مجله علمي دانشگاه علوم پزشكي كردستان/ دوره سيزدهم/ بهار ۱۳۸۷/ ۱۲-۱

بررسي توانائي تمايز سلولهاي بنيادين عصبي مغز موش بالغ در مقايسه با جنين موش به سلولهاي اندوتليال

دكتر فردين فتحي[۱]، عباس جعفري كرماني[۲]، مرتضي ابوذري[۳]، مسعود علاسوند[۴]، دكتر صلاح الدين احمدي[۵]، دكتر محمد جعفر رضائي[۶]، دكتر آرش پولادي[۷]

۱- استاديار گروه علوم تشريح دانشگاه علوم پزشكي كردستان، دانشكده پزشكي،گروه علوم تشريح، KDRC، آزمايشگاه تحقيقاتي سلولي مولكولي (مؤلف مسؤول) farfath@yahoo.com
۲- كارشناس ارشد ژنتيك، دانشگاه تربيت مدرس، دانشكده علوم پايه، گروه ژنتيك
۳- كارشناس ارشد علوم تشريح، دانشگاه علوم پزشكي كردستان، دانشكده پزشكي، گروه فيزيولوژي
۴- كارشناس ارشد گروه فيزيولوژي، دانشگاه علوم پزشكي كردستان، دانشكده پزشكي، آزمايشگاه تحقيقاتي سلولي مولكولي
۵- استاديار گروه فيزيولوژي، دانشگاه علوم پزشكي كردستان
۶- PhD جنين شناسي، استاديار دانشگاه علوم پزشكي كردستان
۷- پزشك عمومي، كارشناس آموزشي مركز مطالعات و توسعه آموزش پزشكي

چكيده

زمينه و هدف: سلولهاي بنيادي عصبي در نواحي مختلفي از سيستم عصبي مركزي در حال تكامل و بالغ وجود دارند. اين سلولها تمايز نيافته بوده و علاوه بر تجديد خود، قادرند سلولهاي عصبي و گليال را توليد كنند. علاوه بر توليد انواع مختلفي از سلولهاي عصبي، سلولهاي بنيادي عصبي قادر به توليد سلولهاي ساير بافتها نيز مي‌باشند. در اين مطالعه سلولهاي بنيادي عصبي از مغز جنين و موش بالغ جداسازي شده و توانائي آنها به سلولهاي اندوتليال مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسي: سلولهاي بنيادي عصبي از ديواره طرفي بطن طرفي مغز موش بالغ و نيز قشر مغز جنينهاي موش جداسازي گرديد و در محيط كشت DMEM-F12 عاري از سرم و حاوي فاكتورهاي رشد bFGF و EGF و مكمل B27 كشت داده شدند. جهت القاي تمايز، سلولها در محيط كشت حاوي ۱۰ درصد سرم جنين گاوي و ديشهاي كشت آغشته به فيبرونكتين كشت داده شدند. از ارزيابيهاي ايمونوسيتوشيمي، RT-PCR و Tube Formation Assay جهت ارزيابي سلولهاي تمايز يافته استفاده گرديد.

يافته‌ها: نتايج مشاهدات انجام شده در اين پژوهش نشان داد كه كشت سلولهاي بنيادي عصبي جنيني در ديشهاي آغشته به فيبرونكتين و محيط كشت تمايزي محتوي ۱۰ درصد سرم جنيني گاوي منجر به القاي تمايز سلولهاي بنيادي عصبي جنيني به سلولهاي اندوتليال مي‌شود. موقعي كه سلولهاي تمايز يافته به ماتريكس خارج سلولي يا ماتري ژل منتقل شدند ساختارهاي شبه مويرگي كه از مشخصه‌هاي سلولهاي اندوتليال است را تشكيل دادند. نتايج ارزيابيهاي ايمونوسيتوشيمي و RT-PCR نشان داد كه سلولهاي تمايز يافته قادر به جذب ليپوپروتئين با چگالي پائين و بيان ژنهاي CD31، VE-cadherin و Flk-1 بوده و نيز به BS-1 Lectin متصل مي‌شوند. بر خلاف سلولهاي بنيادي عصبي جداسازي شده از مغز جنين موش، سلولهاي جداسازي شده از مغز موش بالغ به سلولهاي اندوتليال تمايز پيدا نكردند.

نتيجه‌گيري: سلولهاي بنيادي عصبي جداسازي شده از مغز جنين موش و مغز موش بالغ در تمايز به سلولهاي اندوتليال رفتار مشابهي را از خود نشان نمي‌دهند.

كليد واژه‌ها: سلولهاي بنيادين عصبي، سلولهاي اندوتليال، ساختارهاي شبه مويرگي، تمايزسلولي

وصول مقاله: ۸۶/۸/۱۲ اصلاح نهايي: ۸۶/۱۰/۳۰ پذيرش مقاله: ۸۷/۲/۱

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]

