تنش گرمایی و تنش اکسیداتیو ناشی از آن سبب افزایش بیان نشانگرهای التهابی می‌شود. در حالی که استفاده از افزودنی‌های آنتی‌اکسیدان (اسید آلفا لیپوئیک و پروپیونات کروم) از طریق کاهش بیان ژن‌های پیش‌التهابی می‌تواند سبب بهبود پاسخ ایمنی گردد.

بطورکلی نتایج بررسی حاضر استحصال موفق سلول‌های بنیادی مزانشیمی با شکل کشیده و دوکی، مورفولوژی فیبروبلاستی، تمایل بالای سلول‌ها جهت اتصال و تکثیر را نشان داد. به‌علاوه این سلول‌ها در شرایط تمایزی به سلول‌های استئوبلاست و آدیپوسایت تبدیل می‌شوند. این

## منابع

نتایج اولین گزارش استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدان در کشت سلول‌های بنیادی تحت شرایط تنش گرمایی را ارائه می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد استفاده همزمان از مکمل‌های کروم و اسید آلفا لیپوئیک در تیمار سلول‌های BMSCs تحت تنش حرارتی از طریق بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی اثرات مثبتی بر زنده‌مانی، عملکرد بیوشیمیایی و پاسخ ایمنی این سلول‌ها داشته است. افزودن مکمل پروپیونات کروم با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در کشت سلول‌های BMSCs تحت تنش حرارتی باعث کاهش معنی‌دار بیان اینترفرون گاما، اینترلوکین‌های ۲ و ۶ و همچنین افزایش معنی‌دار سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز گردید؛ که این تاثیرات با افزودن همزمان اسید آلفا لیپوئیک تغییرات معنی‌داری را در جهت بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و خواص ضدالتهابی نشان داد.

بنابراین به دلیل نقش اسید آلفا لیپوئیک و پروپیونات کروم در بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش پاسخ ایمنی می‌توان با افزودن این مکمل‌ها به جیره جوجه‌های گوشتی سبب کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از تنش حرارتی در آن‌ها گردید. همچنین استفاده از این ترکیبات در جهت تحقیقات کاربردی در زمینه پرورش پرندگان مقاوم در برابر تنش‌های محیطی و بیماری‌ها پیشنهاد می‌گردد.

## سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولان دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان بسبب فراهم کردن امکانات پژوهشی انجام این تحقیق، قدردانی بعمل می‌آید.

- 1- Abou-Elkhair, R., Abdo Basha, H., Slouma Hamouda Abd El Naby, W., Ajarem, J. S., Maooda, S. N., Allam, A. A., and Naiel, M. A., 2020. Effect of a diet supplemented with the *Moringa oleifera* seed powder on the

performance, egg quality, and Gene expression in Japanese laying quail under heat-stress. *Animals*, 10(5), PP: 809.

- 2- Ashraf, N. U., and Sheikh, T. A., 2015. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Free radical research*, 49(12), PP:1405-1418.
- 3- Azad, M. A. K., Kikusato, M., Sudo, S., Amo, T., and Toyomizu, M., 2010. Time course of ROS production in skeletal muscle mitochondria from chronic heat-exposed broiler chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 157(3), PP: 266-271.
- 4- Benayahu, D., Akavia, U. D., and Shur, I., 2007. Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells. *Current medicinal chemistry*, 14(2), PP: 173-179.
- 5- Bhagat, J., Ahmed, K. A., Tyagi, P., Saxena, M., and Saxena, V. K., 2008. Effects of supplemental chromium on interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) mRNA expression in response to Newcastle disease vaccine in broiler chicken. *Research in veterinary science*, 85(1), PP: 46-51.
- 6- Bin-Jumah, M., Abd El-Hack, M. E., Abdelnour, S. A., Hendy, Y. A., Ghanem, H. A., Alsafy, S. A., and Aleya, L., 2020. Potential use of chromium to combat thermal stress in animals: A review. *Science of the Total Environment*, 707, PP: 135996.
- 7- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., and Dada, R., 2017. Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 14(8), PP: 470-485.
- 8- Bustamante, J., Lodge, J. K., Marcocci, L., Tritschler, H. J., Packer, L., and Rihn, B. H., 1998.  $\alpha$ -Lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free radical biology and medicine*, 24(6), PP: 1023-1039.
- 9- Chen, P., Ma, Q. G., Ji, C., Zhang, J. Y., Zhao, L. H., Zhang, Y., and Jie, Y. Z., 2011. Dietary lipoic acid influences antioxidant capability and oxidative status of broilers. *International journal of molecular sciences*, 12(12), PP: 8476-8488.
- 10- El-Kassas, S., Abdo, S. E., El-Naggar, K., Abdo, W., Kirrella, A. A., and Nashar, T. O., 2018. Ameliorative effect of dietary supplementation of copper oxide nanoparticles on inflammatory and immune responses in commercial broiler under normal and heat-stress housing conditions. *Journal of thermal biology*, 78, PP: 235-246.
- 11- El-Kholy, M. S., El-Hindawy, M. M., Alagawany, M., El-Hack, A., Ezzat, M., and El-Sayed, S. A. E. G., 2017. Dietary supplementation of chromium can alleviate negative impacts of heat stress on performance, carcass yield, and some blood hematology and chemistry indices of growing Japanese quail. *Biological trace element research*, 179(1), PP: 148-157.
- 12- El-Senousey, H. K., Chen, B., Wang, J. Y., Atta, A. M., Mohamed, F. R., and Nie, Q. H., 2018. Effects of dietary vitamin C, vitamin E, and alpha-lipoic acid supplementation on the antioxidant defense system and immune-related gene expression in broilers exposed to oxidative stress by dexamethasone. *Poultry science*, 97(1), PP: 30-38.
- 13- Feuerecker, B., Pirsig, S., Seidl, C., Aichler, M., Feuchtinger, A., Bruchelt, G., and Senekowitsch-Schmidtke, R., 2012. Lipoic acid inhibits cell proliferation of tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer biology & therapy*, 13(14), PP: 1425-1435.
- 14- Friedenstein, A. J., Latzinik, N. V., Gorskaya, Y. F., Luria, E. A., and Moskvina, I. L., 1992. Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells. *Bone and mineral*, 18(3), PP: 199-213.
- 15- García Quiroz, F., Posada Estefan, O. M., Gallego Pérez, D., Higuera Castro, N., Sarassa Velásquez, C. A., Hansford, D. J., and López Rojas, L. E., 2008. Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells and evaluation of their osteogenic potential. *Revista Ingeniería Biomédica*, 2(3), PP: 48-55.
- 16- Guerriero, E., Sorice, A., Capone, F., Costantini, S., Palladino, P., D'ischia, M., and Castello, G., 2011. Effects of lipoic acid, caffeic acid and a synthesized lipoyl-caffeic conjugate on human hepatoma cell lines. *Molecules*, 16(8), PP: 6365-6377.
- 17- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141, PP:312-22.
- 18- He, S., Yu, Q., He, Y., Hu, R., Xia, S., and He, J., 2019. Dietary resveratrol supplementation inhibits heat stress-induced high-activated innate immunity and inflammatory response in spleen of yellow-feather broilers. *Poultry science*, 98(12), PP: 6378-6387.

