

بررسی توانائی تمایز سلولهای بنیادین عصبی مغز موش بالغ در مقایسه با جنین موش به

سلولهای اندوتلیال

دکتر فردین فتحی^۱، عباس جعفری کرمانی^۲، مرتضی ابوذرری^۳، مسعود علاسوند^۴، دکتر صلاح‌الدین احمدی^۵، دکتر محمد جعفر رضائی^۶، دکتر آرش پولادی^۷

۱- استادیار علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، KDRC، آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی مولکولی (مؤلف مسؤول) farfath@yahoo.com

۲- کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

۳- کارشناس ارشد علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

۴- کارشناس ارشد گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی مولکولی

۵- استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان

۶- PhD جنین شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی کردستان

۷- پزشک عمومی، کارشناس آموزشی مرکز مطالعات و توسعه آموزش پزشکی

چکیده

زمینه و هدف: سلولهای بنیادی عصبی در نواحی مختلفی از سیستم عصبی مرکزی در حال تکامل و بالغ وجود دارند. این سلولها تمایز نیافته بوده و علاوه بر تجدید خود، قادرند سلولهای عصبی و گلیال را تولید کنند. علاوه بر تولید انواع مختلفی از سلولهای عصبی، سلولهای بنیادی عصبی قادر به تولید سلولهای سایر بافتها نیز می‌باشند. در این مطالعه سلولهای بنیادی عصبی از مغز جنین و موش بالغ جداسازی شده و توانائی آنها به سلولهای اندوتلیال مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی: سلولهای بنیادی عصبی از دیواره طرفی بطن طرفی مغز موش بالغ و نیز قشر مغز جنینهای موش جداسازی گردید و در محیط کشت DMEM-F12 عاری از سرم و حاوی فاکتورهای رشد bFGF و EGF و مکمل B27 کشت داده شدند. جهت القای تمایز، سلولها در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و دیشهای کشت آغشته به فیبرونکتین کشت داده شدند. از ارزیابیهای ایمونوسیتوشیمی، RT-PCR و Tube Formation Assay جهت ارزیابی سلولهای تمایز یافته استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج مشاهدات انجام شده در این پژوهش نشان داد که کشت سلولهای بنیادی عصبی جنینی در دیشهای آغشته به فیبرونکتین و محیط کشت تمایزی محتوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی منجر به القای تمایز سلولهای بنیادی عصبی جنینی به سلولهای اندوتلیال می‌شود. موقعی که سلولهای تمایز یافته به ماتریکس خارج سلولی یا ماتری ژل منتقل شدند ساختارهای شبه مویرگی که از مشخصه‌های سلولهای اندوتلیال است را تشکیل دادند. نتایج ارزیابیهای ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR نشان داد که سلولهای تمایز یافته قادر به جذب لیپوپروتئین با چگالی پائین و بیان ژنهای CD31، VE-cadherin و Flk-1 بوده و نیز به BS-1 Lectin متصل می‌شوند. بر خلاف سلولهای بنیادی عصبی جداسازی شده از مغز جنین موش، سلولهای جداسازی شده از مغز موش بالغ به سلولهای اندوتلیال تمایز پیدا نکردند.

نتیجه‌گیری: سلولهای بنیادی عصبی جداسازی شده از مغز جنین موش و مغز موش بالغ در تمایز به سلولهای اندوتلیال رفتار مشابهی را از خود نشان نمی‌دهند.

کلید واژه‌ها: سلولهای بنیادین عصبی، سلولهای اندوتلیال، ساختارهای شبه مویرگی، تمایز سلولی

وصول مقاله: ۸۶/۸/۱۲ اصلاح نهایی: ۸۶/۱۰/۳۰ پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۱

