جداسازی و القای تمایز سلولهای بنیادی عصبی قشری از جنین رت

کامبیز حسن زاده[۱]، اسماعیل ایزدپناه [۲]، فردین فتحی[۳]، فرامرز الله دینی[۴]، قادر صالح نژاد[۵]، و علیرضا عسگری[۶]

۱- استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۲- دکترای فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران (مولف مسئول)، تلفن: ۶۱۳۱۴۰۲-۰۸۷۱،
E-mail: eizadpanah2000@yahoo.com

۳-دانشیار گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۴-استادیار گروه جراحی مغز و اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۵-مربی دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۶-استاد گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزش، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سلولهای بنیادی عصبی در تکامل سیستم عصبی جنینی نقش اساسی دارند و همچنین در بزرگسالی توانایی خود تجدیدی این سلولها می تواند در عملکردهایی مانند یادگیری، حافظه و پاسخ به آسیب، تأثیر گذار باشد. این سلولها در نواحی مختلفی از CNS در مراحل مختلف تکاملی وجود دارند. هدف از این مطالعه جداسازی، تایید بنیادی بودن و القای تمایز سلولهای جداسازی شده از کورتکس جنین ۱۵ روزه رت بود.

روش بررسی: مطالعه حاضر به صورت تجربی و روی قشر مغز جنین های ۱۵ روزه رت (۶ سر) انجام شد. بعد از گذشت ۱۵ روز از زمان تشکیل پلاک در رت ماده، حیوانات به آزمایشگاه منتقل و تحت بیهوشی و رعایت شرایط استریل، در بافر HBSS با هدایت استرئوسکوپ، لایه های منتژ کنار زده شد و قسمت کورتکس فرونتال جنینها جدا و بعد از طی مراحل جداسازی از بافتهای اضافی، در محیط کشت DMEM-F12 که حاوی فاکتورهای رشد bFGF و EGF و مکمل B27 بود کشت داده شدند. محیط کشت سلولها، جهت حفظ حالت تکثیری و جلوگیری از تمایز روزانه تعویض گردید. جهت القای تمایز از محیط DFN (DMEM-F12 و مکمل N2) عاری از فاکتورهای رشد استفاده گردید. جهت تأیید بنیادی بودن و تمایز به انواع سلولهای عصبی از تکنیک ایمونوسیتوشیمی استفاده شد.

یافته ها: بررسیهای ایمونوسیتوشیمی نشان دادند که این سلولها بنیادی عصبی هستند (بیان مارکر nestin) و قابلیت تمایز به نورون (بیان مارکر Beta tubulin III)، الیگودندروسیت (بیان مارکر OSP) و آستروسیت (بیان مارکر GFAP) را دارند.

نتیجه گیری: این روش ابزاری مناسب جهت جداسازی سلولهای بنیادی عصبی جنینی است و با توجه به اینکه این سلولها منشأ جنینی دارند، می توانند جهت بررسی تأثیر عوامل مختلف بر فرآیند تکامل CNS و پیوند در مدلهای مختلف ضایعات نورودژنراتیو مفید باشند.

کلید واژه ها: *سلولهای بنیادی عصبی، جداسازی، جنین رت*

وصول مقاله :۹۰/۶/۱۵ اصلاحیه نهایی: ۹۰/۷/۲۶ پذیرش مقاله:۹۰/۸/۱۴

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

مقدمه

مغز پستانداران از دیر باز به عنوان یک ارگان با قدرت ترمیمی خیلی کم در نظر گرفته شده است. به طوری که رامون کاخال در اوایل قرن بیستم، سیستم عصبی مرکزی را بدین گونه توصیف می کند: «هنگامی که رشد و تکامل سیستم عصبی به پایان رسید، چشمه های رشد و بازسازی به طور برگشت ناپذیری خشک می‌شوند». به عبارت دیگر از مدتها پیش تصور بر این بود که در سیستم عصبی مرکزی سلولهای بنیادی وجود ندارد (۱). اما اخیراً شواهد زیادی ارائه شده که آن عقیده قدیمی را نقض کرده و بیانگر این هستند که در سیستم عصبی مرکزی هم سلولهایی وجود دارند که دو ویژگی منحصر به فرد سلولهای بنیادی یعنی توانایی خود بازسازی و تمایز به سلولهای مختلف سازنده بدن را دارا هستند (۳و۲).

