Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان

سال نهم، شماره ۱ (مسلسل ۳۳) پائیز ۱۳۸۳

تمایز سلولهای بنیادی رویانی CCE به سلولهای عصبی به روش آزمایشگاهی

فردین فتحی[۱*]، تقی طریحی[۱]، سید جواد مولی[۲]، منصوره موحدین[۳]

چکیده

- **مقدمه**: ظرفیت سلولهای بنیادی رویانی در تمایز به سلولهای مختلف سازنده بدن و توانائی تجدید خود بطور نامحدود، این سلولها را به یک منبع دهنده و جذاب سلولی جهت انجام مطالعات مربوط به تکوین جنین و استراتژیهای سلول درمانی و ژن درمانی مبدل ساخته است. در پژوهش حاضر دودمان سلولی CCE به سلولهای عصبی تمایز داده شد.
- **مواد و روشها**: برای شروع آزمایش سلولهای جدا شده از فلاسکهای کشت به پتری دیشهای سیلیکونیزه منتقل شدند. تحت این شرایط سلولها بطور ناگهانی مجتمع شده و اجسام شبه رویانی را در محیط کشت تشکیل دادند. اجسام شبه رویانی بدست آمده به مدت چهار روز در محیط کشت فاقد رتینوئیک اسید و چهار روز در محیط کشت حاوی اسید رتینوئیک کشت داده شدند. سپس به پتری دیشهای مخصوص کشت سلولهای چسبنده منتقل شده و تحت ارزیابی مورفولوژیک قرار گرفتند. همچنین از رنگ‌آمیزی کرزیل ویولت و ارزیابی ایمونوسیتوشیمی به کمک آنتی بادیهای نستین و سیناپتوفیزین جهت تایید فنوتیپ سلولهای شبه عصبی حاصله استفاده گردید.
- **یافته‌ها**: نتایج بعمل آمده از این پژوهش نشان داد که چند روز پس ازانتقال اجسام شبه رویانی به فلاسکهای مخصوص کشت سلولهای چسبنده، سلولهای شبه عصبی در حاشیه آنها ظاهر شده و بتدریج مورفولوژی سلولهای عصبی را بیشتر کسب می‌کنند. این سلولها با اتصال به کف پتری دیشها رشد کرده و با گذشت زمان بر تراکم آنها افزوده می‌گردد. مشاهده اجسام نیسل در رنگ‌آمیزی کرزیل ویولت و مثبت بودن نتیجه واکنشهای ایمونوسیتوشیمی ماهیت عصبی سلولهای تمایز یافته را تائید کرد.
- **نتیجه‌گیری**: آنچه از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت این است که اجسام شبه رویانی که در پتری دیشهای سیلیکونیزه از دودمان سلولی CCE تهیه می‌شود قادر است تحت تأثیر اسید رتینوئیک به سلولهای عصبی تمایز پیدا کند. همچنین سلولهای CCE دودمان سلولی مناسبی جهت شبیه‌سازی مراحل مختلف تکوین عصبی جنین به صورت آزمایشگاهی می‌باشند.

- **واژه‌های کلیدی:** اجسام شبه رویانی، تمایز سلولی، سلولهای بنیادی رویانیCCE

تاریخ وصول مقاله: ۸۳/۱۰/۳ ـ تاریخ پذیرش مقاله ۸٤/٦/۲

*(مؤلف مسؤول)

۱- دانشجوی Ph.D، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران،

۲- استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سلولهای بنیادی[1] سلولهایی با استعداد و ظرفیتهای چندگانه[2]، نامیرا[3] و پایدار[4] هستند ابزار قدرتمند و مفیدی جهت مطالعه مراحل تکوین جنین، در محیط آزمایشگاه محسوب می‌شوند. همچنین این سلول‌ها دارای کاربردهای درمانی وسیعی بوده و منبع نا محدودی از سلول را برای استفاده در پیوند و ترمیم بافت فراهم می‌کنند (۱). این سلولها شامل سلولهای بنیادی رویانی، سلولهای زایای رویانی[5]، سلولهای بنیادی جنینی[6]، سلولهای بنیادی کارسینومای رویانی[7] و سلولهای بنیادی بالغ[8] هستند. سلولهای بنیادی مذکوراز نظر منشأ، قدرت تمایز به سلولهای مختلف و مدت زمان حفظ توانائی تجدید خود متفاوت هستند (۵-۱).

سلولهای بنیادی رویانیES از بلاستوسیست منشأ می‌گیرند، قابلیت تکثیر نامحدود و تمایز به اکثر سلولها را دارا هستند و ساختار ژنومی طبیعی شان را هم حفظ می‌کنند. مشخص شده است که سلولهای بنیادی رویانی انسان می‌توانند تا دو سال هم تکثیر شوند و در طی این مدت ۳۰۰ چرخه سلولی را پشت سر بگذارند. این مشخصه در هیچکدام از سلولهای بنیادی بالغین دیده نشده است (۶). بایستی تأکید کرد که بعنوان مثال بعد از گذشت ۴۰ سال تحقیقات وسیع و دامنه‌دار، محققین هنوز هم قادر نیستند که سلولهای بنیادی خونساز منشأ گرفته از مغز استخوان را طوری تکثیر کنند که توانایی تجدید خود را از دست ندهند این در حالی است که سلولهای مذکور از اهمیت درمانی بالائی نیز برخوردار می‌باشند (۶).