- 19- Helwig, B. G., and Leon, L. R., 2011. Tissue and circulating expression of IL-1 family members following heat stroke. *Physiological Genomics*, 43(19), PP: 1096-1104.
- 20- Hietbrink, F., Koenderman, L., Rijkers, G. T., and Leenen, L. P., 2006. Trauma: the role of the innate immune system. *World Journal of Emergency Surgery*, 1(1), PP: 1-11.
- 21- Jain, S. K., and Kannan, K., 2001. Chromium chloride inhibits oxidative stress and TNF- $\alpha$  secretion caused by exposure to high glucose in cultured U937 monocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(3), PP: 687-691.
- 22- Kaiser, P., Wu, Z., Rothwell, L., Fife, M., Gibson, M., Poh, T. Y., and Shini, S., 2009. Prospects for understanding immune-endocrine interactions in the chicken. *General and Comparative Endocrinology*, 163(1-2), PP: 83-91.
- 23- Kaplan, K. A., Odabasoglu, F., Halici, Z., Halici, M., Cadirci, E., Atalay, F., and Cakir, A., 2012. Alpha-Lipoic Acid Protects against Indomethacin-Induced Gastric Oxidative Toxicity by Modulating Antioxidant System. *Journal of Food Science*, 77(11), PP: 224-H230.
- 24- Khafaga, A. F., Noreldin, A. E., and Taha, A. E., 2019. The adaptogenic anti-ageing potential of resveratrol against heat stress-mediated liver injury in aged rats: Role of HSP70 and NF-kB signalling. *Journal of thermal biology*, 83, PP: 8-21.
- 25- Koc, M., Imik, H., and Odabasoglu, F., 2008. Gastroprotective and anti-oxidative properties of ascorbic acid on indomethacin-induced gastric injuries in rats. *Biological trace element research*, 126(1), PP: 222-236.
- 26- Kuban-Jankowska, A., Gorska-Ponikowska, M., and Wozniak, M., 2017. Lipoic acid decreases the viability of breast cancer cells and activity of PTP1B and SHP2. *Anticancer research*, 37(6), PP: 2893-2898.
- 27- Li, Y., Ma, Q. G., Zhao, L. H., Wei, H., Duan, G. X., Zhang, J. Y., and Ji, C., 2014. Effects of lipoic acid on immune function, the antioxidant defense system, and inflammation-related genes expression of broiler chickens fed aflatoxin contaminated diets. *International journal of molecular sciences*, 15(4), PP: 5649-5662.
- 28- Lin, H., Decuyper, E., and Buyse, J., 2006. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144(1), PP: 11-17.
- 29- Park, S., Karunakaran, U., Ho Jeoung, N., Jeon, J. H., and Lee, I. K., 2014. Physiological effect and therapeutic application of alpha lipoic acid. *Current medicinal chemistry*, 21(32), PP: 3636-3645.
- 30- Prunet-Marcassus, B., Cousin, B., Caton, D., André, M., Pénicaud, L., and Casteilla, L., 2006. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Experimental cell research*, 312(6), PP: 727-736.
- 31- Şahin, M., Sağdıç, G., Elmas, O., Akpınar, D., Derin, N., Aslan, M., and Yargıçoğlu, P., 2006. Effect of chronic restraint stress and alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat peripheral organs. *Pharmacological research*, 54(3), PP: 247-252.
- 32- Sahin, N., Akdemir, F. A. T. İ. H., Tuzcu, M., Hayirli, A., Smith, M. O., and Sahin, K., 2010. Effects of supplemental chromium sources and levels on performance, lipid peroxidation and proinflammatory markers in heat-stressed quails. *Animal feed science and technology*, 159(3-4), PP: 143-149.
- 33- Sahin, N., Hayirli, A., Orhan, C., Tuzcu, M., Komorowski, J. R., and Sahin, K., 2018. Effects of the supplemental chromium form on performance and metabolic profile in laying hens exposed to heat stress. *Poultry Science*, 97(4), PP: 1298-1305.
- 34- Sahin, N., Sahin, K., Onderci, M., Gursu, M. F., Cikim, G., Vijaya, J., and Kucuk, O., 2005. Chromium picolinate, rather than biotin, alleviates performance and metabolic parameters in heat-stressed quail. *British Poultry Science*, 46(4), PP: 457-463.
- 35- Saleh, K. M., and Al-Zghoul, M. B., 2019. Effect of acute heat stress on the mRNA levels of cytokines in broiler chickens subjected to embryonic thermal manipulation. *Animals*, 9(8), PP: 499.
- 36- Sheline, C. T., and Choi, D. W., 2004. Cu<sup>2+</sup> toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. *Annals of Neurology: Official Journal of the American*

