مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ٣، پاییز ١٣٩٢، ٣١١-٣٠٥

اثر مایع مغزی–نخاعی جنینی بر توانایی تکثیر و حفظ حالت بنیادی پروژنیتورهای عصبی رت نژاد ویستار

سیامک یاری .Ph.D [1*]، کاظم پریور .Ph.D [1]، محمد نبیونی .Ph.D [1] ، محمد کرامتی پور . Ph.D [2]

١- دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
٢- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: yarisiamak@yahoo.com

تاریخ دریافت: ١٣٩١/١١/٢١ تاریخ پذیرش: ١٣٩٢/٢/١٠

چکیده

هدف: در سال‌های اخیر شواهد چندی، نقش تکوینی برای مایع مغزی-نخاعی قایل شده‌اند. در این مطالعه تاثیر مایع مغزی-نخاعی جنینی بر توانایی تکثیر و ویژگی‌های بنیادی بودن سلول‌های پروژنیتور عصبی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کورتکس جنین‌های ١٥/٥ روزه رت نژاد ویستار در شرایط استریل جدا و به‌روش آنزیمی به سوسپانسیون سلولی تبدیل گشت. سپس سلول‌ها با تراکم ٥٠ الی ١٠٠ سلول در هر میکرولیتر محیط کشت DMEM/F12 حاوی مکمل N2 و فاکتور رشد EGF و FGF-2 کشت داده شد. در گروه کنترل فقط از محیط کشت استاندارد استفاده شد در حالی‌که گروه‌های آزمایشی با مایع مغزی-نخاعی روزهای مختلف جنینی (١٦، ١٨ و ٢٠) به نسبت ١٠ به ١٠٠ (حجمی-حجمی) تیمارشدند. شمارش تعداد نوروسفیرها و بیان مارکر ویمنتین جهت بررسی توانایی تکثیر و حالت بنیادی مورد استفاده قرار گرفت. میزان بقای سلولی با استفاده از تست MTT سنجیده شد. نتایج بدست آمده از طریق آزمون آنالیز واریانس یک طرفه بررسی شد.

نتایج : مایع مغزی-نخاعی جنینی روزهای ١٦ و١٨ تعداد نوروسفیرها و همچنین میزان بقای سلولی را افزایش داد.

نتیجه گیری: مایع مغزی-نخاعی جنینی روزهای مختلف جنینی به صورت وابسته به زمان تاثیرات متفاوتی بر تکثیر و بقای سلول‌های پروژنیتور عصبی می‌گذارند. همچنین این مایع حالت بنیادی سلولهای پروژنیتور عصبی را در حالت بنیادی تثبیت می‌کند.

واژگان کلیدی: مایع مغزی- نخاعی جنینی، نوروسفیر، تزاید سلولی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

در طی فرآیند نورولاسیون با جوش خوردن چین‌های عصبی، مایع آمنیوتی درون لوله عصبی شکل گرفته، محبوس می‌شود و از این مقطع زمانی به بعد به این مایع عنوان مایع مغزی-نخاعی اطلاق می‌شود (۱). در مراحل بعدی رشد و نمو جنینی سلول‌هایی که سطح داخلی لوله عصبی را پوشش می‌دهند شروع به ترشح مایع مغزی-نخاعی می‌کنند و در مراحل بعدی با پیشرفت تکوین جنین گروهی از سلول‌های اپی‌تلیالی تخصص یافته در موقعیت سقف بطن‌های مغز جنین شروع به شکل‌گیری می‌کنند که این سازمان بافتی، شبکه کوروئیدی نامیده می‌شود و در ادامه حیات جانور نقش اصلی ترشح مایع مغزی نخاعی را بر عهده می‌گیرد (۲). در دهه‌های گذشته مطالعات دانشمندان اغلب بر روی عمل‌کردهای فیزیولوژیکی این مایع استوار بود. لذا وظایفی شامل حذف سموم متابولیکی، ممانعت از تاثیرات مخرب ضربات فیزیکی به‌واسطه نقش هیدروستاتیکی که این مایع با پخش کردن نیروهای وارده ایفا می‌کند و همچنین ایجاد حالت بافری در برابر ضربان‌های سرخرگی و بسیاری اعمال دیگر که با ویژگی‌های هیدروستاتیکی مایع مغزی نخاعی مرتبط می‌باشد (۳ و۴).

در سال‌های اخیر نقش تکوینی مایع مغزی نخاعی مورد توجه قرار گرفت. Miyan و همکاران (۳) نشان دادند که مایع مغزی نخاعی نقش حیاتی در تکوین سیستم عصبی مرکزی بر عهده دارد.

مطالعات نشان داد که در بسیاری از بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی شامل مالتیپل اسکلروزیس و آلزایمر میزان فاکتورها و مورفوژن‌های حاضر در مایع مغزی نخاعی تفاوت فاحشی نسبت به‌حالت طبیعی را به نمایش می‌گذارد (۵، ۶ و ۷). همچنین در گروهی دیگر از بیماری‌های عصبی شامل هیدروسفالی و اسپینا بیفیدا به‌علت اختلال در جریان مایع مغزی-نخاعی آسیب‌های شدید و غیرقابل برگشتی به تکوین طبیعی مغز جنین و نوزاد بعد از تولد وارد می‌شود (۸ و ۹).