مقدمه

سلولهای بنیادی عصبی (NSCs) سلولهای پیش سازی هستند که توانایی تمایز به انواع مختلف سلولهای موجود در CNS (شامل نورونها، آستروسیتها و الیگودندروسیتها) را دارا می باشند (۱) و تاکنون از بافت مغز اکثر گونه ها و بویژه موش، رت و انسان جداسازی شده اند (۲). سلولهای بنیادی عصبی دارای پتانسیل زیادی جهت درمان آسیبهای CNS می باشند، چرا که این سلولها بدلیل داشتن ماهیت عصبی قادرند به انواع سلولهای عصبی و گلیال تمایز یافته و لذا در هنگام پیوند، قدرت سازگاری بیشتری را با بافت میزبان دارا می باشند. استفاده از سلولهای بنیادی عصبی، می تواند منجر به تشکیل نورونهایی در محل ضایعه گردد که توانایی ارسال اطلاعات سیناپسی را دارا می باشند. از طرفی ممکن است سلولهای استفاده شده در محل ضایعه، سلولهای گلیالی را در محل پیوند تشکیل دهند که علاوه بر حمایت نروتروفیک، در فرایند میلینه شدن اکسونهای جدید یا اکسونهای دمیلینه شده میزبان نیز شرکت کنند (۳, ۴). سلولهای بنیادی عصبی علاوه بر تولید سلولهای عصبی، قادر به تولید سلولهای سایر بافتها نیز می باشند (۵, ۶). گزارش شده است که NSCs در شرایط آزمایشگاهی قادر به تولید سلولهای عضله صاف بوده که این سلولها دارای عمل انقباضی مشابهی با سلولهای عضلانی بدن هستند (۷). این مشاهدات ممکن است بیان کننده نقش سلولهای بنیادی عصبی در تولید بخشی از سلولهای عضله صاف باشند. از آنجا که سلولهای بنیادی عصبی در طی تکامل طبیعی دستگاه عصبی مرکزی، در مناطق

بطنی و تحت بطنی واقع می شوند، ممکن است در تشکیل عروق خونی مغز نیز نقش داشته باشند. عروق خونی شامل سلولهای آندوتلیال، که دارای منشاء مزودرمی بوده و سلولهای دیواره ای عروق می باشند. عروق خونی تغذیه کننده مغز از لایه زایای نوروکتودرم مشتق می شوند، ناحیه ای که در آن هیچ سلول آنژیوژنیک تولید نمی گردد. مطالعات اخیر نشان می دهند که سلولهای بنیادی عصبی به دست آمده از رویان انسان چندین مارکر سلولهای آندوتلیال و نیز سلولهای بنیادی هماتوپویتیک را بیان می کنند (۸, ۹). همچنین یک گزارش جدید این نظریه را تقویت می کند که سلولهای بنیادی عصبی جداسازی شده از جنین موش توانایی تمایز به سلولهای آندوتلیال عروقی را دارا می باشند (۹). آنژیوژنیز در ایسکمی اندامهای حیاتی دارای نقش بسیار مهمی می باشد و استراتژی توسعه عروق خونی جانبی (collateral)، که ایجاد کانال فرعی طبیعی به دور شریان مسدود شده است، به آنژیوژنیز درمانی موسوم می باشد (۱۰). سلولهای بنیادی به دلیل توانائی تمایزیشان به سلولهای مختلف، به منظور کمک به فرایند آنژیوژنیز هم مورد توجه قرار گرفته اند. اخیراً Oishi و همکاران نشان دادند که سلولهای بنیادی عصبی جداسازی شده از کورتکس مغز جنین موش قادرند به سلولهای آندوتلیال تمایز پیدا کنند (۷). در این مطالعه پتانسیل سلولهای بنیادی عصبی جداسازی شده از مغز موش بالغ (برای اولین بار) و مغز جنین موش در تمایز به سلولهای آندوتلیال مورد بررسی قرار گرفته و از ارزیابیهای PCR و ایمونوسیتوشیمی جهت تایید ماهیت آندوتلیالی

در محیط کشت تشکیل شده که از طریق پاساژهای متوالی تکثیر شدند. در پاساژهای ۳ الی ۵ به منظور القای تمایز سلولهای بنیادی عصبی به سلولهای آندوتلیال، ۵ الی ۱۰ نورو سفیر به دیشهای کشت ۴ چاهکی که با فیبرونکتین (Sigma) پوشش داده شده بودند (Fibronectin coated)، منتقل شده و در محیط کشت تمایزی کشت داده شدند (Differentiation medium). محیط تمایزی همان محیط کشت تکثیری سلولها (DMEM/F12) بود که فاقد فاکتورهای رشد و دارای ده درصد سرم جنین گاوی (FBS) بود.

ارزیابی‌های مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی

در طول آزمایش از میکروسکوپ معکوس فلورسنت (Nikon-TE 300) جهت ارزیابی سلولها استفاده شد. به منظور انجام ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی، سلولهای تمایز یافته در روز هشتم به مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از متانول با دمای ۲۰- (Merck) یا پارافمالدئید ۴ درصد در دمای اتاق فیکس شدند. از بافر بلاک کننده حاوی Triton X-100 و سرم گونه‌ای که آنتی‌بادی ثانویه از آن تهیه شده بود، جهت نفوذ پذیری سلولها و مهار آنتی‌ژنهای غیر اختصاصی که احتمال اتصال آنتی‌بادی ثانویه به آنها وجود داشت، استفاده شد. جهت تایید ماهیت فنوتیپی سلولهای تمایز یافته آنتی‌بادی اولیه بر علیه CD31 (Santacruz, Goat anti mouse)، و آنتی‌بادی اولیه بر علیه (Santacruz, Rat anti mouse) VE-cadherin هر دو با غلظت $\frac{1}{100}$ به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه به سلولها اعمال شدند.

