مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۷، شماره ۳ و ٤، بهار و تابستان ۱۳۸۵

بررسی تمایز سلول‌های بنیادی هیپوکامپ به سلول‌های استوانه‌ای شبکیه در موش بزرگ آزمایشگاهی

منوچهر صفری*[۱](Ph.D)، ملیحه نوبخت[۲](Ph.D)، ناهید رهبر[۳](Ph.D)، فریده قاضی[۴](Ph.D)، محمدتقی جغتائی[۲](Ph.D)، معصومه بخشایش[۵](M.Sc)

۱- دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی

۲- دانشگاه علوم پزشکی ایران،گروه علوم تشریحی

۳- دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه فارماکولوژی

۴- دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه بیولوژی سلولی و مولکولی

۵- دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

Archive of SID

چکیده

سابقه و هدف: چشم یکی از مهم‌ترین ارگان‌های بدن می‌باشد. در بیماری‌های فراوانی، آسیب به سلول‌های حساسه فتورسپتور وارد می‌شود. در حال حاضر بیش از یک‌صد جهش ژنتیکی وجود دارد که می‌تواند موجب آسیب به فتورسپتورها گردد. با استفاده از کشت و تمایز سلول‌های پرتوان بنیادی می‌توان در درمان این بیماری‌ها نقش مهمی داشت. هدف این تحقیق تمایز سلول‌های پرتوان بنیادی هیپوکامپ به سلول‌های فتورسپتور استوانه‌ای می‌باشد تا در آینده بتوان آن‌ها را در افراد نابینا جایگزین نمود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از جنین ۱۸ روزه موش نژاد اسپراگوداولی استفاده شد. در روز ۱۸، مادر سزارین گردید و مغز جنین‌ها خارج و سپس مغزها بلافاصله داخل محلول Hanks balance salt solution (HBSS) قرار داده شد. با استفاده از روش Banker هیپوکامپ‌ها جدا و با استفاده از روش Fishbach سلول‌های آن مجزا گردید و در داخل فلاسک $25cm^2$ کشت داده شد. بعد از ۳ روز سلول‌ها با استفاده از تریپسین از کف فلاسک‌ها کنده و در دو مقدار با دانسیته بالا 2×10^5 و دانسیته پائین 2×10^4 سلول، در داخل پلیت ۶ خانه قرار داده شد. قبل از انتقال سلول‌ها به داخل پلیت، کف یک ردیف از ول‌های پلیت با Poly L-lysine و ردیف دیگر با آستروسیت‌های غیرفعال کت گردید. به مدت ۴ روز سلول‌ها در محیط کامل DMEM/F12 و FBS10% نگه‌داری و سپس به مدت ۶ روز دوزهای متفاوت All trans retinoic acid (ATRA) و 9cis-RA به هر ول اضافه گردید. در پایان با استفاده از منوکلونال آنتی‌بادی آنتی‌اپسین و آزمون آماری ANOVA سلول‌ها بررسی شدند.

یافته‌ها: بعد از ۶ روز در محیط کشت بودن دوز 100^{nM} از 9cis-RA و 500^{nM} از ATRA بیش‌ترین سلول‌های تمایز یافته مشاهده شد. اما تعداد سلول‌های تمایز یافته در دوز 100^{nM} از 9Cis-RA بیش‌تر از دوزهای دیگر بوده است. در پلیت‌هایی که از دانسیته کم سلولی استفاده شد، تمایز سلولی کم‌تر بود. در پلیت‌های با پوشش پلی‌لیزین تمایزی مشاهده نگردید و تمایز فقط در بسترهای آستروسیتی وجود داشت.

نتیجه‌گیری: یافته‌های فوق نشان می‌دهد که بستر آستروسیت و فاکتورهای خارجی مانند ایزومرهای اسید رتینوئیک، قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی هیپوکامپ به سلول‌های مشابه فتورسپتور را خواهند داشت.