مطالعات پروتئومیکی مایع مغزی-نخاعی جنینی تفاوت معنی‌داری را از لحاظ محتوای پروتئینی و همچنین میزان فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های موجود در آن، نسبت به مایع مغزی نخاعی جانور بالغ نشان می‌دهد. همچنین مطالعات نشان داده است که این ویژگی (تفاوت محتوی پروتئینی مایع مغزی-نخاعی جنین به بالغ) در اکثر گونه‌های مهره‌داران شامل پرندگان، جوندگان و پستانداران مشاهده می‌شود (۱۰ و ۱۱).

شواهد نشان داده است که ظهور نخستین نورون‌ها در قشر مخ جنین انسان در مرحله کارنگی ۲۱ (CS 21) صورت می‌گیرد که از لحاظ زمانی تقریبا با شروع شکل‌گیری شبکه کوروئیدی و تولید CSF مقارن است (۱۲). این تقارن زمانی در رابطه با شکل‌گیری شبکه کوروئیدی و آغاز کورتیکوژنسیس، در سایر گونه‌های جانوری نظیر موش و رت نیز صدق می‌کند (۱۲).

در این مطالعه سعی بر آن شده است که تاثیر مایع مغزی نخاعی جنین‌های روزهای مختلف رت نژاد ویستار بر روی پروژنیتورهای عصبی برگرفته از جنین رت مورد سنجش و ارزیابی قرار گیرد و تغییرات رفتار سلول‌های تیمارشده از نظر رشد و تکثیر و همچنین ویژگی‌های فنوتیپی به‌طور مقایسه‌ای ارزیابی قرار شود.

مواد و روش‌ها

حیوانات: رت‌های نژاد ویستار مورد آزمایش در این مطالعه از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی فراهم شد. تمامی آزمایش‌ها بر اساس قوانین اخلاقی مورد تایید دانشگاه خوارزمی صورت گرفت. در این مطالعه جنین‌های رت نژاد ویستار جهت جداسازی سلول‌های پروژنیتور عصبی و همچنین جمع آوری مایع مغزی نخاعی مورد استفاده قرار گرفتند، به‌طوری‌که از جنین‌های روزهای ۶۱، ۸۱ و ۰۲ جهت جمع‌آوری مایع مغزی-نخاعی و از جنین‌های ۵۱/۵ روزه برای انجام کشت سلولی استفاده شد. روز مشاهده پلاک واژنی به‌عنوان روز صفر جنینی تلقی شد.

جمع آوری مایع مغزی-نخاعی: رت‌های حامله با تزریق فنوباربیتورات سدیم کشته شدند و جنین‌های روزهای ۱۶، ۱۸ و ۲۰ از رحم رت حامله در شرایط کاملا استریل خارج و به پتری‌های حاوی SBP سرد منتقل شدند. در ادامه با استفاده از لوله موئین استریل مایع مغزی نخاعی جنین‌های روزهای مختلف از محل anretsic angam و با استفاده از خاصیت مویینگی، جمع شد. لوله‌های حاوی مایع مغزی-نخاعی در طی مراحل جمع آوری در محیط ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری‌شدند. بعد از اتمام کار جمع آوری مایع مغزی- نخاعی، میکروتیوب‌های حاوی

Archive of SID

www.SID.ir

این مایع، در ۰۰۰۴۱ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا هرگونه بقایای سلول‌های مرده و سلول‌های خونی احتمالی موجود در آن ته نشین شود. سپس مایع شفاف رویی به لوله‌های استریل جدید منتقل شد. تجربه نشان داده است که از هر جنین به‌طور متوسط ۰۱ الی ۰۵ میکرولیتر مایع مغزی- نخاعی می‌توان گردآوری نمود. پس از اتمام کار جمع‌آوری، نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به فریزر ۰۸- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند تا در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

کشت سلولی: رت‌های باردار در روز حاملگی ۱۵/۵ با استفاده از تزریق درون صفاقی دوز بالای فنوباربیتورات سدیم کشته شدند. سپس رحم‌ها در شرایط کاملا استریل خارج شده و به پتری‌های حاوی PBS سرد منتقل شدند. در ادامه کورتکس‌های جدا شده از مغز جنین با استفاده از آنزیم تریپسین- EDTA (Invitrogen) به‌حالت سوسپانسیون سلولی در آمد. سوسپانسیون سلولی در ظرف ۲۴ خانه‌ای (Nunc) حاوی محیط کشت DMEM/ F12 و مکمل N2 (هر دو ازInvitrogen) و یک درصد آنتی‌بیوتیک (Invitrogen) و همچنین فاکتورهای رشد FGF2، (20 ng/ml) و EGF (20 ng/ml) کشت داده شدند (هر دو ازInvitrogen).