علاوه بر ویژگی تجدید خود، سلولهای بنیادی رویانی را می‌توان با استفاده از تغییر شرایط رشد و تکثیر آنها در یک جهت تمایزی خاص سوق داده و بعنوان مثال به سلولهای عصبی، سلولهای عضلانی قلب یا سلولهای مترشحه انسولین تبدیل کرد. این ویژگی سلولهای بنیادی رویانی باعث شده است که راهی به سمت تکامل درمانهای جدید باز شود. وجود نمونه‌هایی از تصحیح عملکرد در بیماریهای نورودژنراتیو در مدلهای حیوانی مختلف که در اثر پیوند مقادیر کمی از سلولهای بنیادی رویانی تمایز یافته و تمایز نیافته ایجاد شده است مشوق محققین در این جهت است (۶). علاوه بر این سلولهای بنیادی رویانی که از طریق تکنیکهایی مانند Nuclear transplantation, Homologous recombinantion و retroviral transduction تغییر ماهیت پیدا کرده‌اند به محققین اجازه داده است جهت مطالعه مسیرهای تکاملی که در بیماریهای ژنتیکی دچار موتاسیون شده‌اند مدلهای آزمایشگاهی مختلفی را ایجاد کنند. تکامل بیشتر تکنیکهای مذکور به فهم بهتر پاتوفیزیولوژی این بیماریها کمک نموده و محققین را برای بکارگیری تکنیکهای درمانی جدید توانا می‌سازد (۶).

یکی از مراحل ضروری جهت تمایز سلولهای بنیادی رویانی به اکثر سلولها از جمله سلولهای عصبی تهیه اجسام شبه رویانی از این سلولهاست. اجسام شبه رویانی توده‌های سلولی متراکمی هستند که شبیه بلاستوسیست در زمان جنینی عمل میکند. ارتباطات سلولی یا اینتراکشنهایی که مابین سلولها اتفاق می‌افتد جهت تمایز سلولهای بنیادی رویانی ضروری می‌باشند. تا بحال از روشهائی مانند روش قطره آویزان یا کشت سلولها در پتری دیشهای باکتریولوژیک جهت تشکیل اجسام شبه رویانی استفاده شده است (۱۵-۷). اما در این پژوهش اجسام

1. Stem cell lines
2 . Pluripotent
3 . Immortal
4 . Established
5 . Embryonic Germ Cells
6 . Fetal stem Cells
7. Embryonic Carcinoma Stem Cells
8. Adult Stem Cells

www.SID.ir

Archive of SID

شبه رویانی تهیه شده در پتری دیشهای سیلیکونیزه شده به سلولهای عصبی تمایز داده شدند و بدینوسیله توانائی پتری دیشهای سلیکونیزه در فرایند تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای عصبی به صورت کیفی ارزیابی شد. راه اندازی و بهینه سازی فرایند کشت و تمایز سلولهای بنیادی رویانی جهت استفاده از خاصیت درمانی آنها اهمیت فراوانی دارد. در این پژوهش کارآئی سلولهای بنیادی رویانی CCE بعنوان تنها دودمان سلولی قابل دسترس (در داخل کشور) و نیز بعنوان سلولهائی که توانائی تمایز آنها به سلولهای عصبی به میزان خیلی کمی ارزیابی شده است (۱۸)، در تمایز به سلولهای عصبی تحت ارزیابی قرار گرفت تا در ادامه پژوهش از آنها جهت درمان مدل آزمایشگاهی بیماری پارکینسون استفاده شود.

مواد و روشها

کشت سلولهای بنیادی رویانی (۱۸و۱۷) در این پژوهش پاساژ بیستم دودمان سلولی CCE مورد استفاده قرار گرفت. جهت کشت این سلولها از محیط کشت DMEM[1] (گیبکو)، سرم FBS[2](گیبکو) به میزان ۱۵٪، پنی‌سیلین ۱۰۰u/ml، استرپتومایسین u/ml (گیبکو) ۵۰، ۲مرکاپتواتانول 5×10^{-5}M (سیگما) و LIF[3] با غلظت ۱۰ng/ml (Stem cell life technology) استفاده گردید. سلولها در دیشهای ۶۰ میلیمتری که کف آنها بوسیله ژلاتین ۰/۱٪ حل شده در PBS پوشانده شده بود کشت داده شدند. دمای انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و میزان CO_2 آن ۵٪ بود. جهت انجماد سلولها از محیط انجماد حاوی ۹۰ درصد سرم و ۱۰ درصد DMSO[4] استفاده شد. سلولها هر دو الی سه روز یکبار قبل از اینکه دیش محتوی سلولها از سلول پر شود به نسبت یک به سه یا یک به چهار ساب کالچر داده شدند.

تمایزسلولهای CCE به سلولهای عصبی

اجسام شبه رویانی حاصل از سلولهای CCE با استفاده از از اسید رتینوئیک از نوع All trans (سیگما) با غلظت 5×10^{-7} [۱۷] مولار و روش معروف به ۴&۴[۱۸] به سلولهای عصبی تمایز داده شد. مطابق این روش سلولها با غلظت 1×10^{5} سلول در میلی‌لیتر به پتری دیشهای باکتریولوژیک ۱۰۰ میلی‌متری و شیشه‌ای سیلیکونیزه شده منتقل شده و در محیط کشت مخصوصی که در مرحله تکثیر سلولها از آن استفاده شد کشت داده شدند با این تفاوت که محیط کشت فاقد LIF و۲مرکاپتواتانول بود. تحت این شرایط سلولها بصورت معلق رشد کرده و تشکیل اجسام شبه رویانی را دادند. بعد از دو روز محیط کشت سلولها با محیط کشت مشابهی تعویض شد. برای این منظور محیط کشت حاوی اجسام شبه رویانی (با چشم غیر مسلح قابل رؤیت هستند) به داخل لوله سانتریفیوژ ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شده، پس از گذشت ۵ الی ۱۰ دقیقه اجسام شبه رویانی در ته لوله ته نشین شدند. سپس با استفاده از پی پت محیط رویی سلولها دور ریخته شده، محیط کشت تازه و مشابه جایگزین آن شد. سلولها مجدداً به پتری دیشهای جدید منتقل شدند. پس از گذشت دو روز با روش مشابهی محیط کشت سلولها با محیط کشت حاوی اسید رتینوئیک تعویض شد. مجدداً پس از گذشت دو روز محیط کشت سلولها با محیط کشت مشابهی تعویض شد. نهایتاً در روز ۸ از شروع آزمایش (روز اول روز ۰ در نظر گرفته شد) سلولها به دیشهای پوشیده شده با ژلاتین ۰/۱٪ حاوی محیط کشت فاقد اسید رتینوئیک منتقل شدند. بعد از انتقال سلولها به دیشهای مذکور، به منظور بررسی تغییرات مورفولوژیک

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
2. Fetal Bovine Serum
3. Lukemia inhibitor factor
4. Dimethylsulfoxide

www.SID.ir

Archive of SID

سلولها از میکروسکوپ معکوس استفاده شد. به منظور بررسی ایمونوسیتوشیمی، رنگ‌آمیزی اختصاصی سلولهای عصبی (کرزیل ویوله) نیز استفاده شد.