مطالعات نشان داده اند که سلولهای بنیادی عصبی (NSCs[1]) در تکامل سیستم عصبی جنینی نقش اساسی دارند و همچنین در بزرگسالی، توانایی خود تجدیدی این سلولها می تواند در عملکردهایی مانند یادگیری، حافظه و پاسخ به آسیب، تأثیر گذار باشد (۴). در چند سال اخیر توجه زیادی به سلولهای بنیادی عصبی جهت بررسی تکامل سیستم عصبی و همچنین به عنوان یک عامل درمانی در بیماریهای نورودژنراتیو معطوف شده است. NSCs سلولهای پیش ساز چند کاره هستند که قادر به انجام فعالیت های خود تجدید شونده می باشند، همچنین این سلولها می توانند به انواع مختلف سلولها در CNS (شامل نورونها، آستروسیت ها و الیگودندروسیت ها) تمایز یابند (۵و۱). NSCs از بافت مغز اکثر گونه ها شامل موش، رت و انسان قابل جداسازی است (۶). این سلولها پتانسیل زیادی را جهت درمان آسیبهای CNS دارا می باشند، زیرا قادرند حمایت های ساختاری و شیمیایی برای بافتهای آسیب دیده فراهم کنند (۷). قبلاً نویسندگان مقاله سلولهای بنیادی عصبی را از بطنهای جانبی موشهای سوری C57 بالغ در آزمایشگاه جداسازی کرده بودند (۸) و در این مطالعه به جداسازی و بررسی توانایی خود تجدیدی و تمایز سلولهای بنیادی عصبی از کورتکس جنین ۱۵ روزه رت پرداخته شد. با توجه به اهمیتی که جداسازی سلولهای بنیادی عصبی در انجام مطالعات مربوط به تکوین سیستم عصبی، چگونگی تمایز سلولهای عصبی و نیز به کارگیری این سلولها در درمان دارند، در این پژوهش جداسازی و تمایز سلولهای بنیادی عصبی جنین رت به سلولهای عصبی و گلیال انجام شد.

روش بررسی

مطالعه حاضر به صورت تجربی و روی رتهای ماده (۶ سر) انجام گرفت. نمونه های مورد استفاده جنین های رت بوده که بطور تصادفی انتخاب و ناحیه قشر مغز آنها جداسازی و مطالعه روی آنها انجام شد.

جداسازی سلولهای بنیادی عصبی از مغز جنین های ۱۵ روزه رت

بعد از گذشت ۱۵ روز از زمان تشکیل پلاک در رت ماده، حیوانات به آزمایشگاه آورده شدند و تحت بیهوشی با کتامین و زایلازین و رعایت شرایط استریل با استفاده از تیغ بیستوری شکم باز شده و جنین ها از رحم خارج گردیدند و در بافر HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) با هدایت استرئوسکوپ لایه های مننژ کنار زده شد و قسمت کورتکس فرونتال ۷ جنین جدا گردید. در مرحله بعد کورتکس ها به زیر هود لامینار منتقل شده و محیط رویی آنها دور ریخته شد و توسط تیغ بیستوری کاملاً ریز ریز شدند و در محیط کشت سلولهای بنیادی عصبی (حاوی فاکتورهای رشد bFGF (Basic

[1]. Neural Stem Cells

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

Fibroblast Growth Factor)، EGF (Epidermal Growth Factor) ، B27، پنی-سیلین- استرپتومایسین و DMEM/F12) معلق گردیدند. چندین بار پیپتاژ شد و قرار داده شد تا قطعات بزرگ ته نشین گردند. بعد محیط رویی برداشته شد و با سرعت ۵۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید و محیط رویی آن دوباره برداشته شد و تعداد سلولهای زنده در آن توسط تریپان بلو شمارش گردید و بعد به تعداد ۸۰۰۰۰ سلول بر سانتی متر مربع در فلاسک های حاوی محیط کشت سلولهای بنیادی عصبی کشت داده شد. بعد از ۵ روز سلولها تشکیل نوروسفیر های اولیه را دادند. یک روز در میان نصف محیط کشت سلولها تعویض می گردید. بعد از این مرحله سلولها پاساژ داده شد و به فلاسک های جدید منتقل گردید. بعد از رشد مجدد نورسفیر ها به وسیله تریپل اکسپرس (Gibco) تبدیل به سلولهای منفرد شدند و برای بررسی تمایز و بنیادی بودن جهت ایمونوسیتوشیمی آماده گردیدند. جهت القای تمایز از محیط DFN (DMEM-F12 و مکمل N2) عاری از فاکتورهای رشد استفاده شد.