تعداد نوروسفیرها: پس از گذشت ۴ روز از شروع کشت پروژنیتورها در گروه کنترل و گروههای تیمار شده با مایع مغزی-نخاعی روزهای مختلف جنینی، از کشتها با ابژکتیو x۱۰ عکسبرداری بعمل آمد. سپس با استفاده از نرم افزار تحلیل تصاویر تحت عنوان j image تعداد نوروسفیرها در تصاویر مختلف شمارش شد و در ادامه مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفت.

تست MTT: رشد و بقای سلولی با استفاده از روش بیوشیمیایی MTT سنجیده شد. در این روش، کاهیدگی MTT (Sigma) به کریستال‌های فومارازان (در نتیجه تاثیر آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندری‌های سلول‌های زنده) صورت می‌گیرد و بدین ترتیب به‌عنوان یک شاخص بقای سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کریستال‌های فومارازان ایجاد شده سپس در ایزوپروپانول اسیدی حل و میزان جذب نوری این محلول با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

ایمونوسیتوشیمی: جهت بررسی بیان مارکر سلول‌های بنیادی عصبی (Vimentin) نوروسفیرهای گروه‌های کنترل و تیمار شده با مایع مغزی-نخاعی روزهای مختلف جنینی جمع‌آوری می‌شود و به‌حالت سوسپانسیون سلولی درآورده شد. سپس سوسپانسیون سلولی به ظرف‌های اندودشده با poly-L-lysine (Sigma) منتقل شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف، محیط کشت رویی سلول‌ها خارج و بعد از شستشوی سلول‌ها با PBS، با پارافرمالدهید ۴ درصد فیکس شدند.

در ادامه سلول‌ها با تریتون X-۱۰۰ (Sigma-USA) نفوذپذیر و با BSA آنتی‌ژن‌های غیراختصاصی بلوکه شدند. در نهایت سلول‌ها با آنتی‌بادی اولیه ویمنتین (Vimentin)-(Abcam-UKبا غلظت ۱/۵۰۰ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سلول‌ها بعد از شستشو به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، باآنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده باCy3 (Abcam-UK) با غلظت ۱/۳۰۰ انکوبه گردیدند. سپس هسته سلول‌ها با پروپیدیوم یدید (Propidium Iodide=PI) ۱/۱۵۰۰۰ (Sigma-USA) رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ فلورسانس (Olympus, Tokyo, Japan) عکسبرداری شدند.

گروه‌بندی کشت‌های سلولی: کشت‌های سلولی به گروه‌های مختلف تقسیم شد. در گروه کنترل فقط از محیط کشت استاندارد جهت کشت نوروسفیرها استفاده شد. و در گروه‌های آزمایشی از CSF های روزهای جنینی مختلف جهت تیمار کشت‌های سلولی استفاده شد. غلظت مورد استفاده CSF در تمامی گروه‌های آزمایشی ۱۰ درصد حجمی/حجمی بود.

آنالیزهای آماری: جهت آنالیزهای آماری از آزمون One-way ANOVA و Tukey's استفاده شد. داده‌ها به شکل میانگین ± SEM بیان شدند و معنی‌داری میانگین‌ها با $P < ۰/۰۵$ نشان داده شدند.