مقدمه

سلولهاي بنيادي عصبي (NSCs) سلولهاي پيش سازي هستند كه توانايي تمايز به انواع مختلف سلولهاي موجود در CNS (شامل نورونها، آستروسيتها و اليگودندروسيتها) را دارا مي‌باشند (۱) و تاكنون از بافت مغز اكثر گونه‌ها و بويژه موش، رت و انسان جداسازي شده‌اند (۲). سلولهاي بنيادي عصبي داراي پتانسيل زيادي جهت درمان آسيبهاي CNS مي‌باشند، چرا كه اين سلولها بدليل داشتن ماهيت عصبي قادرند به انواع سلولهاي عصبي و گليال تمايز يافته و لذا در هنگام پيوند، قدرت سازگاري بيشتري را با بافت ميزبان دارا مي‌باشند. استفاده از سلولهاي بنيادي عصبي، مي‌تواند منجر به تشكيل نورونهايي در محل ضايعه گردد كه توانايي ارسال اطلاعات سيناپسي را دارا مي‌باشند. از طرفي ممكن است سلولهاي استفاده شده در محل ضايعه، سلولهاي گليالي را در محل پيوند تشكيل دهند كه علاوه بر حمايت نروتروفيك، در فرايند ميلينه شدن اكسونهاي جديد يا اكسونهاي دميلينه شده ميزبان نيز شركت كنند (۳, ۴). سلولهاي بنيادي عصبي علاوه بر توليد سلولهاي عصبي، قادر به توليد سلولهاي ساير بافتها نيز مي‌باشند (۵, ۶). گزارش شده است كه NSCs در شرايط آزمايشگاهي قادر به توليد سلولهاي عضله صاف بوده كه اين سلولها داراي عمل انقباضي مشابهي با سلولهاي عضلاني بدن هستند (۷). اين مشاهدات ممكن است بيان كننده نقش سلولهاي بنيادي عصبي در توليد بخشي از سلولهاي عضله صاف باشند. از آنجا كه سلولهاي بنيادي عصبي در طي تكامل طبيعي دستگاه عصبي مركزي، در مناطق بطني و تحت بطني واقع مي‌شوند، ممكن است در تشكيل عروق خوني مغز نيز نقش داشته باشند. عروق خوني شامل سلولهاي آندوتليال، كه داراي منشاء مزودرمي بوده و سلولهاي ديواره‌اي عروق مي‌باشند. عروق خوني تغذيه كننده مغز از لايه زاياي نورواكتودرم مشتق مي‌شوند، ناحيه‌اي كه در آن هيچ سلول آنژيوژنيكي توليد نمي‌گردد. مطالعات اخير نشان مي‌دهند كه سلولهاي بنيادي عصبي به دست آمده از رويان انسان چندين ماركر سلولهاي آندوتليال و نيز سلولهاي بنيادي هماتوپويتيك را بيان مي‌كنند (۸ , ۹). همچنين يك گزارش جديد اين نظريه را تقويت مي‌كند كه سلولهاي بنيادي عصبي جداسازي شده از جنين موش توانايي تمايز به سلولهاي آندوتليال عروقي را دارا مي‌باشند (۹). آنژيوژنزيس در ايسكمي اندامهاي حياتي داراي نقش بسيار مهمي مي‌باشد و استراتژي توسعه عروق خوني جانبي (collateral)، كه ايجاد كانال فرعي طبيعي به دور شريان مسدود شده است، به آنژيوژنزيس

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]

درماني موسوم مي‌باشد (۱۰). سلولهاي بنيادي به دليل توانائي تمايزيشان به سلولهاي مختلف، به منظور كمك به فرايند آنژيوژنزيس هم مورد توجه قرار گرفته‌اند. اخيراً Oishi و همكاران نشان دادند كه سلولهاي بنيادي عصبي جداسازي شده از كورتكس مغز جنين موش قادرند به سلولهاي اندوتليال تمايز پيدا كنند (۷). در اين مطالعه پتانسيل سلولهاي بنيادي عصبي جداسازي شده از مغز موش بالغ (براي اولين بار) و مغز جنين موش در تمايز به سلولهاي آندوتليال مورد بررسي قرار گرفته و از ارزيابيهاي PCR و ايمونوسيتوشيمي جهت تاييد ماهيت اندوتليالي سلولهاي تمايز يافته استفاده شد. هدف از اين مطالعه، مقايسه توانايي تمايز سلولهاي بنيادين عصبي مغز موش بالغ و جنين موش به سلولهاي اندوتليال است.

روش بررسي

جداسازي و القاي تمايز سلولهاي بنيادي عصبي به سلولهاي آندوتليال

ابتدا ديواره طرفي شاخ قدامي بطنهاي جانبي مغز موش بالغ يا كورتكس جنين موش در روز ۱۲/۵ (E12.5) به بافر HBSS حاوي 0.7 mg/ml هيالورونيك اسيد، 0.2mg/ml كينورنيك اسيد 1.33mg/ml تريپسين و گلوكز ۲ ميلي مولار منتقل شده و به مدت ۳۰ دقيقه در دماي ۳۷ درجه انكوبه شدند. سپس سلولها به مدت ۵ دقيقه با دور 200g سانتريفيوژ گرديد و به HBSS حاوي سوكروز 0.9 مولار انتقال يافتند. پس از تهيه سوسپانسيوني از سلولها، بمدت ۱۰ دقيقه با دور 750 g سانتريفيوژ شدند. در مرحله بعد سلولها در ۲ ميلي‌ليتر محيط كشت حل شده و سپس به آرامي روي سطح ۱۰ ميلي‌ليتر EBSS حاوي BSA منتقل شدند. سلولها با دور 200g بمدت ۷ دقيقه سانتريفيوژ شده و يكبار با استفاده از محيط كشت DMEM/F12 شستشو داده شدند. سلولهاي بنيادي عصبي جداسازي شده از مغز جنين و مغز موش بالغ بطور جداگانه در محيط كشت DMEM-F12 حاوي EGF 20ng/ml، 20ng/ml bFGF، مكمل B27، ۲ ميلي مولار گلوتامين، 100U/ml پني‌سيلين و 100µg/ml استرپتومايسين كشت داده شدند.پس از يك هفته در اثر تكثير سلولهاي بنيادي، نوروسفيرهاي اوليه در محيط كشت تشكيل شده كه از طريق پاساژهاي متوالي تكثير شدند. در پاساژهاي ۳ الي ۵ به منظور القاي تمايز سلولهاي بنيادي عصبي به سلولهاي آندوتليال، ۵ الي ۱۰ نوروسفير به ديشهاي كشت ۴ چاهكي كه با فيبرونكتين (Sigma) پوشش داده شده بودند (Fibronectin coated)، منتقل شده و در محيط كشت تمايزي كشت داده شدند (Differentiation medium). محيط تمايزي همان محيط كشت تكثيري سلولها (DMEM/F12) بود كه فاقد فاكتورهاي رشد و

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]

داراي ده درصد سرم جنين گاوي (FBS) بود.