در هنگام تمایز سلولی در کف بعضی از دیشها کاور اسلیپهایی(یا لاملهایی) قرار داده شده و پس از پوشاندن آنها با ژلاتین ۰/۱٪ تعدادی از اجسام شبه رویانی به این دیشها منتقل شدند تا سلولهای حاصل از تمایز تحت ارزیابی ایمونوسیتوشیمی قرار گیرند. سلولهای حاصل از تمایز سلولها در روزهای دوازدهم و شانزدهم پس از شروع آزمایش به ترتیب با استفاده از آنتی‌بادیهای نستین و سیناپتوفیزین تحت ارزیابی ایمونوسیتوشیمی واقع شدند.

گروه کنترل: هنگام تمایز هر دو دودمان سلولی فوق‌الذکر از گروه کنترل نیز استفاده شد. در این گروه تمام شرایط مشابه گروه آزمایش بود بجز اینکه محیط کشت سلولها فاقد اسید رتینونیک بود.

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی

لاملهائی که در کف دیشها جاگذاری شده بودند برای بررسی ایمونوسیتوشیمی مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا لاملها را در کف دیشها به آرامی با PBS شستشو داده، سپس از محلول پارافرمالدئید ۴٪ تازه (PH=۷/۴) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق برای فیکس کردن سلولها استفاده شد. پس از شستشوی آرام سلولها با PBS، لاملها به کمک یک پنس کوچک بر روی لایه‌ای از پارافیلم که بر روی سطح بیرونی کف یک پتری دیش کوچک کشیده شده بود چیده شدند. پتری دیش مذکور در کف پتری دیش شیشه‌ای بزرگتری که حاوی مقداری بافر فسفات بود قرار داده شد. پس از گذاشتن در پتری دیش بزرگ، دورتا دور پتری دیش، پارافیلم پیچیده شده و در مراحل بعدی ایمونوسیتوشیمی با توجه به مرحله انجام آزمایش در دمای ۴ درجه، دمای اتاق یا در داخل انکوباتور نمونه‌ها انکوبه شدند. اعمال مذکور بویژه برای جلوگیری از تبخیر حلال حاوی آنتی‌بادی و خشک شدن لاملها ضروری است. روی لاملها محلول نفوذ پذیر کننده ریخته و آنها را ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کردیم. این محلول غشای سلول‌ها را نفوذپذیر می‌کند بطوری که بافرها و محلولها در مراحل بعدی بتوانند وارد سلول شوند. لامل‌ها با PBS شستشو داده شدند. از این مرحله به بعد برای ریختن وپس از آن برداشتن محلولهای مختلف از روی لاملها و نیز شستشوی لاملها از سمپلر ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتری استفاده شد. بایستی دقت نمود که این اعمال به آرامی انجام شود و گوشه‌ای از لامل بعنوان محل قرارگیری سر سمپلر انتخاب شود. عدم رعایت این اعمال مخصوصاً هنگام کار بر روی سلولهای عصبی باعث آسیب رسیدن به مورفولوژی سلولها و کنده شدن سلولها از روی لامل خواهد شد. پس از نفوذپذیر شدن نمونه‌ها از پراکسید هیدروژن ۱۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد تا فعالیت پراکسیداز داخلی[1] یا سودوپراکسیداز در سلول‌ها مهار گردد. در غیر این صورت نتایج مثبت کاذب حاصل می‌شود. انجام این مرحله در صورتی ضروری است که نشانگر ثانویه کونژوگه به پراکسیداز باشد. سلولها سه بار، هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با PBS شستشو داده شدند. لامل‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بافر بلاک‌کننده در دمای اتاق انکوبه شدند. محلول آنتی‌بادیهای اولیه آنتی‌بادی منوکلونال ضد نستین (Chemicon) با رقت $\frac{۱}{۵۰۰}$ و آنتی‌بادی منوکلونال ضد سیناپتوفیزین (Chemicon). با رقت $\frac{۱}{۲۰۰}$ به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C به سلولها اضافه شد.

1- Endogenous peroxidase

www.SID.ir

Archive of SID

شستشو به تعداد ۴ دفعه و هر دفعه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. انکوباسیون در محلول آنتی‌بادی ثانویه، (Serotec) با رقت $\frac{1}{100}$ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C انجام گرفت. لامل‌ها ۴ دفعه با PBS و هر دفعه به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند. لامل‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با محلول سوبسترای DAB[1] در دمای اتاق انکوبه شدند.شستشو ۲ دفعه با آب مقطر و هر دفعه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.از این مرحله به بعد لاملها به آرامی به یک پتری دیش شیشه‌ای منتقل شده و به ترتیب از اتانولهای ۷۰،۸۰،۹۰ هرکدام به مدت دو دقیقه و اتانول ۱۰۰، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق جهت آبگیری نمونه استفاده شد. سپس دو بار از گزیلن خالص، هر بار به مدت ۵ دقیقه جهت خارج ساختن الکل و شفاف‌سازی نمونه استفاده شد در تمامی ارزیابیهای ایمونوسیتوشیمی از گروه کنترل منفی استفاده شد. کلیه مراحل ایمونوسیتوشیمی انجام شده برای این گروه مشابه گروه آزمایش بود با این تفاوت که در گروه کنترل منفی از نشانگر اولیه استفاده نشد. بعد از ریختن یک قطره کوچک چسب انتالن روی لام، لامل بر روی لام طوری قرار داده شد که لایه سلولی بین لام و لامل واقع شود. بایستی از اعمال فشار بیش از حد به لامل خودداری کرد چون این امر منجر به بهم ریختن آرایش سلولها می‌شود. پس ازخشک شدن چسب، اسلایدهای آماده شده با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه و عکسبرداری قرار گرفتند.