واژه‌های کلیدی: اسید رتینوئیک، هیپوکامپ، فتورسپتور، رات، سلول‌های بنیادی

* نویسنده مسئول. تلفن: ۳۳۳۲۰۸۰- ۰۲۳۱، نمابر: ۳۳۳۱۵۵۱- ۰۲۳۱، E-mail: kh_safari@yahoo.com

www.SID.ir

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۰/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۱/۲۹

مقدمه

با توجه به این‌که ارگان بینایی در سطح بدن قرار داشته و از طرفی کارکردی بسیار سخت و طولانی مدت دارد، آسیب‌های فراوانی به این ارگان وارد می‌شود. با افزایش سن و بیماری‌هایی هم‌چون گلوکوما، دیابت، Retinitis pigmentosa و دیگر بیماری‌ها، سلول‌های حساسه بینائی (فتورسپتورها) از بین خواهند رفت [۱،۲]. تحلیل رفتن فتورسپتورها یکی از علت‌های شایع کوری در انسان‌هاست [۱،۲]. جهش در سلول‌های ردوپسین اولین بار در سال ۱۹۹۰ گزارش شد. در حال حاضر بیش از ۱۰۰ نوع جهش ژنتیکی برای فتورسپتورها شناسائی شده و این فراوانی جهش، ناهنجاری‌های فراوانی را به‌دنبال خواهد داشت [۲]. در سلول‌های جهش یافته، سلول توانایی انتقال ردوپسین از غشاء را ندارد و آن‌را در داخل خود انبار می‌کند [۳]. بنابراین پروتئین‌های انبار شده نمی‌توانند تشکیل پیگمان‌های بینایی با 11 –Cis را ایجاد نمایند [۴]. در بعضی از بیماری‌ها مانند Transient retinal ischemia، افزایش فشار سیستولیک، انسداد شریان کاروتید داخلی و یا وجود آمبولی در شریان‌های چشمی در افراد دیابتی و یا افراد مسن موجب افزایش آپوپتوزیس در سلول‌های بینایی و آسیب به شبکیه چشم می‌شود؛ که متعاقب آن سلول‌های فتورسپتور از بین خواهند رفت و در حال حاضر هیچ درمانی هم برای این افراد وجود ندارد.

دانشمندان از مدت‌ها پیش توجه خاصی به سلول‌های بنیادی و تمایز این گروه از سلول‌ها به دیگر سلول‌های بدن داشته‌اند. سلول‌های بنیادی دارای دو خصوصیت قابل توجه می‌باشند؛ نخست این‌که چند استعدادی بوده، پس از تمایز قادرند به انواع متفاوت سلولی تبدیل شوند [۴] و دوم، می‌توانند بدون هیچ‌گونه محدودیتی و بدون از دست دادن توانایی رشد و نمو، به‌طور نامتناهی تقسیم شوند. به عبارت دقیق‌تر این سلول‌ها دارای قدرت تجدید خودبه‌خودی می‌باشند [۵]. وجود این دو ویژگی سبب شده که سلول‌های مذکور به عنوان ابزاری مناسب در بسیاری از کارهای پژوهشی و درمانی مورد استفاده قرار گیرند.

اگرچه سلول‌های بنیادی بالغ نسبت به سلول‌های بنیادی جنینی از نظر تمایز محدودیت‌هایی دارند، اما مزیت مهمی که استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ را توجیه می‌کند این است که از سلول‌های خود فرد برای جایگزینی ناحیه آسیب دیده استفاده می‌شود، لذا سیستم ایمنی فرد فعال نمی‌شود و در نتیجه بافت و سلول‌های پیوند زده شده پس زده نخواهد شد [۶]. سلول‌های بنیادی عصبی را از نواحی متفاوتی از مغز مانند هیپوکامپ، ناحیه اطراف بطنی، مغز قدامی، استریاتوم و پیاز بویایی می‌توان استخراج کرد و کشت داد [۸،۷،۲]. این سلول‌ها نه تنها در جنین بلکه در بالغین نیز وجود داشته و توانایی تمایز را نیز دارا می‌باشند [۸]. در تحقیقات محققین مشخص شده برخی از فاکتورها برای بقاء و برخی دیگر برای رشد فتورسپتورها ضروری می‌باشند؛ مانند EGF (Epidermal growth factor)، FGF (Fibroblast growth factor) و RA [۹]. رسپتورهای اسید رتینوئیک در طی تکامل در داخل رتینا بیان می‌شوند. اگر اسید رتینوئیک و ایزومرهای آن‌را قبل و یا بعد از تشکیل رتینا به‌کار بریم باعث تغییر الگوی رتینا خواهیم شد [۸]. وجود ATRA در محیط کشت جنین ۸ روزه جوجه، باعث کامل شدن نوروژنز در محیط کشت خواهد شد [۵،۱۰].