ارزيابي‌هاي مورفولوژيك و ايمونوسيتوشيمي

در طول آزمايش از ميكروسكوپ معكوس فلورسنت (Nikon –TE 300) جهت ارزيابي سلولها استفاده شد. به منظور انجام ارزيابي‌هاي ايمونوسيتوشيمي، سلولهاي تمايز يافته در روز هشتم به مدت ۷ دقيقه در دماي اتاق با استفاده از متانول با دماي ۲۰- (Merck) يا پارافرمالدئيد ۴ درصد در دماي اتاق فيكس شدند. از بافر بلاك كننده حاوي Triton X-100 و سرم گونه‌اي كه آنتي‌بادي ثانويه از آن تهيه شده بود، جهت نفوذ پذيري سلولها و مهار آنتي‌ژنهاي غير اختصاصي كه احتمال اتصال آنتي بادي ثانويه به آنها وجود داشت، استفاده شد. جهت تاييد ماهيت فنوتيپي سلولهاي تمايز يافته آنتي بادي اوليه بر عليه (Santacruz,Goat anti mouse) CD31، و آنتي بادي اوليه بر عليه (Santacruz,Rat anti mouse) VE- cadherin[1] هر دو با غلظت ۱۰۰ به مدت ۲ ساعت در دماي۳۷ درجه به سلولها اعمال شدند.

آنتي بادي ثانويه متصل به (Santacruz, Texaz Red Donkey anti goat) و آنتي‌بادي ثانويه متصل به (Santacruz, Goat anti Rat) FITC[1] با غلظت ترتيب جهت اتصال به ۱۰۰ آنتي‌بادي بر عليه CD31 و VE- cadherin، به مدت يك ساعت در دماي اتاق، اعمال گرديد. يكي از روشهاي مورد استفاده جهت تشخيص سلولهايي با ويژگي اندوتليالي، ارزيابي توانائي سلولها در جذب ليپوپروتئين اشباع شده كم چگال (Dil-Ac-LDL: Acetylated low-density lipoprotein) است. ماده مذكور با ماده فلورسنت Dil كونژوگه شده است و اختصاصاً بوسيله رده‌هاي سلولي با ماهيت اندوتليالي جذب مي‌شود. در اين مطالعه به منظور بررسي توانائي سلولها در جذب ليپوپروتئين كم چگال، از Dil-Ac-LDL (Biomedical Thechnologi Inc.) با غلظت ۱۰ ميكروگرم در هر ميلي ليتر استفاده شد. همچنين به منظور تائيد فنوتيپ اندوتليالي سلولهاي تمايز يافته، از يكي ديگر از ماركرهاي اختصاصي سلولهاي اندوتليال، BS-1 lectin (Vector laboratori) با غلظت g/ml ۵µ كه كونژوگه به FITC بود استفاده شد. پس از شستشوي سلولها با بافر فسفات، از Vector hard set (Vector Laboratories) كه همراه آن رنگ DAPI هم موجود بود، جهت ماونت كردن سلولها استفاده شد و نهايتاً سلولها به كمك ميكروسكوپ فلورسانت مطالعه و عكسبرداري شدند.

ارزيابي RT- PCR

از RT-PCR جهت تأييد بيان ژنهاي مورد مطالعه (جدول ۱) استفاده شد. براي اين منظور، ابتدا با استفاده از محلول RNX (Plus)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]

[سيناژن] RNA ي كل را از حدود 5×10^5 سلول استخراج نموده و پس از اطمينان يافتن از كيفيت RNA استخراج شده با انجام الكتروفورز ژل آگارز و اسپكتروفومتري، جهت تهيه cDNA از پرايمر oligo(MWG-Biotech AG) dT و كيت RT (Bioneer) استفاده شد. واكنشRT در حجم نهائي ۵۰ ميكروليتر انجام گرفت. پس از تهيه cDNA، واكنش PCR جهت تكثير قطعه مورد نظر انجام گرفت. واكنشPCR در حجم نهائي ۲۰ ميكروليتر انجام شد و جهت تهيه حجم مذكور علاوه بر DNA الگو (محصول واكنش RT) از كيت PCR (Bioneer)، آب مقطر استريل و پرايمرهاي بالا دست[1] و پايين دست[2]، با مشخصات مورد اشاره در جدول يك استفاده شد. پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واكنش، واكنش PCR با شرايط Denaturation ۴۵ ثانيه در دماي ۹۴ درجه سانتيگراد، Annealing۴۵ ثانيه در دماي ۶۴-۶۳ درجه سانتيگراد (بر اساس نوع پرايمر) و Extention ۱ دقيقه در دماي ۷۲ درجه سانتيگراد انجام گرفت. تعداد ۳۵ سيكل و يك سيكل extention نهايي به مدت پنج دقيقه در ۷۲ درجه سانتيگراد در نظر گرفته شد. جهت انجام هر دو واكنش RT و PCR از دستگاه ماستر سايكلر (Eppendorf) استفاده شد. ژن GAPDH بعنوان كنترل داخلي مورد استفاده قرار گرفت. بعد از اتمام واكنش ۸ ميكروليتر از محصول واكنش PCR توسط الكتروفورز ژل آگارز يك درصد بررسي شد. پرايمرهاي مورد استفاده در اين مطالعه با كمك نرم افزار Gene runner طراحي شدند.