یافته‌ها

القای تمایز سلولهای CCE به سلولهای عصبی

در این پژوهش پس از طی ۸ روز اجسام شبه رویانی به دیشهای کشت ژلاتینه شده منتقل گردیده و تحت ارزیابیهای مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی قرار گرفتند. ۱ الی ۳ روز بعد از انتقال اجسام شبه رویانی به ظرفهای ژلاتینه شده، توده‌های سلولی به کف دیشهای ژلاتینه چسبیده و به سمت اطراف رشد کردند. بعضی از EBها زودتر و بعضی دیرتر به کف دیشها چسبیدند بطوریکه بعضی از آنها در روز دوم بعد از انتقال شروع به چسبیدن و پهن شدن در کف ظرف کردند. سلولهای در حال تکثیر پخش شده و بطور پیشرونده‌ای تمایز پیدا کردند. بتدریج این سلولها در حاشیه اجسام شبه رویانی (EBs)، مورفولوژی سلولهای عصبی را پیدا کردند. سلولهای تمایز یافته معمولاً بر روی لایه‌ای از سلولهای پهن واقع می‌شدند. سلولهای تمایز یافته که دوکی شکل تا چند وجهی بودند دارای جسم سلولی و زوائد سلولی بوده و بتدریج با افزایش تراکم آنها در محیط کشت، شبکه‌های سلولی شبه عصبی در اطراف EBها تشکیل شد (شکل۱). بعضی از سلولهای شبه عصبی همچنان تا مراحل پایانی آزمایش به صورت مجزا یا منفرد مشاهده شدند در مقایسه با گروه کنترل (بدون حضور اسید رتینوئیک) حدود ۴۰ الی ۵۰ درصد از سلولها به سلولهای شبه عصبی تمایز پیدا کردند. به نظر می‌رسید که سلولهای شبه عصبی ایجاد شده از طریق ارتباطات شبه سیناپسی (شکل۱) به هم متصل شده‌اند. نتایج مشابهی در چندین بارآزمایش تکرار شد. درگروه کنترل فقط گاهی تعداد بسیار محدودی سلولهای شبه عصبی منفرد یا تجمعات چند سلولی از سلولهای شبه عصبی مشاهده شد.

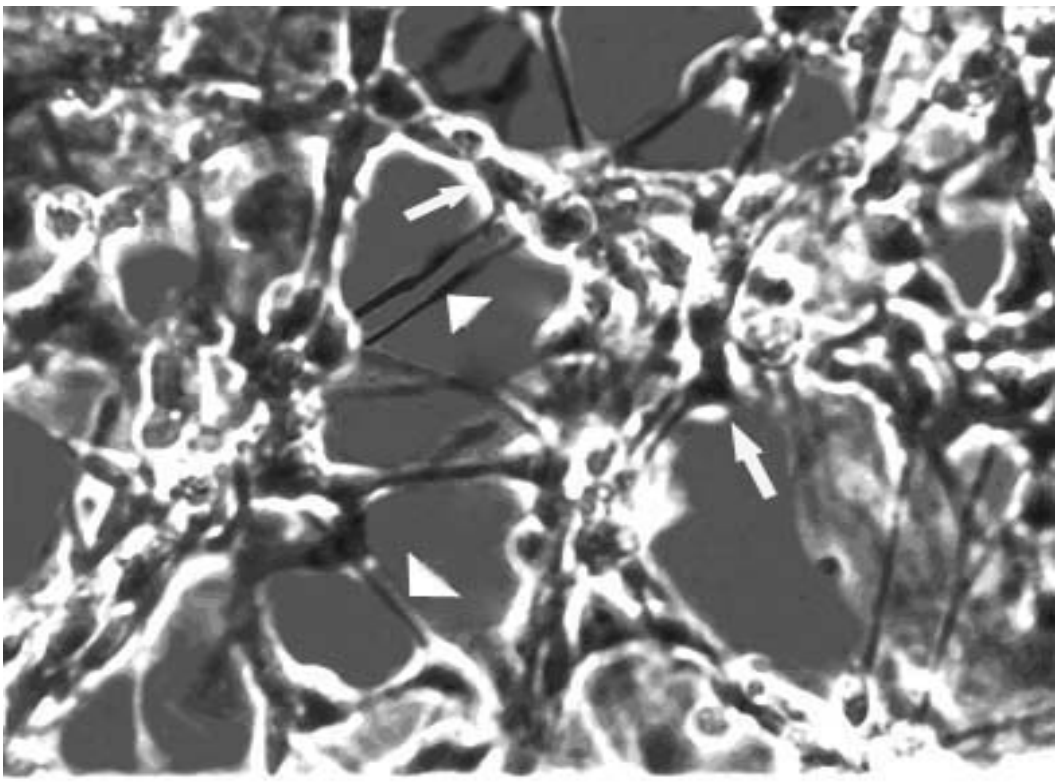
انجام رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله که مخصوص ردیابی اجسام نیسل است در روز پانزدهم آزمایش ماهیت عصبی سلولها را تأیید کرد. در این رنگ‌آمیزی اکثر سلولهای شبه عصبی رنگ گرفته و توده‌هایی مشابه اجسام نیسل به وضوح در داخل سیتوپلاسم این سلولها مشاهده شد (شکل۲). در روزهای چهارم و هشتم بعد از انتقال EBها به سوبسترای