القای تمایز سلولهای بنیادی عصبی به سلولهای عصبی و گلیال

به منظور القای تمایز سلولهای بنیادی عصبی به سلولهای عصبی و گلیال، پس از تبدیل توده های سلولی به سلولهای منفرد توسط تریپل اکسپرس، سلولهای مذکور بر روی لاملهای تیمار شده با Poly-D-lysine و لامینین (sigma) کشت داده و به مدت ۷۲ ساعت در معرض محیط DFN (DMEM-F12 و مکمل N2) عاری از فاکتورهای رشد قرار داده شدند.

ارزیابیهای ایمونوسیتوشیمی

سلولها بعد از قرارگیری در معرض محیط DFN به تدریج شاخه شاخه شده و از لحاظ مورفولوژیک به صورت سلولهای مختلف موجود در CNS درآمدند. برای شناسایی انواع مختلف سلولهای عصبی از روش ایمونوسیتوشیمی با استفاده از آنتی بادیهای اختصاصی سلولهای بنیادی عصبی (بیان مارکر nestin، ab6142)، نورون (بیان مارکر Beta tubulin III، ab18207)، الیگودندروسیت (بیان مارکر OSP، ab7474) و آستروسیت (بیان مارکر GFAP، ab7260) بهره گرفته شد. بدین صورت که بعد از سپری شدن زمان مورد نظر (۷۲ ساعت) سلولها از انکوباتور خارج و به مدت ۲۰ دقیقه در معرض پارافرمالدئید ۴٪ قرار داده شدند و بعد در دو مرحله با PBS (Phosphate buffered saline) شسته شدند و در مرحله بعد از بافر بلاک کننده حاوی Triton X-100 و BSA (Bovine Serum Albumin) به ترتیب برای نفوذپذیر کردن سلولها و پوشاندن مکانهای غیر اختصاصی استفاده گردید. به دنبال آن لاملها در معرض آنتی بادی اولیه آنتی nestin (۱:۱۰۰)، آنتی بادی اولیه آنتی Beta tubulin III (۱:۵۰۰)، آنتی بادی اولیه آنتی GFAP (۱:۵۰۰) و آنتی بادی اولیه آنتی OSP (۱:۱۰۰) قرار گرفتند و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در روز بعد آنتی بادیهای اولیه خارج و در دو مرحله با PBS شستشو انجام شد و آنتی بادیهای ثانویه کنژوگه با FITC (سبز برای شناسایی nestin) و Texas Red (قرمز برای شناسایی دیگر مارکرها) در محیط تاریک و مرطوب به مدت یک ساعت اضافه گردید. در نهایت پس از شستشو با PBS از Vectashield hard set حاوی Dapi (جهت شناسایی هسته سلولها) جهت چسباندن لاملها استفاده شد. به منظور مشاهده و عکسبرداری از میکروسکوپ فلورسنت Olympus مدل IX71 استفاده گردید.

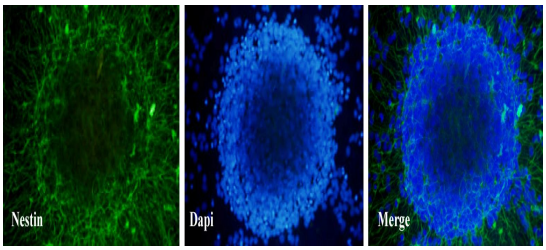
یافته ها

تأیید بنیادی بودن سلولها

نتایج این مطالعه نشان داد که سلولهای جدا سازی شده با این روش سلولهای بنیادی عصبی بودند (شکل ۱ بیان مارکر nestin). در محیط حاوی فاکتورهای