1. Forward
2. Reverse

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]

جدول ۱: اسامي ژنها و توالي مربوط به پرايمرهاي بالا دست (F) و پائين دستي (R) كه در اين پژوهش استفاده شدند.

Genes	Length (bp)	Primer Sequences (5' -> 3')	Annealing Temperature (°C)
GAPDH	308	GCCCATCACCATCTTCCAG TGAGCCCTTCCACAATGCC	64
CD31(PECAM-1)	261	GTCATGGCCATGGTCGAGTA CTCCTCGGCATCTTGCTGAA	63
Flk-1	530	AAGGTGCCCAGGAAAAGAC CTTGCCCCGTAAGTAAGTTG	64
VE-Cadherin	457	GGCTTTCTGACTGTTGTGGAC TTATAGATGTTTCCCTGCTTGG	64

ارزيابي توانائي تشكيل ساختارهاي شبه مويرگي (Tube Formation) در سلولهاي تمايز يافته

به منظور ارزيابي توانائي عملكردي سلولها به صورت In vitro ، نوروسفيرهائي كه در محيط تمايزي كشت داده شده بودند در روز سوم آزمايش تريپسينيزه شده و حدود 1×10^5 از سلولهاي حاصله به هر چاهك از ديش چهار چاهكي كه حاوي ماتري ژل (Sigma) بودند، منتقل شدند. سلولها در محيط تمايزي كشت داده شدند و بعد از گذشت ۲۴ الي ۴۸ ساعت بوسيله ميكروسكوپ معكوس مطالعه و عكسبرداري شدند.

يافته ها

نتايج ارزيابيهاي مورفولوژيك و ايمونوسيتوشيمي

نتايج بدست آمده از اين پژوهش نشان داد در صورتي كه سلولهاي بنيادين عصبي مغز جنين موش در ديشهاي كشت آغشته شده با فيبرونكتين و در محيط كشت DMEM-F12 حاوي ۱۰ درصد FBS كشت داده شوند، بتدريج به سلولهاي پيش ساز انداوتليال تمايز يافته و مورفولوژي سنگفرشي كه مختص سلولهاي انداوتليال است را كسب مي‌كنند (شكل ۱). همچنين سلولهاي تمايز يافته توانائي تشكيل ساختارهاي شبه مويرگي (Tube Formation) را كسب كرده، بطوريكه سلولها در تشكيل ساختارهاي مذكور شركت كردند. سلولهاي مذكور قادر به جذب ليپوپروتئين با چگالي كم و نيز اتصال به BS-1 Lectin (شكل ۲) و همچنين بيان ژنهاي CD31 و VE-cadherin بودند (شكل ۳).

به منظور تائيد فنوتيپ انداوتليالي و ارزيابي ايمونو سيتوشيمي سلولهاي

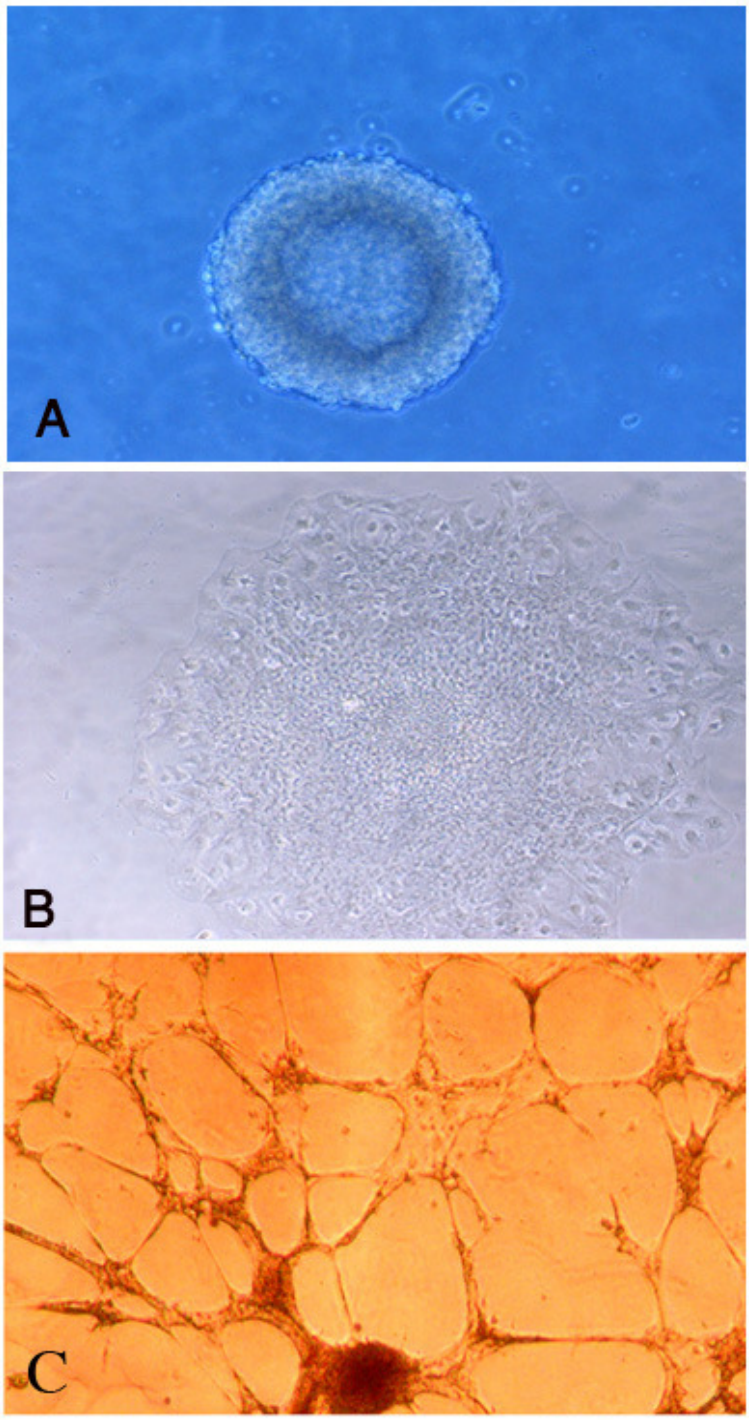
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]