سلولهای تمایز یافته استفاده شد. هدف از این مطالعه، مقایسه توانایی تمایز سلولهای بنیادین عصبی مغز موش بالغ و جنین موش به سلولهای آندوتلیال است.

روش بررسی

جداسازی و القای تمایز سلولهای بنیادی عصبی به سلولهای آندوتلیال

ابتدا دیواره طرفی شاخ قدامی بطنهای جانبی مغز موش بالغ یا کورتکس جنین موش در روز ۱۲/۵ (E12.5) به بافر HBSS حاوی 0.7 mg/ml هیالورونیک اسید، 0.2mg/ml کینورنیک اسید 1.33mg/ml تریپسین و گلوکز ۲ میلی مولار منتقل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس سلولها به مدت ۵ دقیقه با دور 200g سانتریفیوژ گردید و به HBSS حاوی سوکروز 0.9 مولار انتقال یافتند. پس از تهیه سوسپانسیون از سلولها، بمدت ۱۰ دقیقه با دور 750 g سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد سلولها در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت حل شده و سپس به آرامی روی سطح ۱۰ میلی‌لیتر EBSS حاوی BSA منتقل شدند. سلولها با دور 200g بمدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شده و یکبار با استفاده از محیط کشت DMEM/F12 شستشو داده شدند. سلولهای بنیادی عصبی جداسازی شده از مغز جنین و مغز موش بالغ بطور جداگانه در محیط کشت DMEM-F12 حاوی 20ng/ml EGF، bFGF 20ng/ml، مکمل B27، ۲ میلی مولار گلوتامین، 100U/ml پنی‌سیلین و 100µg/ml استرپتومایسین کشت داده شدند. پس از یک هفته در اثر تکثیر سلولهای بنیادی، نروسفرهای اولیه

ابتدا با استفاده از محلول (Plus) RNX [سینازن] RNA ی کل را از حدود 5×10^5 سلول استخراج نموده و پس از اطمینان یافتن از کیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفومتري، جهت تهیه cDNA از پرایمر RT oligo (MWG-Biotech AG) و کیت (Bioneer) استفاده شد. واکنش RT در حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. پس از تهیه cDNA، واکنش PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر انجام گرفت. واکنش PCR در حجم نهائی ۲۰ میکرولیتر انجام شد و جهت تهیه حجم مذکور علاوه بر DNA الگو (محصول واکنش RT) از کیت PCR (Bioneer)، آب مقطر استریل و پرایمرهای بالا دست^۱ و پایین دست^۲، با مشخصات مورد اشاره در جدول یک استفاده شد. پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واکنش، واکنش PCR با شرایط Denaturation ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، Annealing ۴۵ ثانیه در دمای ۶۴-۶۳ درجه سانتی گراد (بر اساس نوع پرایمر) و Extention ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. تعداد ۳۵ سیکل و یک سیکل extention نهایی به مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. جهت انجام هر دو واکنش RT و PCR از دستگاه ماستر سایکلر (Eppendorf) استفاده شد. ژن GAPDH بعنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از اتمام واکنش ۸ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز یک درصد بررسی

آنتی بادی ثانویه متصل به Texaz Red (Santacruz, Donkey anti goat) و آنتی بادی ثانویه متصل به (Santacruz, Goat anti Rat) FITC با غلظت $\frac{1}{100}$ به ترتیب جهت اتصال به آنتی بادی بر علیه CD31 و VE-cadherin، به مدت یک ساعت در دمای اتاق، اعمال گردید. یکی از روشهای مورد استفاده جهت تشخیص سلولهای با ویژگی اندوتلیالی، ارزیابی توانائی سلولها در جذب لیوپروتئین اشباع شده کم چگال (Dil-Ac-LDL: Acetylated low-density lipoprotein) است. ماده مذکور با ماده فلورسنت Dil کونژوگه شده است و اختصاصاً بوسیله رده های سلولی با ماهیت اندوتلیالی جذب می شود. در این مطالعه به منظور بررسی توانائی سلولها در جذب لیوپروتئین کم چگال، از Dil-Ac-LDL (Biomedical Thechnologi Inc.) با غلظت ۱۰ میکروگرم در هر میلی لیتر استفاده شد. همچنین به منظور تأیید فنوتیپ اندوتلیالی سلولهای تمایز یافته، از یکی دیگر از مارکهای اختصاصی سلولهای اندوتلیال، BS-1 lectin (Vector laboratori) با غلظت $5 \mu\text{g/ml}$ که کونژوگه به FITC بود استفاده شد. پس از شستشوی سلولها با بافر فسفات، از Vector hard set (Vector Laboratories) که همراه آن رنگ DAPI هم موجود بود، جهت ماونت کردن سلولها استفاده شد و نهایتاً سلولها به کمک میکروسکوپ فلورسانت مطالعه و عکسبرداری شدند.