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

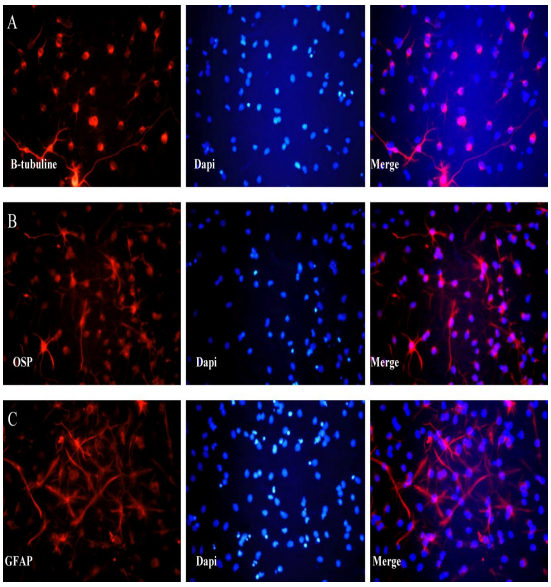
رشد bFGF و EGF شروع به رشد کرده و پس از گذشت حدود یک هفته تشکیل نوروسفیرهای اولیه را دادند (یکی از خصوصیات سلولهای بنیادی عصبی).



شکل ۱. ایمونوسیتوشیمی سلولهای بنیادی عصبی که بیان مارکر **Nestin** را نشان می دهد. رنگ سبز بیان مارکر نستین و رنگ آبی نشان دهنده هسته سلولهاست که با **Dapi** رنگ گرفته اند. بزرگنمایی ۴۰۰ برابر.

بررسی قابلیت تمایز

جهت بررسی قابلیت تمایز به سلولهای مختلف عصبی، از محیط DFN استفاده شد. همانگونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، سلولهای بنیادی عصبی بعد از قرار گرفتن در شرایط تمایز، مارکر های مختلف سلولهای عصبی شامل GFAP، Beta Tubulin و OSP را بیان کردند.



شکل ۲. تصاویر مربوط به ایمونوسیتوشیمی سلولهای بنیادی عصبی ۳ روز پس از انتقال به ظرفهای پوشیده شده با پلی –D–لایزین و لامینین. **A**: نورون، **B**: الیگودندروسیت و **C**: آستروسیت. بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

بحث

طی یکی دو دهه اخیر سلولهای بنیادی مورد توجه زیادی قرار گرفته اند. این سلولها به عنوان یک عامل درمانی بالقوه برای بیماریهای تحلیل رونده و ارگانهای آسیب دیده از ویژگیهای منحصر به فردی برخوردارند (۱). مطالعات نشان داده اند که حتی در حیوانات بالغ نیز، سلولهای بنیادی در ارگانهای مختلفی از بدن از جمله مغز، نخاع، مغز استخوان، ماهیچه اسکلتی، روده، اپی درم، کبد و غیره وجود دارند. این سلولها می توانند جایگزین سلولهایی شوند که به شکل فیزیولوژیک یا پاتولوژیک از بین رفته اند (۱۴-۹). سلولهای بنیادی عصبی به عنوان یک ابزار درمانی برای ترمیم بعضی از اختلالات CNS از پتانسیل زیادی برخوردار هستند. این سلولها در محیط آزمایشگاه قادر به تکثیر بوده، بدون اینکه طی مراحل تکثیر، خاصیت چند استعدادی خود را از دست دهند (۱۵). مطالعات دیگر نشان می دهد که سلولهای بنیادی عصبی انسانی، بازسازی اکسونهای کورتیکواسپاینال را ارتقا بخشیده و با نورونهای میزبان بعد از پیوند، سیناپس تشکیل می‌دهند (۱۶). همچنین این سلولها، فاکتورهای نوروتروفیک مفید برای نورونهای آسیب دیده را ترشح می کنند. این فاکتورها از سمیت سلولی القا شده توسط گلوتامات محافظت به عمل آورده و بقای نورونهای حرکتی آسیب دیده را ارتقا می‌بخشند (۱۷). همچنین علاوه بر حیواناتی نظیر موش سوری و موش صحرایی، سلولهای بنیادی عصبی را می توان از نواحی مختلفی از مغز جنین انسان، نوزاد و فرد بالغ جدا سازی کرد. این یافته ها امکان پیوند اتولوگ سلولهای بنیادی عصبی را نوید می‌دهند (۱۸). اما مسأله ای که اینجا مطرح است اینست که سلولهای بنیادی عصبی که از منابع مختلف جداسازی می شوند، خصوصیات یکسانی ندارند و همین قضیه باعث شده است، در مدل