تمايز يافته در روز هشتم مطالعه از ماده Dil-Ac-LDL نيز استفاده شد. تقريباً تمام سلولهائي كه جهت ارزيابي استفاده شدند داراي توانائي جذب Dil-Ac-LDL و نيز قابليت اتصال به BS-1 Lectin بودند (شكل ٢). سلولهائي كه آنتي بادي CD31به آنها متصل شده بود بدليل اينكه آنتي بادي ثانويه بر عليه آنها كونژوگه به يك ماده فلورسنت با رنگ قرمز بود (Texaz Red) با فيلتر Texaz-red به رنگ قرمز و سلولهائي كه BS-1 lectin به آنها متصل شده بود چون كونژوگه به رنگ فلورسنت سبز بود با فيلتر FITC به رنگ سبز قابل مشاهده بودند. همچنين سلولهائي كه آنتي بادي بر عليه VE-cadherin به آنها متصل شده بود نيز بدليل اينكه آنتي بادي ثانويه بر عليه آنتي بادي اوليه كونژوگه به رنگ فلورسنت سبز بود با فيلتر FITC به رنگ سبز قابل مشاهده بودند (شكل ٣). در گروه كنترل منفي كه از آنتي بادي اوليه جهت ارزيابي آنها استفاده نشده بود، اما مشابه بقيه سلولهاي گروه آزمايش، ساير مراحل بر روي آنها انجام شد و هيچگونه سيگنال فلورسنت قرمز يا سبزي در آنها مشاهده نگرديد. از آنجائيكه نتايج ارزيابي PCR در مورد سلولهاي تمايز يافته حاصل از سلولهاي بنيادي مغز موش بالغ منفي بود از ارزيابي ايمونوسيتوشيمي جهت تاييد ماهيت اندوتليالي سلولها استفاده نشد اگرچه در بررسيهاي مورفولوژيك سلولهاي سنگفرشي زيادي در طول آزمايش مشاهده شدند.

نتايج ارزيابي PCR

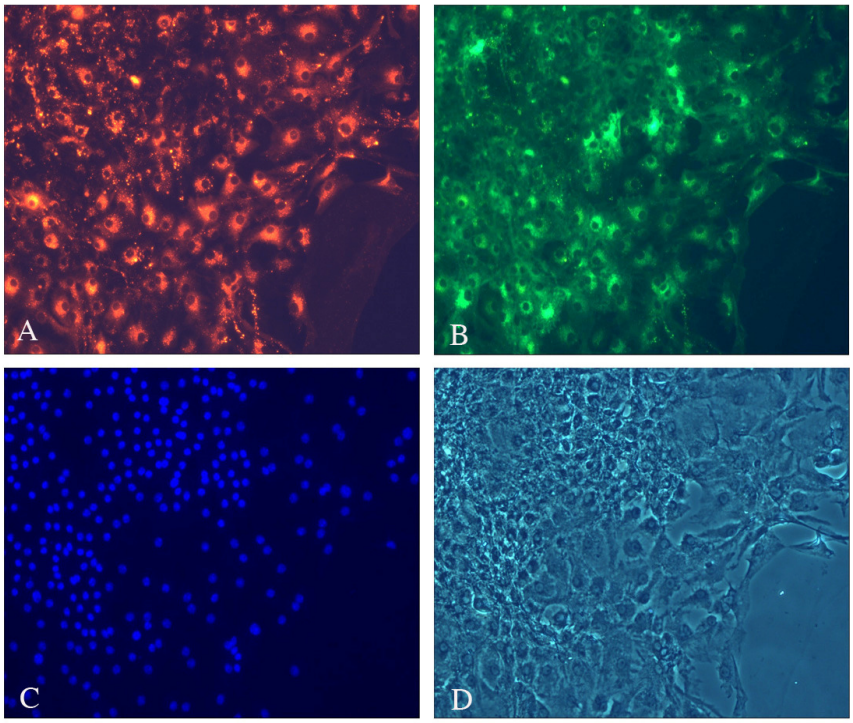
علاوه بر ارزيابيهاي مورفولوژيك و ايمونوسيتوشيمي، بيان ژنهاي اختصاصي سلولهاي اندوتليال در سلولهاي مورد مطالعه، به روش RT-PCR مورد ارزيابي قرار گرفت. بيان ژنهاي Flk-1، VE_cadherin و CD31 در سلولهاي تمايز يافته از سلولهاي بنيادي عصبي جنيني مشاهده شد در حاليكه نتيجه ارزيابي براي سلولهاي تمايز يافته از سلولهاي بنيادي عصبي بالغ منفي بود. اندازه باندهاي مربوط به ژنهاي مورد مطالعه مطابق با الگوي پرايمر طراحي شده بود (شكل ٤).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]