اسید رتینوئیک فاکتوری است که در سیر تکامل از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. در تحقیقی دانشمندان رتینای جنین ۱۸ روزه رات را در داخل پلیت کشت داده، سپس دوزهای متفاوت ATRA و RA 9-cis را بر روی آن‌ها تست نمودند. نتایج نشان داد که 9-Cis تمایل زیادی به چسبیدن به رسپتورهای RXR دارد [۱۲،۱۱].

بستر کشت در تمایز از اهمیت خاصی برخوردار است. در تحقیقات دانشمندان مشخص شده اگر سلول‌های رده اکتودرمال را بر روی لایه‌ای از سلول‌های مزودرمال کشت دهیم می‌توانیم سلول‌های رده مزودرمال را تولید کنیم [۱۳]. دانسیته نیز در تمایز سلول‌ها از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار

Archive of SID

www.SID.ir

است. در بیش‌تر تحقیقات تمایز سلولی فقط در دانسیته‌های بالای سلولی انجام پذیرفته و دانسیته‌های پائین نتوانستند در تمایز سلولی نقشی داشته باشند [۳،۱۴]. بنابراین در طی تمایز، فاکتورهای فراوانی نقش دارند که می‌بایست آن‌ها را بررسی نمود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی. در این پژوهش از موش نر نژاد اسپراگوداولی (انستیتو رازی تهران) استفاده شد. به منظور به‌دست آوردن موش‌های باردار، موش‌های ماده به صورت یک به یک به مدت یک شب در کنار موش‌های نر قرار گرفتند. برای تعیین بارداری از نظر پلاک واژینال بررسی شدند و روز صفر بارداری تعیین گردید. در روز ۱۸ بارداری موش‌های باردار به طریق Cervical dislocation کشته شدند. سپس رحم، باز و تمام جنین‌ها خارج شد و در داخل محلول Hanks buffer salt solution (HBSS) سرد قرار داده شد. جنین‌ها بلافاصله به زیر هود منتقل گردید، سر آن‌ها جدا و با استفاده از روش Banker [۴] هیپوکامپ‌ها خارج شد. با استفاده از متد Fair pasture pipette و تریپسین ۰/۰۱٪ روش Fishbach [۱۵]، سلول‌های هیپوکامپ از یک‌دیگر مجزا شد و با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سلول‌ها جدا گردید؛ مایع رویی خارج و سلول‌ها به صورت یک پلت نازک در کف فالکون باقی ماندند. ۲^{cc} محیط کشت بدون سرم به آن اضافه شد و با استفاده از پیپت برقی به صورت معلق درآمد. با استفاده از تریپان بلو و لام هموسیتومتر سلول‌های زنده، شمارش و سپس در دو گروه با دانسیته کم ۲×۱۰^{۴} و زیاد ۲×۱۰^{۵} داخل پلیت‌های ۶ خانه قرار داده شد. قبل از انتقال سلول‌ها به داخل پلیت، ابتدا ردیف اول پلیت‌ها با ۱۰µg/ml از Poly L-lysin و ردیف دوم پلیت نیز با آستروسیت‌های غیرفعال کورتکس پوشش داده شد. برای جداسازی آستروسیت از کورتکس از روش Jurlink [۱۲] استفاده شد. سپس با استفاده از ۱۰µM Cytosine arabinoside به مدت ۲۴ ساعت سلول‌های آستروسیت متصل شده به کف پلیت غیرفعال گردیدند، بعد با PBS (Phosphate buffer saline) ول‌ها شستشو داده شدند. در نهایت پلیت‌ها آماده استفاده بودند. ابتدا در یک گروه از پلیت‌ها سلول‌های با دانسیته کم و در پلیت دیگر سلول‌های با دانسیته بالا قرار داده شد. به مدت ۴ روز سلول‌ها در داخل محیط DMEM/F12 و FBS10% قرار داده شد، بعد از این مدت دوزهای ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ نانومول از ATRA و 9-CIS به‌طور جداگانه به هر ول اضافه و به مدت ۶ روز این دوزها تست گردیدند. بعد از این مدت ایمیونوسیتوشیمی اختصاصی آنتی‌اپسین برای پلیت‌ها انجام شد. بعد از ایمیونوسیتوشیمی، سلول‌های رنگ شده (تمایز یافته) شمارش و با استفاده از تست آماری One way ANOVA نتایج مورد ارزیابی قرار گرفتند.