1 . 3,3′-Diaminobenzidine tetrahydrochloride

www.SID.ir

Archive of SID

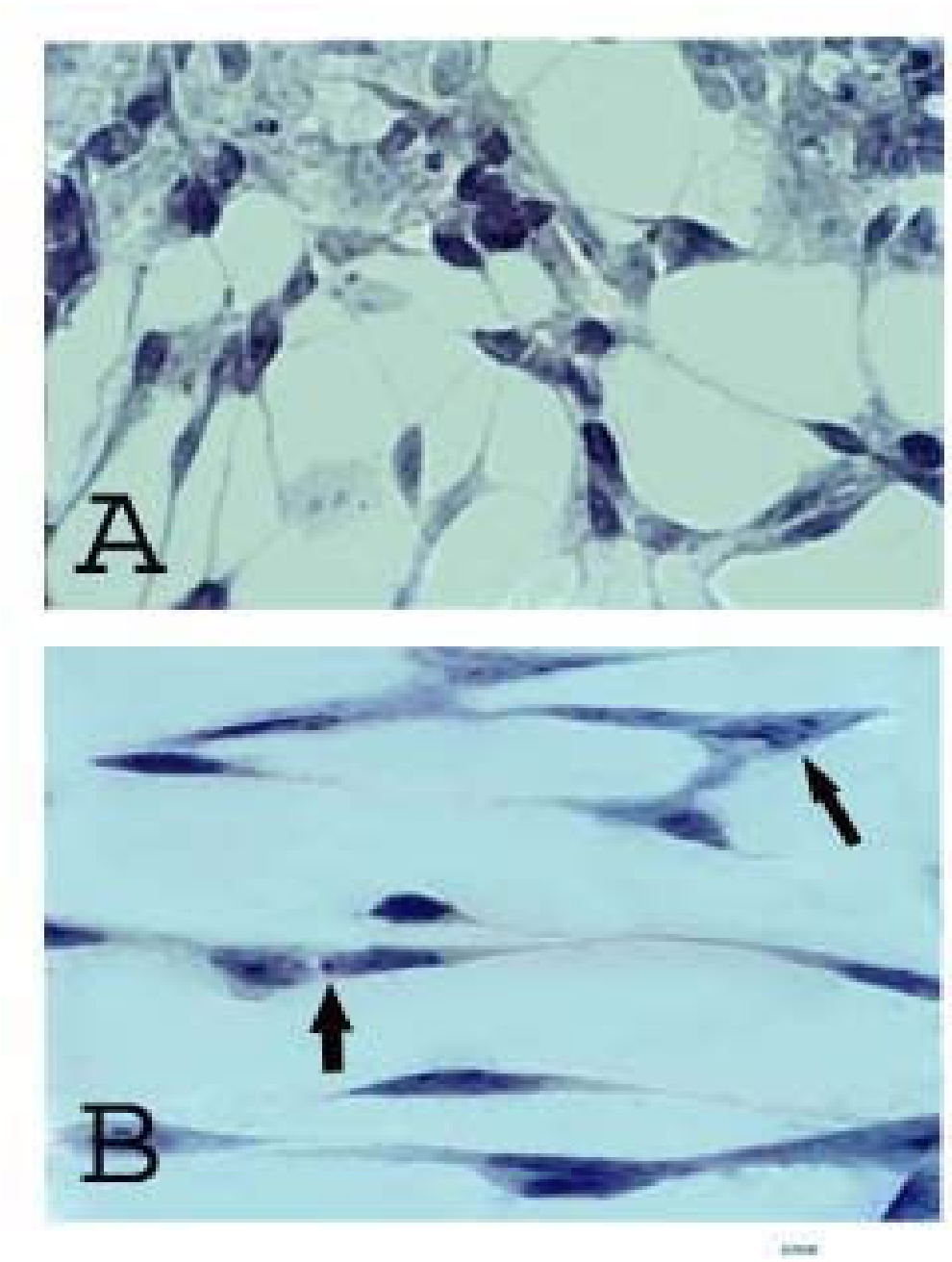
چسبنده به ترتیب از نشانگرهای نستین و سیناپتوفیزین جهت تشخیص وجود سلولهای پیش ساز عصبی و سلولهای عصبی بالغ استفاده شد. درصد بالایی از سلولها در روز دوازدهم از شروع آزمایش، نورواپیتلیالی یا نستین مثبت بودندو نسبت به این آنتی بادی واکنش قوی نشان دادند (شکل۳، A). در روز شانزدهم نتیجه واکنش ایمونوسیتوشیمی بر علیه نشانگر سیناپتوفیزین بعنوان یکی از نشانگرهای سلولهای عصبی بالغ مثبت بود. سلولها هم در حالت مجزا (شکل۳، B) و هم به شکل گروهی و متصل به هم به این آنتی‌بادی واکنش نشان دادند. در این ارزیابیها از آنجاییکه نشانگر ثانویه مورد استفاده کونژوگه به HRP بود بعد از اعمال نشانگرهای اولیه و ثانویه به نمونه‌ها و پس از آن سوبسترای DAB، در نمونه‌های آزمایش رسوب رنگ DAB به نشانه وجود نشانگرهای اولیه و ثانویه مشاهده شد اما در نمونه کنترل منفی که در آن از نشانگر اولیه استفاده نشده بود و نیز بخوبی در اثر استفاده از محلول پراکسید هیدروژن، آنزیمهای داخلی آن غیر فعال شده بود، هیچگونه رسوب رنگی DAB مشاهده نشد (شکل۳، C). نتایج بررسیهای مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی بعمل آمده ما بین سلولهای حاصل از تمایز اجسام شبه رویانی تهیه شده در ظرفهای باکتریولوژیک و سیلیکونیزه مشابه بود و هیچگونه تفاوت محسوسی ما بین آنها مشاهده نشد.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی از سلولهای عصبی تمایز یافته از سلولهای CCE که با استفاده از پروتکل 4&4 و بکارگیری اسیدرتینوئیک حاصل شده‌اند (روز ۱۴ بعد از شروع آزمایش، بزرگنمایی ۲۰۰X). سلولها از طریق ارتباطات شبه سیناپسی به هم متصل شده و یک شبکه از سلولهای عصبی را تشکیل داده‌اند. زوائد سلولی (نوک پیکان) و جسم سلولی سلولهای عصبی به شکل متراکم و توده‌ای (پیکان) کنار هم واقع شده‌اند.