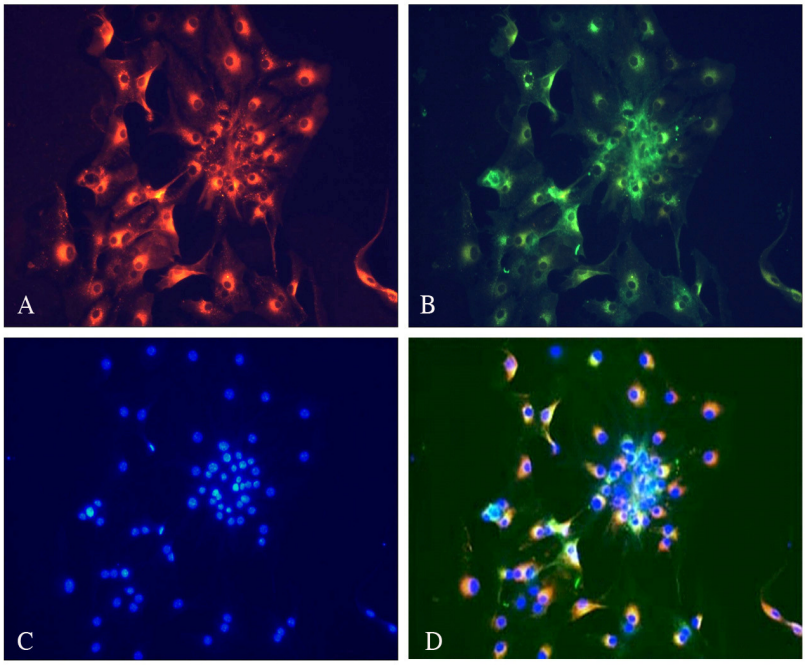


شكل ۱: A) نمائي از يك نوروسفير اوليه كه حدود ۸ روز بعد از جداسازي سلولهاي بنيادي عصبي از مغز تشكيل شده است.B) سلولهاي بنيادي عصبي در محيط كشت تمايزي و ديشهاي آغشته به فيبرونكتين كشت داده شدند، .بتدريج اين سلولها به سلولهاي اندوتليال تمايز يافته و مورفولوژي سنگفرشي كسب نمودند. C) ۴۸ ساعت پس از انتقال سلولهاي تمايز يافته (روز سوم) بر روي ماتري ژل، توانستند ساختارهاي شبه مويرگي (Tube Formation) را تشكيل دهند. بزرگنمائي تصوير A 100 و بقيه تصاوير ۲۰۰ است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]

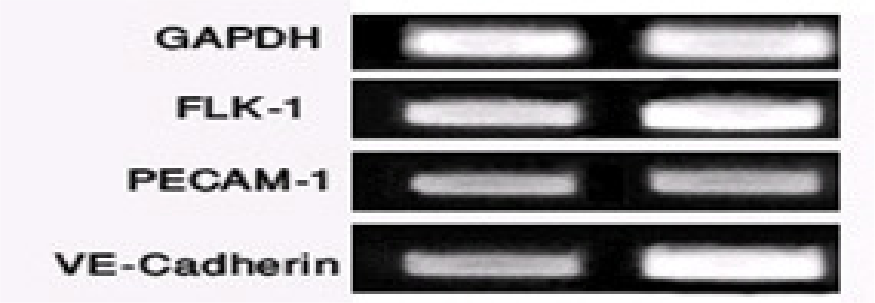


شكل ۲: A) درصد بالائي از سلولهاي تمايز يافته را نشان مي‌دهد كه ليپوپروتئين كم چگال كونژوگه به Dil كه يك رنگ فلورسنت قرمز است را جذب كرده‌اند B) همان سلولها را نشان مي‌دهد كه به BS-1 lectin متصل شده‌اند. C) هسته سلولها در نتيجه رنگ‌آميزي با رنگ DAPI به رنگ آبي ديده مي‌شوند. D) تصوير فاز كنتراست سلولهاي تصوير قبلي را نشان مي‌دهد.



شكل ۳: تصاوير ايمونسيتوشيمي مربوط به سلولهاي اندوتليال حاصل از تمايز سلولهاي بنيادين عصبي: A) واكنش مثبت سلولهاي تمايز يافته به آنتي‌بادي بر عليه CD31 را نشان مي‌دهد. B) واكنش مثبت سلولهاي تمايز يافته به آنتي‌بادي بر عليه VE-cadherin را نشان مي‌دهد. هسته سلولها در تصاوير A و B با DAPI رنگ شده‌اند (بزرگنمايي x ۲۰۰)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]



شکل ۴: بررسي بيان ژنهاي FLK-1، CD31(PECAM-1) و VE-cadherin با استفاده از تکنيک RT-PCR. :همانطور که مشاهده ميشود، کشت دادن سلولهاي بنيادين عصبي جدا سازي شده از مغز جنين موش در ديشهاي پوشانده شده با فيبرونکتين و محيط کشت DMEM-F12 حاوي ۱۰ درصد FBS باعث ميشود که اين سلولها بتدريج به سلولهاي اندوتليال تمايز يابند. به طوريکه در روز ۸ آزمايش سلولها ژنهاي FLK-1 ، CD31 و VE-cadherin که از ماركرهاي اختصاصي سلولهاي اندوتليال هستند را بيان ميکنند. از ژن GAPDH بعنوان کنترل داخلي استفاده شد.