سنجش آنزیمی. فعالیت آلکالین فسفاتازی، یکی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی تمایز نیافته است. در این روش با استفاده از 1,4 Diaminobutane dihydro-chloride (α naphteal phosphate) کلونی‌های سلولی تمایز نیافته قهوه‌ای پررنگ می‌گردند و سلولهای تمایز نیافته و هم‌چنین لایه مغذی هیچ‌گونه فعالیت آلکالین‌فسفاتازی از خود نشان نمی‌دهند. (شکل ۱)

ایمیونوسیتوشیمی. برای ایمیونوسیتوشیمی غیرمستقیم، ابتدا بعد از اضافه کردن دوزهای متفاوت فاکتورهای فوق به مدت ۶ روز سلول‌ها در پارافرمآلدئید ۴ ٪ و Triton X100 ۰/۳٪ به مدت نیم ساعت فیکس و سپس مدت نیم ساعت با PBS سرد ۳ مرتبه شستشو داده شد. سپس در Normal gout serum در حرارت ۴^{oC} یک ساعت انکوبه شد تا مناطق غیراختصاصی سلول‌ها حذف گردد؛ بعد مدت یک ساعت در آنتی‌بادی اولیه که منوکلونال آنتی‌بادی آنتی‌اپسین (RET P1) بود انکوبه گردید، سپس شستشو و بعد در آنتی‌بادی ثانویه کونجوگه به آلکالین فسفاتاز به مدت یک

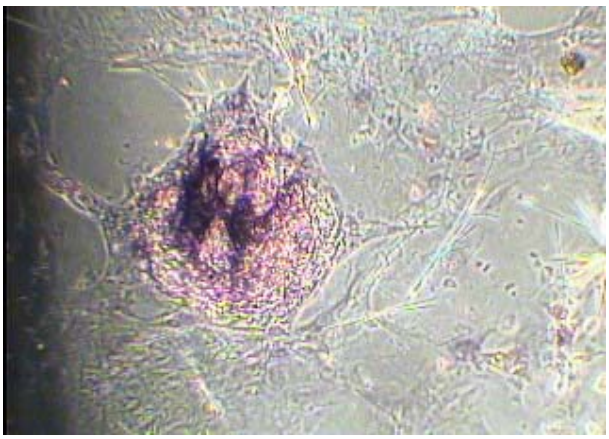
Archive of SID

www.SID.ir

ساعت قرار داده شد و در مرحله آخر سوبسترای مخصوص در اختیار آن‌ها قرار گرفت و سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی شدند.