www.SID.ir

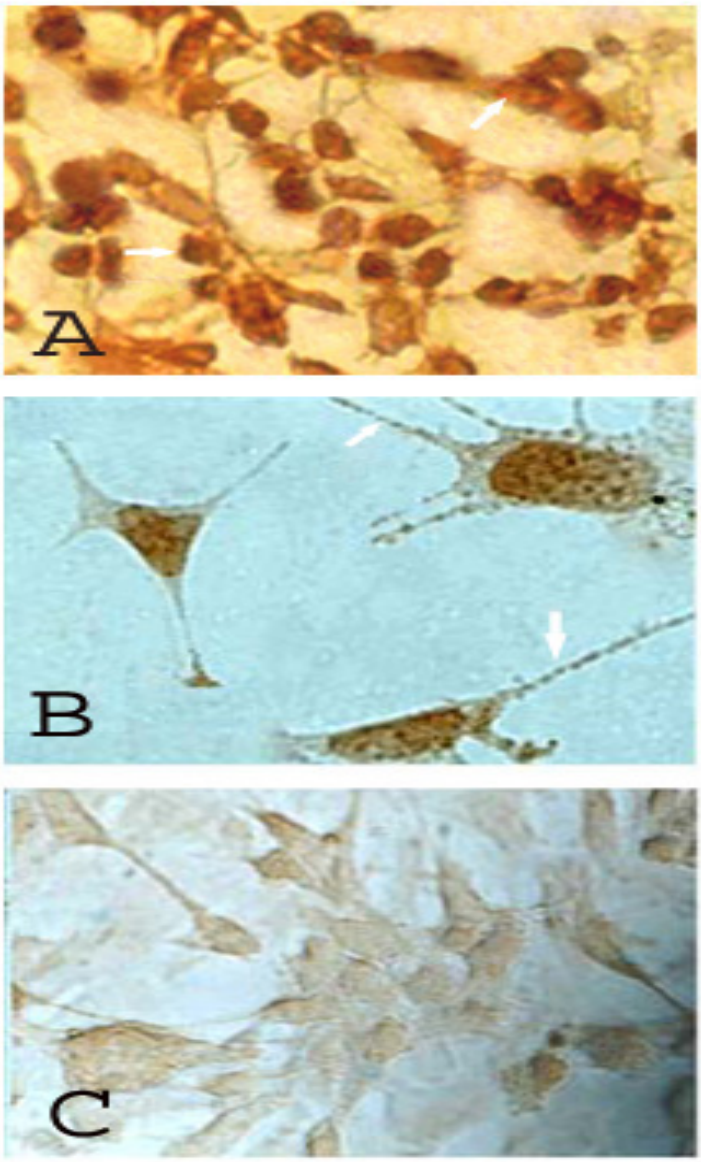
Archive of SID



شکل ۲. رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله (روز پانزدهم)، **A**: شبکه متشکل از سلولهای عصبی تمایز یافته از سلولهای **CCE** که اجسام نیسل آنها با رنگ کرزیل ویوله رنگ شده‌اند. (بزرگنمایی **۲۰۰X**) **B**: در داخل جسم سلولی سلولها اجسام نیسل (نوک بیکان) دیده می‌شوند که در اثر رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله، رنگ گرفته‌اند (بزرگنمایی **۴۰۰X**).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. ایمونوسیتوشیمی سلولهای شبه عصبی تمایز یافته از سلولهایCCE، A: تصویر سلولهای پیش‌ساز عصبی در روز دوازدهم از شروع آزمایش (بزرگنمایی ۲۰۰X)، قهوه‌ای رنگ بودن سلولها که در اثر اتصال آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به پراکسیداز و واکنش سوبسترای DAB ایجاد شده است نشان دهنده مثبت بودن واکنش سلولها نسبت به آنتی‌بادی نستین است. B: تصویر سلولهای شبه عصبی در روز شانزدهم (بزرگنمایی ۴۰۰X) نقاط قهوه‌ای رنگ در سلول (پیکان) و زوائد بین سلولی مربوط به اتصال آنتی‌بادی سیناپتوفیزین و واکنش سوبسترای DAB است. C: تصویر نمونهای کنترل منفی است که به دلیل عدم استفاده از آنتی‌بادیهای اولیه هیچگونه رسوب رنگ DAB مشاهده نمی‌شود (بزرگنمایی ۲۰۰X).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در پژوهش حاضر به منظور ارزیابی توانائی سلولهای بنیادی رویانی در تمایز به سلولهای شبه عصبی، اجسام شبه رویانی حاصل از دودمان سلولی CCE بعنوان یکی از دودمانهای سلولی ES به سلولهای عصبی تمایز داده شد. جهت القای تمایز سلولهای CCE به سلولهای عصبی، اجسام شبه رویانی (EBs) تهیه شده از این سلولها در محیط کشت حاوی اسید رتینوئیک (RA) کشت داده شده سپس به دیشهای مخصوص کشت سلولهای چسبنده منتقل شدند. چند روز پس از انتقال EBها، سلولهای عصبی آشکار شده و بتدریج بر تراکم آنها افزوده شد. علاوه بر ارزیابی مورفولوژیک از نشانگرهای نستین و سیناپتوفیزین جهت تائید فنوتیپ عصبی سلولها استفاده شد. در ارتباط با روند تمایز سلولهای بنیادی رویانی CCE به سلولهای عصبی، ارزیابیهای مورفولوژیک بعمل آمده نشان داد که سلولهای عصبی حاصل از تمایز دارای زوائدی شبیه دندریت، آکسون و اجسام سلولی دو قطبی و چند قطبی می‌باشند. این سلولها با هم تشکیل ارتباطات شبه سیناپسی داده که این می‌تواند نشان‌دهنده عملکردی بودن سلولهای عصبی باشد. در ارزیابی بعمل آمده با استفاده از رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله، که رنگ‌آمیزی اختصاصی سلولهای عصبی می‌باشد حضور اجسام نیسل در سلولهای مذکور تشخیص داده شد که این نیز ماهیت عصبی سلولهای تمایز یافته را تأیید می‌کند. از طرف دیگر ارزیابیهای ایمونوسیتوشیمی بعمل آمده جهت ردیابی آنتی‌ژنهای نستین و سیناپتوفیزین که به ترتیب از ویژگیهای سلولهای عصبی پیش‌ساز (۲۰و۱۹) و نورونهای بالغ و دارای توانایی تشکیل سیناپس می‌باشند (۲۲و۲۱) تأیید دیگری بر هویت عصبی سلولهای تمایز یافته است. نتایج مشابهی در اکثر مطالعات، فرایند تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای مختلف از طریق کشت این سلولها به صورت توده‌های سلولی کوچکی که EB نامیده می‌شوند، شروع می‌شود. EBها زمانی تشکیل می‌شوند که سلولهای بنیادی رویانی در پتری دیشهای باکتریولوژیک بعنوان یک سوبسترای غیر چسبنده و در محیط کشت فاقد LIF کشت داده شوند (۲۳) ازجمله سلولهایی که جهت تمایز آنها از EBها به صورت استاندارد استفاده می‌شود سلولهای عصبی می‌باشد. از میان مقالات اصلی که تاکنون در زمینه تمایز سلولهای بنیادی رویانی به سلولهای عصبی منتشر شده است می‌توان به سه مقاله اصلی اشاره کرد که روشهای مورد استفاده در آنها با کارایی بالایی سلولهای بنیادی رویانی را به سلولهای عصبی تمایز داده است. امروزه این روشها بعنوان روشهای استانداردی بکار گرفته شده و مورد استفاده محققین در انجام تحقیقات بعدی واقع شده‌اند. در هر سه روش از اسید رتینوئیک جهت تمایز عصبی استفاده شده اما جزئیات روشهای مورد استفاده یکسان نبوده است. Bain و