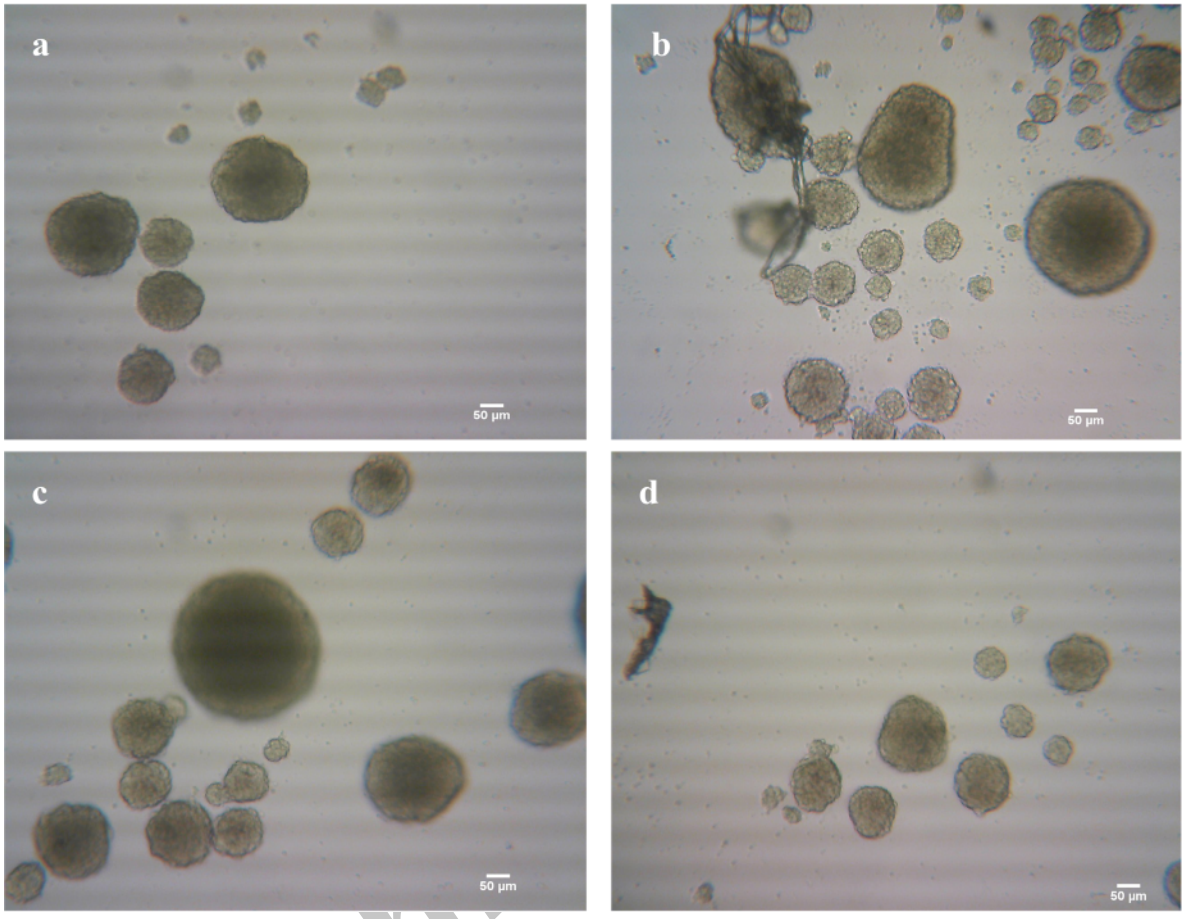
نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مایع مغزی-نخاعی جنینی جمع‌آوری شده از روزهای مختلف جنینی، تاثیرات متفاوتی را بر رفتار تکثیری سلول‌های پروژنیتور جنینی برجای می‌گذارند. آزمایشات نشان داد که تعداد نوروسفیرهای موجود در گروه‌های تیمار شده با مایع مغزی نخاعی جنینی در روز ۱۶ و ۱۸ به طور معنی‌داری نسبت به نوروسفیرهای گروه کنترل که تنها با عوامل میتوژنیک تیمار شده بودند، افزایش پیدا کرده است. همچنین یافته‌ها حاکی از آن است که تعداد نوروسفیرهای

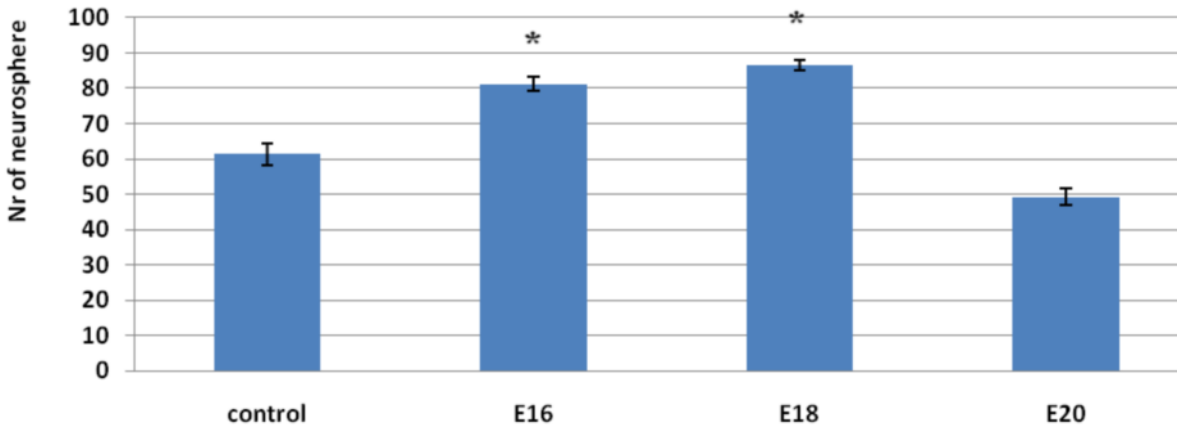
Archive of SID

www.SID.ir

موجود در گروه‌های تیمارشده با مایع مغزی-نخاعی جنینی روز ۲۰ ام جنینی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل۱ و نمودار۱). مشاهدات نشان داده است که تعداد نوروسفیرها رابطه مستقیمی با توانایی تکثیر سلول‌های تشکیل دهنده آن داشت و همچنین نشانگر حفظ حالت بنیادی این سلول‌ها بود.