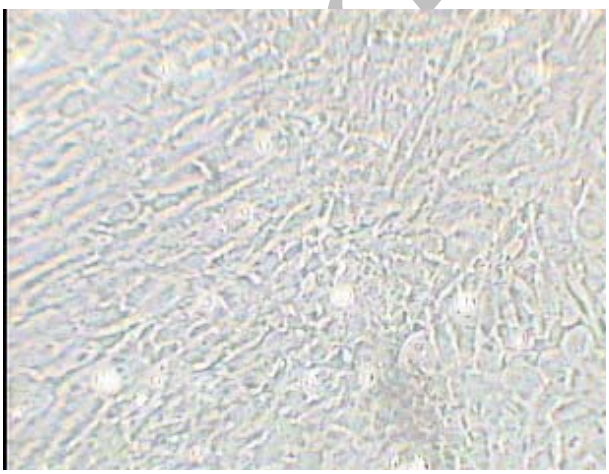
نتایج

رسپتورهای ATRA جزء زیر گروه رسپتورهای استروئیدی است، شامل (RARs) و (RXR) می‌باشد [۱۲]. سلول‌های بنیادی هیپوکامپ جدا شده با دانسیته بالا در روز اول سلول‌ها به صورت مجزا و در دو گروه کوچک و بزرگ بوده (شکل ۲)، در روز دوم به لایه فیدر متصل شده و شکل اپی‌تلیالی را به خود می‌گرفتند (شکل ۳). اما در گروه‌های با دانسیته پایین، بعد از ۴ روز ماندن در محیط کشت، سلول‌ها نتوانستند تمام کف پلیت‌ها را پر کنند و در تماس کامل با یک‌دیگر باشند. بعد از ۶ روز که سلول‌ها دوزهای متفاوت 9–Cis را دریافت می‌کردند، در دوز ۱۰۰ nM با بستر آستروسیت بیش‌ترین تعداد سلول‌های تمایز یافته مشاهده شد (شکل۴). البته در دوزهای ۱۰ تا ۵۰۰ نانومول نیز تمایز وجود داشت، اما نسبت به دوز ۱۰۰ نانومول تعداد کم‌تری سلول تمایز یافته مشاهده می‌شد. در گروه‌های با بستر پولی لیزین در تمام دوزها و هم‌چنین در گروه‌های با دانسیته پائین و بالا، سلول تمایز یافته‌ای مشاهده نشد. در گروه‌هایی که در مدت زمان ۶ روز ATRA را دریافت می‌کردند، در دوز ۵۰۰ نانومول با بستر آستروسیت، بیش‌ترین تعداد سلول‌های تمایز یافته مشاهده گردید (شکل ۵). در دوزهای ۱، ۱۰ و ۵۰ نانومول سلول تمایزیافته‌ای دیده نشد. در دوزهای بین ۱۰۰ تا ۴۰۰ نانومول تمایز سلولی وجود داشت، اما در مجموع با شمارش تمام سلول‌های رنگ شده در پلیت‌ها و استفاده از نرم‌افزار Excel و آزمون ANOVA مشخص شد، در دوز ۱۰۰ نانومول 9-cis تعداد سلول‌های تمایزیافته، بیش‌ترین تعداد در تمام گروه‌ها بوده و در دوزهای دیگر، نتایج متفاوت بوده است (شکل ۶).



شکل ۱. فعالیت آلکالین‌فسفاتازی کلونی سلولی حاوی سلول‌های بنیادی با استفاده از روش α نفتیل فسفات. (بزرگ‌نمایی×۲۰)

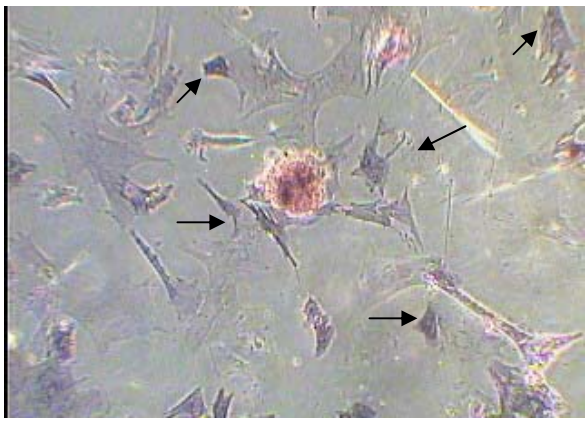
شکل ۲. سلول‌های بزرگ و کوچک بعد از جدا کردن سلول‌های هیپوکامپ در محیط آزمایشگاه (بزرگ‌نمایی ۱۰×).
فلش توخالی سلول کوچک و توپر سلول‌های بزرگ را نشان می‌دهد.