بحث

نتايج اين مطالعه نشان داد سلولهاي بنيادي عصبي جداسازي شده از مغز جنين موش قادرند تحت شرايط خاص آزمايشگاهي به سلولهاي آندوتليال تمايز يابند در حاليکه تحت شرايط مشابه سلولهاي جداسازي شده از مغز جنين موش بالغ فاقد اين توانائي ميباشند. ماهيت بنيادي سلولهاي مورد استفاده در اين مطالعه در ابتداي مطالعه با انجام ارزيابي PCR تاييد شد (اطلاعات نشان داده نشده است).

سلولهاي بنيادي عصبي بعد از جداسازي قادرند به شکل يک توده بنام نوروسفير رشد کنند. سلولهاي تمايز نيافتهاي که نوروسفيرها را تشکيل ميدهند در معرض فاکتورهاي رشد bFGF و EGF تکثير شده و قادر به بيان آنتيژن نستين ميباشند، اين سلولها به نورونها و آستروسيتها تمايز ميابند و لذا سلولهاي بنيادي عصبي نام گرفتهاند (۹). اخيراً شواهدي ارائه شده است مبني بر اينکه سلولهاي بنيادي عصبي پتانسيل تمايزيشان وسيعتر از آن است که در گذشته تصور ميشد، بطوريکه اين سلولها قادرند به سلولهاي غير عصبي هم تمايز يابند، به عبارت ديگر به سلولهايي تمايز پيدا کنند که از يک لايه زاياي غير نورواکتودرمي مشتق ميشوند (۹).

Parati و همکاران گزارش کردند که سلولهاي بنيادي عصبي جدا شده از جنين انسان بعضي از ماركرهاي اختصاصي سلولهاي اندوتليال را بيان ميکنند (۸). اين يافته اين فرضيه را پايهريزي کرد که احتمالاً سلولهاي بنيادي عصبي قادرند به سلولهاي اندوتليال تمايز يابند. در همين راستا Oishi و همکاران طي انجام مطالعهاي که جهت

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]

اثبات اين فرضيه طرح ريزي كردند و اقدام به تمايز سلولهاي بنيادي عصبي جداسازي شده از مغز جنين موش به سلولهاي اندوتليال نمودند و اين محققين گزارش كردند كه سلولهاي اندوتليال تمايز يافته ماركرهاي مخصوص سلولهاي اندوتليال را بيان مي‌كنند (۹). با اين وصف در مطالعه حاضر بيان مخصوص سلولهاي اندوتليال در سلولهاي حاصل از تمايز سلولهاي بنيادي عصبي جداسازي شده از مغز موش بالغ مشاهده نشد. نتايج اين مطالعه نشان مي‌دهد كه سلولهاي بنيادي عصبي جنيني و بالغ پتانسيل و رفتار تمايزي متفاوتي را از خود نشان مي‌دهند. اما اينكه توانائي سلولهاي بنيادي عصبي جنيني (مشتق از اكتودرم) به سلولهاي اندوتليال (از مشتقات مزودرم) به چه صورت قابل توجيه است، هم مي‌توان فرض كرد كه توانائي تمايز به سلولهاي اندوتليال از خواص ويژه سلولهاي بنيادي عصبي جنيني است و هم اينكه ممكن است سلولهاي بنيادي نادري با منشاء غير عصبي در دستگاه عصبي مركزي وجود داشته باشند كه داراي قدرت انعطاف پذيري (Plasticity) بيشتري مي‌باشند. در راستاي اثبات فرضيه دوم، اخيراً محققين توانسته‌اند علاوه بر مغز استخوان و عضله اسكلتي از مغز موش هم سلولهاي مزانشيمي پر استعدادي را جدا سازي كنند (۱۱ , ۱۰)، بطوريكه اين سلولها قادرند در محيط آزمايشگاه تكثير شده و به سلولهاي مشتق از هر سه لايه جنين يعني لايه‌هاي مزودرم، اكتودرم و آندودرم تمايز يابند. لذا ممكن است يك آلترناتيو محتمل از اين سلولهاي مزانشيمي، در نوروسفيرهاي (متشكل از سلولهاي بنيادي عصبي جنيني) تكثير شده در حضور bFGF وجود داشته و به سلولهاي اندوتليال تمايز يابد. از طرف ديگر آنچه اين فرضيه را غير محتمل مي‌سازد اين واقعيت است كه سلولهاي بنيادي مزانشيمي، در مقايسه با سلولهاي بنيادي عصبي، براي رشد در محيط آزمايشگاه به مواد متفاوت ديگري همانند LIF و PDGF نياز دارند در حاليكه سلولهاي بنيادي عصبي به bFGF نياز دارند (۱۲ , ۹). همچنين نتايج اين مطالعه نشان داد كه فرضيه مذكور در مورد سلولهاي بنيادي عصبي بالغ صادق نيست. Vogel و همكاران (۱۲) گزارش كردند كه سلولهاي بنيادي عصبي جدا شده از نوروسفيرهاي تكثير يافته در محيط آزمايشگاه، تجمع كاملاً خالصي از سلولهاي بنيادي را به نمايش نمي‌گذارند، لذا يك احتمال ممكن در مورد توانائي تمايزي سلولهاي بنيادي عصبي به سلولهاي اندوتليال اين است كه برخي از سلولهاي بنيادي عصبي در نوروسفيرها، مجدداً دچار برنامه‌ريزي ژنتيكي شده و خواص تكاملي پروژنيتورهاي عروقي را

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]

کسب کرده باشند. با افزایش تعداد پاساژها، سلولهاي بنیادي عصبي ویژگیهاي جدیدي پیدا مي‌کنند که از جمله آنها مي‌توان به افزایش چسبندگي، تسریع میزان رشد، تکامل وابسته به فاکتورهاي رشد و تغییراتي در الگوي بیان ژني آنها اشاره کرد (۱۳ , ۹). در این مطالعه، ما نیز همانند Oishi و همکاران از پاساژهاي ۵-۲ سلولهاي بنیادي عصبي استفاده کردیم تا این احتمالات را تا حد امکان حذف کنیم (۹).