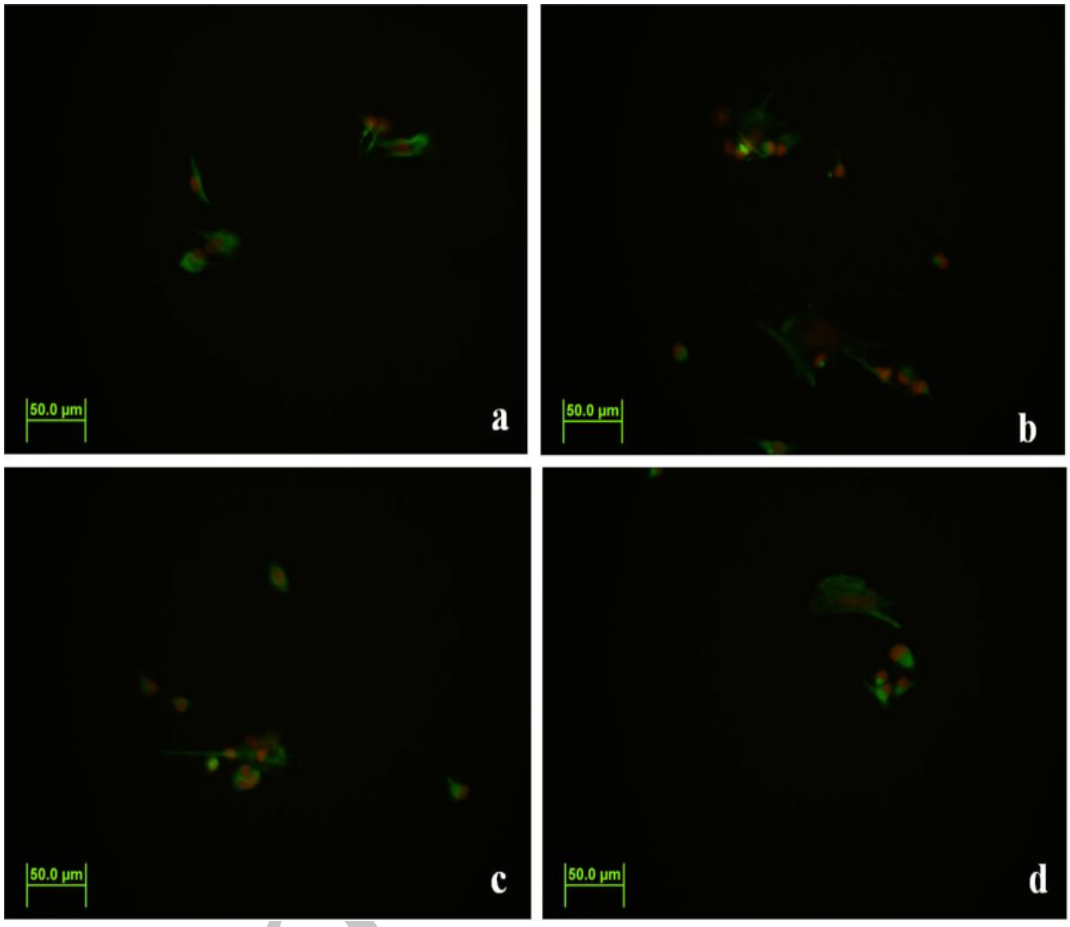
شکل ۱: تاثیر مایع مغزی-نخاعی روزهای مختلف جنینی بر تعداد نوروسفیرها a) نوروسفیرهای کشت داده در گروه کنترل که به مدت ۴ روز فقط در حظور عوامل رشد (شامل EGF و FGF-2) رشد داده شده اند. b، c و d) به‌ترتیب نوروسفیر های کشت داده شده در حضور مایع مغزی-نخاعی روزهای ۱۶، ۱۸ و ۲۰ جنینی.



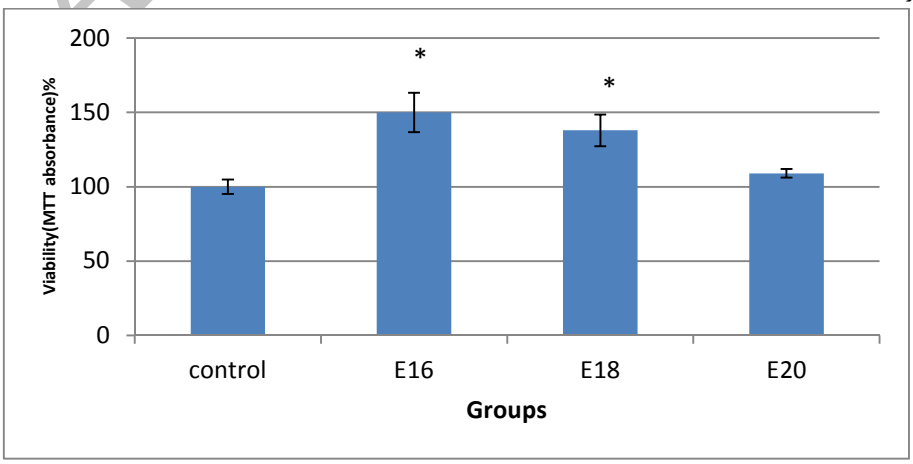
نمودار ۱: تاثیر مایع مغزی-نخاعی جنینی بر تعداد نوروسفیرها را تحت شرایط ذکر شده نمایش می دهد(E16،E18وE20 شرایط کشت تحت تاثیر مایع مغزی-نخاعی جنینی روزهای ۱۶، ۱۸و۲۰ جنینی و control شرایط کشت فقط در حضور عوامل رشد را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