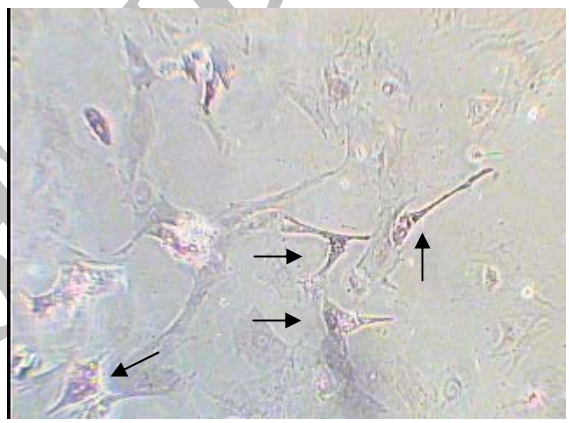
شکل ۳. سلول‌های جدا شده از هیپوکامپ بعد از ۴ روز، سلول‌ها کاملاً کف پلیت را پوشانده‌اند. (بزرگ‌نمایی ×۱۰).

Archive of SID

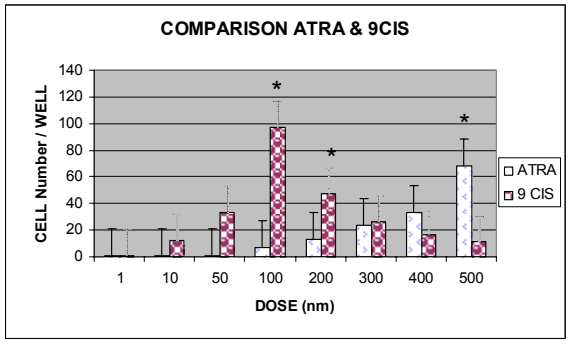
www.SID.ir



شکل ۴. سلول‌های تیره رنگ شده با آنتی‌بادی منوکلونال آنتی‌اپسین. سلول‌های تمایزیافته به سلول فتورسپتور استوانه‌ای با استفاده از ۱۰۰ nM از فاکتور 9-cis RA. (بزرگ‌نمایی ×۱۰)



شکل ۵. سلول‌های رنگ شده با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال آنتی‌اپسین. سلول‌های تمایزیافته به سلول‌های فتورسپتور استوانه‌ای با استفاده از ۱۰۰ nM از فاکتور ATRA. (بزرگ‌نمایی×۱۰)



شکل ۶. نمودار تعداد سلول‌های بنیادی تمایزیافته به فتورسپتور استوانه‌ای با دوزهای متفاوت 9-cis و ATRA و مقایسه آن‌ها با یک‌دیگر. (P<۰/۰۰۱*) نمایانگر تغییر معنی‌دار در میزان پاسخ سلول‌ها به دوزهای متفاوت ATRA و ایزومر آن 9-CIS-RA می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر مطالعات فراوانی نشان داده که تقابل سلول به سلول برای تمایز نرون‌های رتینال مهره‌داران چه در محیط in vivo یا in vitro لازم و ضروری می‌باشند [۱۵]. سلول‌های رتینا برای تحقیقات دانشمندان به عنوان یک مدل به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۱]. آزمایشات کشت هم‌زمان یا Co-culture نشان داده که تمایز سلول‌های اجدادی رتینا به‌وسیله سیگنال‌های قابل انتشار در محیط خارج سلولی کنترل می‌گردد [۱۲]. درمطالعه حاضر نشان داده شد که اسید رتینوئیک و ایزومر آن می‌توانند بر روی سلول‌های بنیادی هیپوکامپ تاره استخراج شده تأثیر گذاشته و باعث تمایز آن‌ها به فتورسپتور گردد. Watanabe در سال ۱۹۹۲ نشان داد که اگر سلول‌های جدا شده رتینا از جنین ۱۵ روزه رات را با سلول‌های رتینای جدا شده رات بالغ به صورت هم‌زمان کشت دهیم، بیش‌تر سلول‌های جنینی به سلول‌های استوانه‌ای تمایز خواهند یافت [۳] و در تحقیقات ما کشت هم‌زمان سلول‌های هیپوکامپ با آستروسیت‌ها باعث تمایز سلول‌های هیپوکامپ خواهند شد. Mattew و Kelly در تحقیقات خود نشان دادند که ۵۰۰ نانومول از ATRA می‌تواند باعث تمایز سلول‌های بنیادی رتینا به سلول‌های استوانه‌ای گردد. هم‌چنین سلول‌ها وابسته به دوز عمل می‌نمایند و بیش‌ترین تأثیر در دوز ۵۰۰ نانومول و کم‌ترین تأثیر در دوز ۱۰ نانومول بوده است [۱۵]. اما در تحقیق ما مشاهده گردید که دوز ۱۰ نانومول باعث تمایز نخواهد شد و ایزومر اسید رتینوئیک بیش‌تر از خود آن در تمایز شرکت دارد.