- Neurological Association and the Child Neurology Society, 55(5), PP: 645-653.
- 37- Simbula, G., Columbano, A., Ledda-Columbano, G. M., Sanna, L., Deidda, M., Diana, A., and Pibiri, M., 2007. Increased ROS generation and p53 activation in  $\alpha$ -lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells. *Apoptosis*, 12(1), PP: 113-123.
- 38- Yun, S. H., Moon, Y. S., SoHn, S. H., and Jang, I. S., 2012. Effects of cyclic heat stress or vitamin C supplementation during cyclic heat stress on HSP70, inflammatory cytokines, and the antioxidant defense system in Sprague Dawley rats. *Experimental animals*, 61(5), PP: 543-553.
- 39- Zha, L. Y., Xu, Z. R., Wang, M. Q., and Gu, L. Y., 2008. Chromium nanoparticle exhibits higher absorption efficiency than chromium picolinate and chromium chloride in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(2), PP: 131-140.
- 40- Zhang, W. J., and FREI, B., 2001.  $\alpha$ -Lipoic acid inhibits TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *The FASEB Journal*, 15(13), PP: 2423-2432.

# The effect of chromium and alpha lipoic acid supplements on proliferation, survival, antioxidant status, and immune response of chicken bone marrow mesenchymal stem cells under heat stress

Mirzaie H.<sup>1</sup>, Aghaie A.<sup>\*1</sup>, Hoveizi E.<sup>2</sup> and Nazari M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, I.R. of Iran

<sup>2</sup>Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. of Iran

## Abstract

**Background and Objective:** The simultaneous effect of chromium and alpha lipoic acid supplements on mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of broilers (BMSCs) has not been determined yet. This study aims to investigate the effects of chromium and alpha lipoic acid supplements on the proliferation and viability of BMSCs, the antioxidant status and the immune response of cultured cells under heat stress. **Materials and Methods:** BMSCs were isolated from day-old Ras 308 breed chicks and confirmed by assessing the expression of surface markers using flowcytometry. The experimental groups include cells without any treatment, heat-shocked cells, and heat-shocked cells treated with 100  $\mu$ M chromium propionate and 100  $\mu$ M alpha-lipoic acid separately and simultaneously. The BMSCs were then evaluated based on their morphology, cell survival, measurement of antioxidant factors, and the expression level of genes associated with immunity. **Results:** The isolated BMSCs displayed a fibroblastic morphology and were confirmed through flowcytometry and differentiation potential assays. The highest activity levels of SOD, CAT, GPX, and TAC enzymes were observed in the alpha-lipoic group under heat shock and respectively, in the simultaneous group 45.58 units/ml, 11.64, 37.22, and 0.45 units/mg were evaluated, which compared to the other groups was significantly ( $P \leq 0.05$ ) changed. The expression of IL-2, IL-6, and INF- $\gamma$  was evaluated as 0.67, 0.97, and 2.0 in the simultaneous group, respectively, and a significant change ( $P \leq 0.05$ ) was observed in comparison with other groups. **Conclusion:** The results showed that the utilization of antioxidant supplements in heat shock conditions resulted in improved antioxidant and immune responses.

**Key words:** Mesenchymal Stem Cells, alpha-lipoic acid, chromium, immune response, antioxidant status.