یافته‌های ایمونوسیتوشیمی نشان داد کـه مـایع مغـزی-نخـاعی جنینـی روزهـای مختلـف جنینـی در حفـظ حالـت بنیـادی پروژنیتورهای عصبی موثراست. مارکر سلول‌های بنیادی عصـبی که در این مطالعه مورد استفاده قـرار گرفـت ویمنتـین بـود کـه به‌عنوان یک مارکر فنوتیپی شاخص برای بنیادی بودن سلول‌های پروژنیتور و عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج نشان داد که سلـول‌هـای تیمار شـده با مـایع مغزی- نخاعی جنینی روزهـای مختلف جنینی توانایی بیان این مارکر را دارا می‌باشند (شکل ۲).



شکل ۲: تاثیر مایع مغزی-نخاعی جنینی بر بیان پروتئین ویمنتین (به‌عنوان مارکر سلول‌های بنیادی عصبی). a) سـلول‌هـای مشـتق از نوروسـفیرهای گروه کنترل که فقط تحت تاثیر عوامل رشد (شامل EGF و FGF-2) قرار گرفته اند. b، c و d به‌ترتیب سلول‌های مشتق از نوروسـفیرهای متـاثر از مـایع مغزی-نخاعی روزهای ۱۶، ۱۸ و ۲۰ جنینی را نمایش می دهد. ویمنتین با رنگ سبز و هسته‌ها به رنگ قرمز که توسط پروپیدیوم یدید (PI) رنگ‌آمیـزی شده‌اند دیده می‌شوند.



نمودار۲: قدرت رشد و بقای پروژنیتورهای عصبی سنجش شده با تست MTT . E16، E18و E20 شرایط کشت تحت تاثیر مایع مغزی-نخاعی جنینی روزهای ۱۶،۱۸و۲۰ جنینی و control شرایط کشت فقط در حضور عوامل رشد را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

نتایج بررسی بقای سلولی که بوسیله تست MTT مورد بررسی قرار گرفت نیز نشان داد که میزان بقای سلولی سلول‌های پروژنیتور عصبی تیمار شده با مایع مغزی-نخاعی جنینی ۱۶ و ۱۸ به‌طور معنی‌داری نسبت به سلول‌های گروه کنترل افزایش پیدا کرده است (نمودار ۲).

بحث

نتایج ارائه شده در این مطالعه نشان داد که مایع مغزی-نخاعی جنینی توانایی تنظیم تکثیر و بقای پروژنیتورهای عصبی را دارا می‌باشد. همچنین نتایج حاکی از آن است که مایع مغزی-نخاعی جنینی دارای الگوی تغییر وابسته به زمان می‌باشد و لذا مایع استخراج شده از روزهای مختلف جنینی، تاثیرات متفاوتی را بر رفتار پروژنیتورهای عصبی به‌جا می‌گذارد.

این یافته‌ها، نتایج تحقیقات قبلی که به‌صورت in vivo و in vitro انجام گرفته است را تأیید می‌نماید. در واقع شواهد فراوانی در سال‌های اخیر به‌دست آمد که نشان‌دهنده نقش انکار ناپذیر مایع مغزی-نخاعی در شرایط طبیعی همچنین حالت‌های مختلف پاتولوژیکی مغز، می‌باشد (۱۳و۱۴).

در این مطالعه از سلول‌هایی پروژنیتور عصبی که به‌حالت نوروسفیر کشت داده می‌شوند به‌عنوان مدلی برای بررسی تاثیرات مایع مغزی نخاعی جنینی بر آن‌ها استفاده شد. در این روش برخلاف سایر روش‌های گذشته، سلول‌های تشکیل‌دهنده نوروسفیرها تقریبا جمعیت همگنی را از نظر سرنوشت سلولی تشکیل می‌دهند (۱۵). روش‌های قبلی اکثرا از روش‌هایی استفاده شده بود که در آن‌ها مجموعه ناهمگنی از سلول‌ها حضور داشتند. (۱۳ و ۱۶)

داده‌های این مطالعه نشان‌دهنده افزایش معنی‌داری در تعداد نوروسفیرهای کشت‌های تیمارشده با مایع مغزی-نخاعی جنینی روزهای ۱۶ و ۱۸، در مقایسه با گروه کنترل بود. مطالعات نشان داده که تعداد نوروسفیرها رابطه مستقیمی با توانایی بنیادی بودن سلول‌های عصبی و قدرت تکثیر آن‌ها دارد (۱۷). لذا این نتایج قویا پیشنهاد می‌کند که مایع مغزی-نخاعی نقش مهمی در تنظیم توانایی تکثیر و self-renewal پروژنیتورهای عصبی دارا می‌باشد.