با توجه به این‌که اسید رتینوئیک و ایزومر آن نمی‌توانند به تنهایی باعث تمایز سلول‌های بنیادی هیپوکامپ گردند و بستر در تمایز از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. بر مبنای نظریه Reh و Caga انتخاب فنوپیپ سلول‌های بنیادی وابسته به حساسیت سلول‌ها به فاکتورهای متفاوت است [۹]. بعضی از مطالعات دانشمندان نشان داده که تمایز سلول‌های رتینای جنین رات به فتورسپتورها در محیط آزمایشگاه [۹] و هم‌چنین در مرحله بعد از تولد [۱۷] و یا در جنین قورباغه

Archive of SID

www.SID.ir

[۱۰] وابسته به دانسیته و تراکم سلولی در محیط کشت است [۱۷]. در مطالعه ما نیز تراکم از اهمیت خاصی برخوردار بود به‌طوری‌که پلیت‌های با دانسیته پایین قابلیت تمایزی اندکی را داشتند و حتی مدت زمان زنده ماندن سلول‌ها بسیار کم‌تر بوده است، بنابراین ارتباط بین سلولی و احتمالاً فاکتورهایی که خود سلول‌ها در تماس با یکدیگر ترشح می‌نمایند، یکی از فاکتورهای بسیار مهم هم در زنده ماندن سلول‌ها و هم در تمایز سلول‌ها می‌باشند؛ اما چه فاکتوری در این بین ترشح می‌گردد هنوز دقیقاً مشخص نشده است.

Altsuler در تحقیقات خود نشان داد که فاکتور Taurine قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی رتینا به فتورسپتورها را دارد بنابراین اسید رتینوئیک و این فاکتور اثری مشابه یک‌دیگر دارند [۱۸]. آن‌ها ثابت کردند که رتینوئیدها در بقاء و زنده ماندن سلول‌های فتورسپتور در کشت سلول‌های رتینای جنین جوجه در محیط آزمایشگاه نقش مهمی دارند. مطالعات دیگر محققین نشان داد که رتینوئیک اسید نقش‌های مشابهی در دیگر سلول‌ها دارد [۱۵]. مطالعات نشان داد که اسید رتینوئیک توسط سلول‌های رتینای جنینی ساخته می‌شود و حداقل ۴ نوع دهیدروژناز وابسته به ساخته شدن اسید رتینوئیک در طی تکامل و بعد از تکامل سلول‌های رتینای موش دیده شده است [۵] و بر این مبنا اسید رتینوئیک یکی از فاکتورهای بسیار مهم در سیر تکاملی در سلول‌های رتینا می‌باشد [۱۱]. تحقیقات Cheryl نشان داد که اضافه کردن اسید رتینوئیک به محیط کشت سلول‌های بنیادی استریاتا در مغز باعث تمایز این سلول‌ها به نورون خواهد شد. در تحقیقات او ماکزیمم مقدار دوز برای تمایز، ۱۰۰ nM بوده است. او هم‌چنین نشان داد که تعداد سلول‌های تمایز یافته در گروه آزمایش که فاقد سرم در محیط کشت بوده‌اند حداقل دو برابر گروه کنترل بوده است که در محیط کشت خود دارای سرم بوده‌اند؛ بنابراین سرم، خود یک عامل مهاری برای تمایز محسوب می‌گردد [۱۹]. Gulgun در سال ۱۹۹۹ در تحقیقات خود به این نتیجه رسید که کشت سلول‌های بنیادی اولیه با دانسیته پائین نسبت به تغییرات آپوپتوزیس بسیار حساس‌تر از کشت سلول‌های با دانسیته بالا است و به همین دلیل کشت سلول‌های با دانسیته پائین سریع‌تر دچار تغییرات آپوپتوزیس می‌گردند و عمر کوتاه‌تری دارند. او نشان داد که در گروه سلول‌های با دانسیته پائین بیان ژن bcl2&bcl-xl بسیار بالاتر و ژن bax کم‌تر می‌باشد [۲۰]. تحقیقات ما نیز با یافته‌های فوق هم‌خوانی دارد. بنابراین با توجه به یافته‌های فوق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ATRA در تمایز اهمیت دارد، اما ایزومر آن 9-Cis اثرات به مراتب قوی‌تری در تمایز خواهد داشت، دوم این‌که این فاکتورها بر روی بستر آستروسیتی اثر تمایزی دارند و بالاخره سوم این‌که در دانسیته بالا خصوصیات تمایزی سلول‌های بنیادی بیش‌تر از دانسیته پائین است.