ارزیابی RT-PCR

از RT-PCR جهت تأیید بیان ژنهای مورد مطالعه (جدول ۱) استفاده شد. برای این منظور،

1. Forward
2. Reverse

شد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه با کمک نرم افزار Gene runner طراحی شدند.

جدول ۱: اسامی ژنها و توالی مربوط به پرایمرهای بالا دست (F) و پائین دستی (R) که در این 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 TTATAGATGTTCCCTGCTTGG	64

در دیشه‌های کشت آغشته شده با فیبرونکتین و در محیط کشت DMEM-F12 حاوی ۱۰ درصد FBS کشت داده شوند، بتدریج به سلولهای پیش ساز اندوتلیال تمایز یافته و مورفولوژی سنگفرشی که مختص سلولهای اندوتلیال است را کسب می‌کنند (شکل ۱). همچنین سلولهای تمایز یافته توانائی تشکیل ساختارهای شبه مویرگی (Tube Formation) را کسب کرده، بطوریکه سلولها در تشکیل ساختارهای مذکور شرکت کردند. سلولهای مذکور قادر به جذب لیپوپروتئین با چگالی کم و نیز اتصال به BS-1 Lectin (شکل ۲) و همچنین بیان ژنهای CD31 و VE-cadherin بودند (شکل ۳).

به منظور تائید فوتیپ اندوتلیالی و ارزیابی ایمونوسیتوشیمی سلولهای تمایز یافته در روز هشتم مطالعه از ماده Dil-Ac-LDL نیز استفاده

ارزیابی توانائی تشکیل ساختارهای شبه مویرگی (Tube Formation) در سلولهای تمایز یافته

به منظور ارزیابی توانائی عملکردی سلولها به صورت In vitro، نوروسفیرهایی که در محیط تمایزی کشت داده شده بودند در روز سوم آزمایش تریپسینیزه شده و حدود 1×10^5 از سلولهای حاصله به هر چاهک از دیش چهار چاهکی که حاوی ماتری ژل (Sigma) بودند، منتقل شدند. سلولها در محیط تمایزی کشت داده شدند و بعد از گذشت ۲۴ الی ۴۸ ساعت بوسیله میکروسکوپ معکوس مطالعه و عکسبرداری شدند.