همکاران EBها را به مدت ۴ روز در محیط کشت فاقد LIF و مدت ۴ روز هم در حضور اسید رتینوئیک کشت دادند (پروتکل $^{+}۴/^{-}۴$) سپس آنها را تریپسینه کرده و بر روی یک سوبسترای چسبنده منتقل کردند. چند روز بعد سلولهایی با مشخصات سلولهای عصبی ظاهر شده که این سلولها حدود ۴۰ درصد از تراکم سلولی موجود در محیط کشت را تشکیل دادند. سلولهای مذکور بر روی لایه‌ای از سلولهای پهن که متصل به سوبسترا بوده رشد کردند اکثر این سلولهای پهن سلولهای گلیال بوده اما درصد دقیق آنها مشخص نشده است (۸). مطالعه‌ای دیگر که بوسیله Strubing و همکاران صورت گرفته، EBها با استفاده از روش قطره آویزان Hanging drop تهیه شده و مدت ۲ روز در محیط کشت حاوی اسید رتینوئیک کشت داده شدند پس از آن به شکل معلق در محیط کشت فاقد اسید

www.SID.ir

Archive of SID

رتینوئیک مجدداً به مدت دو روز کشت داده شدند (پروتکل $۲^{+}/۲^{-}$) از این به بعد EBها بر روی سوبسترای چسبنده منتقل شده که بعد از ۲ روز سلولهای عصبی ظاهر شدند. در گزارش این محققین اظهار شد که تأثیر اسید رتینوئیک در تمایز سلولهای عصبی بسیار قابل ملاحظه بوده ،بطوریکه تقریباً تمام EBها به سلولهای عصبی متمایز شدند (۹). و سر انجام Fraichard و همکاران EBها را فقط به مدت ۲ روز در محیط کشت حاوی اسید رتینوئیک کشت داده، سپس آنها را بر روی سوبسترای چسبنده و محیط کشت فاقد اسید رتینوئیک منتقل کردند. ۴ الی ۵ روز بعد، سلولهای عصبی ظاهر شدند. روش دیگری هم جهت تمایز سلولهای بنیادی رویانی به سلولهای عصبی ارائه شده است که در آن از اسید رتینوئیک استفاده نشده است مطابق این روش EBها به مدت ۴ روز در محیط کشت استاندارد و فاقد اسید رتینوئیک کشت داده شدند. سپس این EBها بر روی یک سوبسترای چسبنده منتقل شده و محیط کشت آنها با یک محیط کشت عاری از سرم جایگزین شد چند روز بعد بسیاری از سلولها مردند. تعداد از سلولهایی که زنده مانده بودند، مانند سلولهای اپی‌تلیال محکم به هم چسبیده و واکنش آنها نسبت به نشانگر ضد نستین مثبت بود. این سلولهادر حضورbFGF تکثیر شده و به سلولهای گلیال ونورون تمایز پیدا کردند (۱۰). روش مورد استفاده در این پژوهش پروتکل $۴^{+}/۴^{-}$ بود که توسط Bain و همکاران ارائه شده است. Menge Li و همکاران هم جهت تمایز سلولهای دودمان CCE به سلولهای عصبی از این پروتکل استفاده کردند (۱۸). با این تفاوت که آنها جهت تشکیل EBها، قبل از انتقال سلولهای CCE به پتری دیشهای باکتریولوژیک هنگام تریپسینه کردن سلولها، آنها را به شکل توده‌های سلولی به پتری دیشهای باکتریولوژیک منتقل کردند. از طرف دیگر هنگام انتقال EBهابه سوبسترای چسبنده آنها را تریپسینه کرده و سلولها را به شکل تک لایه‌ای به محیط کشت DMEM/F12 عاری از سرم و حاوی مکمل N2 منتقل کرده و جهت کشت طولانی مدت سلولهای عصبی نیز از محیط کشت پایه سلولهای عصبی[1] تکمیل شده با مکمل B27 و سرم اسب ۲ درصد استفاده کردند. در این پژوهش سلولها به صورت کوتاه مدت کشت داده شدند. نتایج این پژوهش از این نظر حائز اهمیت است که تاکنون گزارشی مبنی بر تهیه اجسام شبه رویانی در پتری دیشهای سیلیکونیزه و تمایز آنها به سلولهای عصبی ارائه نشده است. جهت کشت سلولهای عصبی تمایز یافته فقط از محیط کشت DMEM به اضافه ۱۰ درصد سرم FBS استفاده شد. بجای غلظت ۱ میکرومولار اسید رتینوئیک از غلظت نیم میکرومولار استفاده شد (۱۸). همچنین سوبسترای چسبنده در مطالعه محققین مذکور دیشهای پوشیده شده Poly-D-lysine و laminin بود در حالیکه در این پژوهش از دیشهای پوشیده شده با ژلاتین ۰/۱٪ استفاده شد. لذا از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که اجسام شبه رویانی بدست آمده از پتری دیشهای سیلیکونیزه همانند اجسام شبه رویانی بدست آمده از پتری دیشهای باکتریولوژیک قادرند تحت تأثیر اسید رتینوئیک به سلولهای عصبی تمایز پیدا کنند. همچنین سلولهای بنیادی رویانی بعنوان یکی از دودمانهای سلولی جدا شده از بلاستوسیست موش به دلیل داشتن توانائی تمایز به سلولهای عصبی، سلولهای مناسبی جهت ارزیابی کارائی سلولهای بنیادی رویانی در درمان مدلهای آزمایشگاهی بیماریهای مربوط به سیستم عصبی می‌باشد.