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده و مراحل کارهای عملی آن در بخش کشت سلول گروه فارماکولوژی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران به انجام رسیده است؛ با تشکر از تمامی همکاران این دو بخش.

منابع

[1] Timmers AM, Fox DA, He L, Hansen RM, Fulton AB. Rod photoreceptor maturation does not vary with retinal eccentricity in mammalian retina. Curr Eye Res, 1999; 18(6):393-402.

[2] Alvarez-Buylla A, Temple S. Stem cells in the developing and adult nervous system. J Neurobiol, 1998; 36(2):105-10.

[3] Watanabe N, Miyake Y, Wakabayashi T, Usukura J. Periciliary structure of developing rat photoreceptor cells. A deep etch replica and freeze substitution study. J Electron Microsc (Tokyo), 1999; 48(6):929-35.

[4] Banker GA, Cowan WM. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. Brain Res, 1977; 126(3):397-42.

[5] Tomita M, Adachi Y, Yamada H, Takahashi K, Kiuchi K, Oyaizu H, et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. Stem Cells, 2002; 20(4):279-83.

[6] Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell, 1999; 96(1):25-34.

[7] Amit M, Itskovitz-Eldor J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. J Anat, 2002; 200(Pt 3):225-32.

[8] Shen Q, Qian X, Capela A, Temple S. Stem cells in the embryonic cerebral cortex: their role in histogenesis and patterning. J Neurobiol, 1998; 36(2):162-74.

[9] Anchan R, Angello J, Balliet A, Walker M, Reh TA. EGF and TGF stimulate retinal germinal neuroepithelial proliferation. Neuron, 1991; 6:1-20.

Archive of SID

www.SID.ir

[10] Harris WA. Axonal pathfinding in the absence of normal pathways and impulse activity. J Neurosci, 1984; 4(4):1153-62.

[11] Lillien L, Cepko C. Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF alpha. Development, 1992; 115(1):253-66.

[12] Jablonski MM, Graney MJ, Kritchevsky SB, Iannaccone A. Reliability assessment of a rod photoreceptor outer segment grading system. Exp Eye Res, 2001; 72(5):573-9.

[13] Keirstead HS. Stem cell transplantation into the central nervous system and the control of differentiation. J Neurosci Res, 2001; 63(3):233-6.

[14] Saliba RS, Munro PM, Luthert PJ, Cheetham ME. The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation. J Cell Sci, 2002; 115(Pt 14):2907-18.

[15] Kelley MW, Turner JK, Reh TA. Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors in vitro. Development, 1994; 120(8):2091-102.

[16] Juurlink BH, Fedoroff S, Hall C, Nathaniel EJ. Astrocyte cell lineage. I. Astrocyte progenitor cells in mouse neopallium. J Comp Neurol, 1981; 200(3):375-91.

[17] Akagawa K. Presence of light-responding neurons in the reaggregate cultures of rat retinae. Brain Res Dev Brain Res, 1990; 57(1):143-5.

[18] Altshuler D, Lo Turco JJ, Rush J, Cepko C. Taurine promotes the differentiation of a vertebrate retinal cell type in vitro. Development, 1993; 119(4):1317-28.

[19] Wohl CA, Weiss S. Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors. J Neurobiol, 1998; 37(2):281-90.

[20] Tezel GM, Seigel GM, Wax MB. Density-dependent resistance to apoptosis in retinal cells. Curr Eye Res, 1999; 19(5):377-88.

Archive of SID

www.SID.ir