مشخصه‌هاي تکاملي دودمان سلولهاي آندوتلیال هنوز به طور کامل به اثبات نرسیده است. تعیین منشاء عروق خوني که سیستم عصبي را تغذیه مي‌کنند از اهمیت خاصي برخوردار است. بایستي به این سؤال پاسخ داده شود که آیا عروق خوني مغز از سلولهاي لایه زایاي اکتودرمي منشاء مي‌گیرند که هیچ سلول آنژیوژنیکي ندارد یا خیر؟ اخیراً به این باور رسیده‌اند که سلولهاي آندوتلیال و سلولهاي دیواره‌اي عروق پیش سازهاي متفاوتي دارند (۹). اگرچه انجام مطالعه‌اي در زمینه تمایز سلولهاي بنیادي رویاني موش به سلولهاي رگساز نشان داد که سلولهاي Flk-1 مثبت مشتق از بنیادي رویاني که به عنوان سلولهاي پیش ساز عروق شناخته شده‌اند قادرند هر دو نوع سلولهاي آندوتلیال و سلولهاي دیواره عروق را تولید کنند و از این طریق نقش مهمي را در آنژیوژنز طبیعي ایفا مي‌کنند (۱۴). Palmar و همکاران گزارش کردند که هم نوروژنز و هم آنژیوژنز درون توده‌هاي تزایدي محکمي که مرتبط با عروق ریز منطقه ساب گرانول هایپوکامپ است رخ مي‌دهند. نتایج ارزیابي ایمونوهیستوشیمي نشان داد که این توده‌هاي پرولیفراتیو مشتمل بر سلولهاي پیش ساز عصبي، نوروبلاستها، سلولهاي گلیال و سلولهاي پیش ساز اندوتلیال مي‌باشند (۱۵). Oishi و همکاران نیز در مطالعه خود الگوي بیاني مشابهي را در سلولهاي تمایز یافته از سلولهاي بنیادي عصبي جنین موش گزارش کردند. لذا این احتمال وجود دارد که در مغز سلولهاي پیش ساز اندوتلیوم از سلولهاي بنیادي عصبي مغز جنین موش منشاء گرفته باشند (۹).

نتیجه‌گیري

از یافته‌هاي این مطالعه مي‌توان نتیجه گرفت که سلولهاي بنیادي عصبي جداسازي شده از مغز موشهاي جنیني قادرند تحت شرایط خاص آزمایشگاهي به سلولهاي پیش ساز عروق یا سلولهاي اندوتلیال تمایز پیدا کنند در حالیکه تحت شرایط مشابه سلولهاي بنیادي عصبي بالغ این پتانسیل را از خود نشان نمي‌دهند.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]

تشكر و قدرداني

اين پژوهش با هزينه و دانشگاه علوم پزشكي كردستان انجام شد كه بدينوسيله مساعدت مديريت پژوهشي قدرداني بعمل مي‌آيد.

References

1. Okano H. Stem cell biology of the central nervous system. J Neurosci Res 2002; 69: 698-707.
2. Cao Q, Benton RL, Whittemore SR. Stem cell repair of central nervous system injury. J Neurosci Res 2002; 68: 501-510.
3. Blesch A, Lu P, Tuszynski MH. Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair. Brain Res Bull 2002; 57: 833-8.
4. Kwon BK, Tetzlaff W. Spinal cord regeneration: from gene to transplants. Spine 2001; 26(24Suppl): S13-22.
5. Tsai RY, McKay RD. Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells. J Neurosci 2000; 20: 3725-3735.
6. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, and et al. Generalized potential of adult neural stem cells. Science 2000; 288: 1660-1663.
7. Oishi K, Ogawa Y, Gamoh S, Uchida MK. Contractile responses of smooth muscle cells differentiated from rat neural stem cells. J Physiol (Lond) 2002; 540: 139-152.
8. Parati EA, Bez A, Ponti D, de Grazia U, Corsini E, Cova L, and et al. Human neural stem cells express extra-neural markers. Brain Res 2002; 925: 213-221.
9. Oishi K, Kobayashi I, Fujii A, Kanehira D, Ito Y, and Uchid MK. Angiogenesis In Vitro: Vascular tube formation from the differentiation of neural stem cells. J Pharmacol Sci 2004; 96; 208-218.
10. Grossman JD, Grossman W. Angiogenesis Rev Cardiovasc Med 2002; 3: 138-44.
11. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. Exp Hematol 2002; 30: 896-904.
12. Vogel W, Grunebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Buhring HJ. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. Haematologica 2003; 88: 126-133.
13. Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, van der Kooy D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. Nat Med 2002; 8: 268-273.
14. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, and et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. Nature 2000; 408: 92-96.
15. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. J Comp Neurol 2000; 425: 479-494.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-05-17]