[1] .Neurobasal Medium

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1. D'Amour K., and Gage F.H. New tools for human developmental biology. Nature Biotechnology, 2000, 18: 381-382.
2. Magrassi L., Castello S., Ciardelli L., Podesta M., Gasparoni A., Conti L., and et al. Freshly dissociated fetal neural stem/progenitor cells do not turn into blood, Mol. Cell. Neurosci. 2003, 22(2): 179-87.
3. Conti L., Cataudella T. and Cattaneo E. Neural stem cells: a pharmacological tool for brain diseases? Pharmacol. Res. 2003, 47(4): 289-97.
4. Pan X.H., Han Y.B. and Guo K.Y. Pluripotential of human adult stem cells and its application in reparative and reconstructive surgery. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 2002, 16(5): 329-32.
5. Preston S.L., Alison M.R., Forbes S.J., Direkze N.C., Poulsom R. and Wright N.A. The new stem cell biology: something for everyone. Mol Pathol. 2003, 56(2): 86-96.
6. Joseph J. Eduardo T, Parkinson's disease and movement disorders, fourth edition.Linppicott Williams&Wlikins. 2002.pp:116-663.
7. Marcel A.G., rander H. P_{19} embryonal carcinoma cells: a suitable model system for cardiac electrophysiological differentiation at the molecalar and functional level. cardiovascular Research, 2003, 58(2): 410-422.
8. Bain G., Kitchenes D., Yao M., Huettner J.E, Gottlieb D.I. Embyrionic stem cells express neuronal properties in vitro. Dev Biol 1995, 163:342-357.
9. Strubig C., Ahnert-Hilger G., Shan J., Wiedenmann B., Hescheler J., Wobus A.M. differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. Mech Dev 1995, 53:275-287.
10. Fraichard A., Chassande O., Bilbaut G., dehay c., Savatier P., Samarut J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. J Cell Sci 1995, 108:3181-3188.
11. Okabe S., Forsberg-Nilsson K., Spiro A.C., Segal M., Mckey R.D. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. Mech Dev 1996, 59:89-102.
12. Finlay M.F., Kulkarni N., Huettner J.E. Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic and stem cells. J Neurosci 1996, 16:1056-1065.
13. Brustle O., SpiroA.C., Arram K., Choudhary K., Okabe S., Mckey R.D. In vitro generated neural precursors participate in mammalian brain development. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94:14809-14814.
14. Li M., Pevny L., Lovel-Bage R., Smith A.. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. Curr Biol 1998, 8:971-974.
15. Lee S.H., Lumelsky N., Studer L., Auerbach J.M., Mckay R.D. Efficient generation of midbrain and hindbrain neuron from mouse embryonic stem cells. Nat Biotechnol, 2000, 18:675-679.
16. Shin-Ichi Nishikawa1, Satomi Nishikawa1. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VEcadherin+cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic .lineages Development 1998, 125: 1747-1757.

www.SID.ir

Archive of SID

17. Xian HQ, McNichols E, St Clair A, Gottlieb DI. A subset of ES-cell-derived neural cells marked by gene targeting. Stem Cells 2003;21(1):41-9.
18. Menge L, Larysa P., Robin L., Austin Smith. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. Current Biology 1998, 8:971–974.
19. Iscove N., Schreier H. Immunological Methods. Academic press: New York, 1979, vol 1:p.379
20. Wiles M., Keller G. Multiple hematopoietic lineage develop from embryonic stem cells in culture. Development (cambridge, UK) 1991, 111: 259-67.
21. Suwabe, N., S. Takahashi, T. Nakano, and M. Yamamoto.GATA-1 Regulates growth and differentiation of definitive erythroid lineage cells during in vitro ES cell differentiation. Blood 1998, 92 (11): 4108-4118.
22. Cheung WM, Fu WY, Hui WS, Ip NY. Production of human CNS neurons from embryonal carcinoma cells using a cell aggregation method. Biotechniques 1999, 26(5):946-8, 950-2, 954.
23. Gottlieb, D.I., and, J.E. Huettner. An in vitro pathway from embryonic stem cells to neurons and glia. Cells Tissues Organs 1999, 165: 165-172.

www.SID.ir