همچنین داده‌های ایمونوسیتوشیمیایی نشان داد که در گروه‌های تیمارشده با مایع مغزی-نخاعی جنینی تفاوت معنی‌داری با گروه‌های کنترل از لحاظ بیان ویمنتین (بعنوان مارکر سلول‌های بنیادی عصبی) دیده نمی‌شود (۱۸). یکی از ویژگی‌های محتوایی CSF مغز در حال تکوین، غلظت بالای پروتئین ها در آن می‌باشد (۱۹). در ابتدا برخی محققان حضور غلظت بالای پروتئین CSF جنینی را شاهدی برای نارس بودن سد مغزی می‌دانستند (۲۰). در مغز در حال تکوین مکانیسمی در سلول‌های اپی‌تلیالی شبکه کوروئیدی وجود دارد که گذر پروتئینی‌ها از پلاسما به CSF را میسر می‌سازد که به دو روش صورت می‌گیرد. اولی به‌روش انتشار غیر فعال و دیگری روش اختصاصی که در مورد پروتئین‌های مختلف و در گونه‌های مختلف به شکل‌های مختلف انجام می‌گیرد (مانند آلبومین). این نوع پروتئین‌ها به صورت تکوینی تنظیم می‌شوند و با نهایی شدن تکوین به سرعت افت می‌کنند (۲۱).

پیوندهای محکم بین سلولی که در سلول‌های نوروایی‌تلیال وجود دارد باعث ایجاد سد مغزی می‌گردد و مانع از انتشار پروتئین‌های درون مایع مغزی-نخاعی به‌داخل فضای بین سلولی بافت مغز می‌گردد که تنظیم این امر نیز حالت وابسته به زمان می‌باشد (۲۲). این نوع پیوند با پیشرفت تکوین مغز و نزدیک شدن به زمان تولد ناپدید می‌شود و به موازات آن غلظت پروتئین داخل CSF نیز افت می‌کند. شواهد حاکی از آن است که بیشترین غلظت محتوای پروتئینی CSF مقارن با بیشترین مقدار نورون زایی (تکثیر) و تشکیل صفحه قشری (cortical plate) در مغز جلویی می باشد (۲۱).

نتایج حاصل از تست MTT نیز نشان داد که پروژنیتورهای عصبی تیمار شده با مایع مغزی نخاعی قدرت تکثیر و بقای بیشتری را نسبت به گروه کنترل دارا می‌باشند.

با توجه به عمل‌کردی که مایع مغزی-نخاعی جنینی در حفظ حالت بنیادی پروژنیتورهای عصبی دارا می‌باشد، لذا نیاز به تحقیقات دامنه‌دارتری احساس می‌شود که میزان دقیق فاکتورهای موثر بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی عصبی، حاضر در مایع مغزی نخاعی را مشخص سازند. با توجه به اینکه در بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی و همچنین ناهنجاری‌های جنینی که در تکوین سیستم عصبی مرکزی اختلال ایجاد می‌کنند. اختلالاتی درمحتویات مایع مغزی نخاعی نیز ایجاد می‌شود. از این رو مطالعه بر روی عوامل موثر حاضر در مایع مغزی نخاعی و اثرات سینرژیتیک آن‌ها بر همدیگر می‌تواند به‌عنوان یک روش درمانی جایگزین پیشنهاد شود.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

مایع مغزی- نخاعی جنینی به‌طور وابسته به سن جنینی بر تکثیر و بقای سلولی نوروپروژنیتورهای عصبی تاثیر می‌کند. همچنین مایع مغزی-نخاعی جنینی باعث حفظ حالت بنیادی نوروپروژنیتورهای عصبی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی انجام گرفته است.

منابع

1. Sadler, T.W. Langman's Medical Embryology, 8th Ed; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, MD; 2000.

2. Dziegielewska KM, Ek J, Habgood MD. Development of the Choroid Plexus. Microsc Res Tech. 2001; 52(1): 5-20.

3. Miyan JA, Nabiyouni M, Zendah M. Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. Can. J. Physiol. Pharmacol. 2003; 81 (4), 317-28.

4. Segal MB. Extracellular and cerebrospinal fluid. J Inherit Metabol Dis. 1993; 16: 617-38.

5. Palmert MR, Podlisny MB, Witker DS, Oltersdorf T, et al. The beta-amyloid protein precursor of Alzheimer disease has soluble derivatives found in human brain and cerebrospinal fluid. Proc Natl Acad Sci. 1989; 86(16): 6338–6342.

6. Hayashi Y, Kashiwagi K, Ohta J, Nakajima M, et al. Alzheimer Amyloid Protein Precursor Enhances Proliferation of Neural Stem Cells from Fetal Rat Brain.Bichem Biophys Res Commun. 1994; 201(1): 936-943.

7. Cid C, Alcazar A, Regidor I, Masjuan J, et al. Neuronal apoptosis induced by cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients correlates with hypointense lesions on T1 magnetic resonance imaging. J Neurol Sci. 2002; 193(2): 103-109.