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

های مختلف که از سلولهای بنیادی عصبی با منشأ متفاوت استفاده می شود، نتایج ضد نقیضی گرفته شود. بنابراین در این مقطع زمانی بررسی ویژگیهای سلولهای بنیادی عصبی با منشأ مختلف و پی بردن به اینکه هر نوع سلول بنیادی عصبی را برای چه هدفی استفاده بکنیم، اهمیت بسزایی دارد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سلولهای جداسازی شده از کورتکس جنین رت، سلولهای بنیادی عصبی هستند و قابلیت تمایز به هر سه رده سلولهای موجود در CNS را دارند. سلولهای بنیادی عصبی موجود در دیواره بطن های جانبی موش، توانایی تکثیر تا حداقل ۱۰ پاساژ را دارند (۸) ولی بررسی های ما در این مطالعه نشان داد که سلولهای جدا سازی شده از کورتکس جنین رت، توانایی تکثیری کمتری دارند. از طرفی خیلی زودتر و حتی در حضور فاکتورهای رشد قوی مانند bFGF تمایز پیدا می کنند. بنابراین به نظر می رسد این سلولها در زمان جداسازی (روز ۱۵ جنینی) بنیادی عصبی بوده اما پتانسیل تمایز بیشتری نسبت به سلولهای جداسازی شده از دیواره بطن جانبی موش دارند. احتمالاً تفاوت در محل جداسازی سلولها و تفاوت در گونه حیوانات، توجیه کننده این اختلاف باشد. بنابراین بهتر است از سلولهای جداسازی شده به روش حاضر، به صورت کشت اولیه در مطالعات تکاملی CNS استفاده شود، چرا که بررسیهای کشت اولیه نیاز به مراحل مختلف پاساژ ندارند و کمتر تحت تأثیر محیط in vitro خصوصیات سلولها تغییر می کند و این همان شرایطی است که برای شبیه سازی محیط in vivo در مطالعات تکاملی CNS مورد نیاز است.

نتیجه گیری:

این روش ابزاری مناسب جهت جداسازی سلولهای بنیادی عصبی جنینی است و با توجه به اینکه این سلولها منشأ جنینی دارند، می توانند جهت بررسی تأثیر عوامل مختلف بر فرآیند تکامل CNS و پیوند در مدلهای مختلف ضایعات نورودژنراتیو مفید باشند.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با مساعدت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شده که بدینوسیله از آن معاونت قدردانی به عمل می آید.

References

1. Okano H. Stem cell biology of the central nervous system. J Neurosci Res 2002;69:698–707.
2. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian centralnervous system. Science 1992;255:1707-10.
3. Galli R, Gritti A, Bonfanti L, Vescovi AL. Neural stem cells: an overview.Circ Res 2003;92:598-608.
4. Tamm C, Duckworth J, Hermanson O, Ceccatelli S. High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation. J Neurochem 2006;97:69-78.
5. Okano H. Neural stem cells and strategies for the regeneration of the central nervous system. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2010;86:438-50.
6. Cao Q, Benton RL, Whittemore SR. Stem cell repair of central nervous system injury. J Neurosci Res 2002;68:501-510.
7. Gage FH Mammalian neural stem cells. Science 2000;287:1433–1438.
8. Fathi F, Jafari Kermani A, Golbar MR , Izadpanah E, Golmohammadi M Gh, Mowla SJ, Asgari A. Isolation, induction of neural and glial differentiation and evaluating the expression of five self renewal genes in adult mouse neural stem cells. Journal of Iranian Anatomical Sciences 2007;19:81-92.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

9. Hall PA, Watt F M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. Development 1989;106:619–33.
10. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. Development1990; 110:1001-20.
11. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. Cell 1999;96:737–49.
12. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, and et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. Science 2000;287:2032–6.
13. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell 2000;100:157–68.
14. Varghese M, Olstorn H, Murrell W, Langmoen IA. Exploring atypical locations of mammalian neural stem cells: the human filum terminale. Arch Ital Biol 2010;148:85-94.
15. Cao QL, Howard RM, Dennison JB, Whittemore SR. Differentiation of engrafted neuronal-restricted precursor cells is inhibited in the traumatically injured spinal cord. Exp Neurol 2002;177:349-59.
16. Peng L, Lian-hong J, Tao L, En-zhong L, Shi-guang Z. Human neural stem cells promote corticospinal axons regeneration and synapse reformation in injured spinal cord of rats. Chinese Med J 2006;119:1331-8.
17. Llado J, Haenggeli C, Maragakis NJ, Synder EY, Rothstein JD. Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. Mol Cell Neurosci 2004;27:322-31.
18. Galvin KA, Jones DG. Adult human neural stem cells for cell-replacement therapies in the central nervous system. Med J Aust 2002;177:316-8.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]