8. Cains S, Shepherd A, Nabiuni M, Owen-Lynch PJ, et al. Addressing a folate imbalance in fetal cerebrospinalfluid can decrease the incidence of congenital hydrocephalus. J Neuropathol Exp Neurol. 2009; 68: 404-16 .

9. Mashayekhi F, Draper CE, Pourghasem M, Bannister CM, et al. Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas (H-Tx) rat: a role for cerebrospinal fluid. Brain 2002; 125: 1859-74.

10. Parada C, Gato A, Aparicio M, Bueno D. Proteome analysis of chick embryonic cerebrospinal fluid. Proteomics. 2006; 6(1): 312-20.

11. Zappaterra MD, Lisgo SN, Lindsay S, Gygi SP, et al. A Comparative Proteomic Analysis of Human and Rat Embryonic Cerebrospinal Fluid. J. Proteome Res. 2007; 6(9): 3537 – 3548.

12. O'Rahilly R, Muller F. The Embryonic Human Brain: An Atlas of Developmental Stages. New York: Wiley-Liss; 1994.

13. Gato A, Moro Ja, Alonso MI, Bueno D, et al. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. Anat Rec Discov Mol Cell Evol Biol. 2005; 284(1): 475-84.

14. Owen-Lynch PJ, Draper CE, Mashayekhi F, Bannister CM, et al. Defective cell cycle control underlies abnormal cortical development in the hydrocephalic Texas rat. Brain .2003; 126(3): 623-31.

15. Reynolds B, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science. 1992; 255(5052): 1707-10.

16. Mashayekhi F, Salehi Z. The importance of cerebrospinal fluid on neural cell proliferation in developing chick cerebral cortex. Eur J Neurol. 2006; 13(3): 266-72.

17. Gritti A, Galli R, Vescovi A.L. Cultures of stem cells of the central nervous system. In:Federoff, S and Richardson, A (eds.) Protocols for Neural Cell Culture. Marcel Dekker,New York; 2001; 173–97.

18. Dahl D, Rueger DC, Bignami A, Weber K, et al. Vimentin, the 57.000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeleton component in immature glia. Eur J Cell Biol. 1981; 24:191–196.

19. Dziegielewska KM, Saunders NR. The development of the blood–brain barrier: proteins in fetal and neonatal CSF, their nature and origins. In: Meisami E, Timiras PS, editors. Handbook of human growth and developmental biology. Boca Raton: CRC. 1988; 1(A): 169–91.

20. Adinolfi M, Haddad SA. Levels of plasma proteins in human and rat fetal CSF and the development of the blood–CSF barrier. Neuropadiatrie. 1977; 8(4): 345–53.

21. Dziegielewska KM, Habgood MD, Mollgard K, Stagaard M, et al. Speciesspecific transfer of plasma albumin from blood into different cerebrospinal fluid compartments in the fetal sheep. J Physiol. 1991; 439: 215–37.

22. Møllgard K, Balslev Y, Lauritzen B, Saunders NR. Cell junctions and membrane specializations in the ventricular zone (germinal matrix) of the developing sheep brain: a CSF–brain barrier. J Neurocyto.l. 1987; 16: 433–44.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Autumn 2013; 4(3): 305-311

Original Article

Effect of Embryonic Cerebrospinal Fluid on Proliferation and Self-Renewal of Wistar Rat Neuroprogenitor Cells

Yari S .Ph.D [1*], Parivar K .Ph.D [1], Nabiuni M. Ph.D [1], Keramatipour M. Ph.D [2]

1. Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

2. Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Email corresponding author: yarisiamak@yahoo.com

Received: 9 Feb. 2013 Accepted: 30 Apr. 2013

Abstract

Aim: During recent years many studies have suggested some developmental roles for embryonic cerebrospinal fluid. Here we examined the effect of embryonic cerebrospinal fluid on proliferation and self-renewal of embryonic ventricular zone derived neurosphere.

Material and Methods: Cortex from 15.5 day old embryonic Wistar rat dissected out and enzymaticaly dissociated to form single cell suspension. Cell suspension seeded in DMEM/F12 medium supplemented with N2 and mitogenes (10ng.ml^{-1} EGF and 20ng.ml^{-1} bFGF). The CSF-treated culture from different embryonic ages (E16, E18, and E20) in 10/100 ratio (v/v) was considered as experimental groups. Neurospheres number was counted for proliferation assay and cell viability evaluated with MTT assay. The data were analyzed with One-way ANOVA with turkey's post hoc test.

Results: Embryonic cerebrospinal fluid (e-CSF) enhanced neurosphere number. Also, embryonic cerebrospinal fluid (e-CSF) enhanced cell viability and growth.

Conclusion: Embryonic cerebrospinal fluid (e-CSF) enhanced proliferation and viability of neural progenitor cells in age dependent manner. Moreover, this fluid play important role in establishment of neuroprogenitor cells self-renewal.

Keywords: Embryonic cerebrospinal fluid, Neurosphere, Proliferation

Archive of SID

www.SID.ir