یافته‌ها

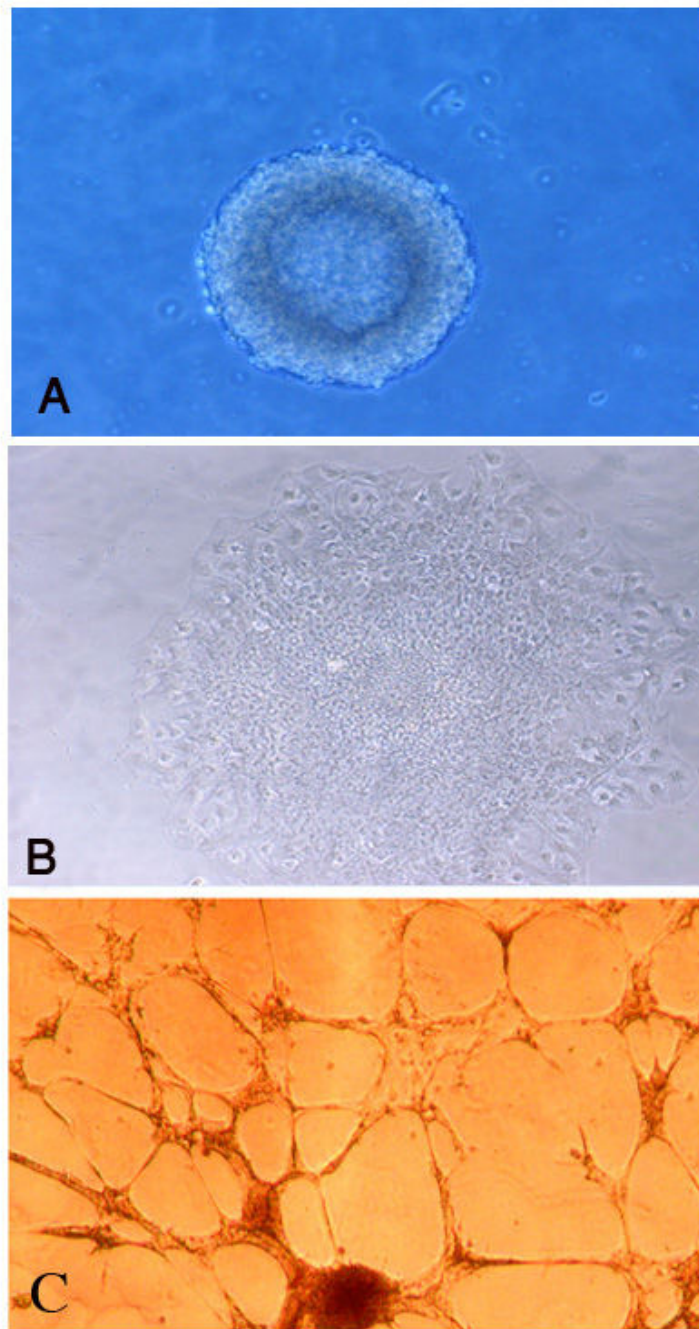
نتایج ارزیابیهای مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد در صورتی که سلولهای بنیادین عصبی مغز جنین موش

آنجا تیکه نتایج ارزیابی PCR در مورد سلولهای تمایز یافته حاصل از سلولهای بنیادی مغز موش بالغ منفی بود از ارزیابی ایمونوسیتوشیمی جهت تایید ماهیت اندوتلیالی سلولها استفاده نشد اگرچه در بررسیهای مورفولوژیک سلولهای سنگفرشی زیادی در طول آزمایش مشاهده شدند.

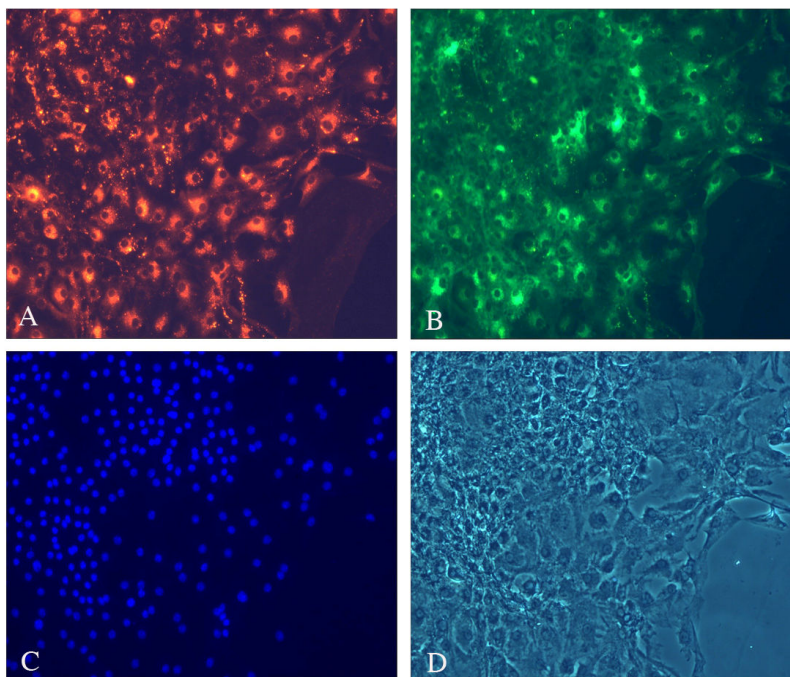
نتایج ارزیابی PCR

علاوه بر ارزیابیهای مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی، بیان ژنهای اختصاصی سلولهای اندوتلیال در سلولهای مورد مطالعه، به روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان ژنهای Flk-1، VE_cadherin و CD31 در سلولهای تمایز یافته از سلولهای بنیادی عصبی جنینی مشاهده شد در حالیکه نتیجه ارزیابی برای سلولهای تمایز یافته از سلولهای بنیادی عصبی بالغ منفی بود. اندازه باندهای مربوط به ژنهای مورد مطالعه مطابق با الگوی پرایمر طراحی شده بود (شکل ۴).

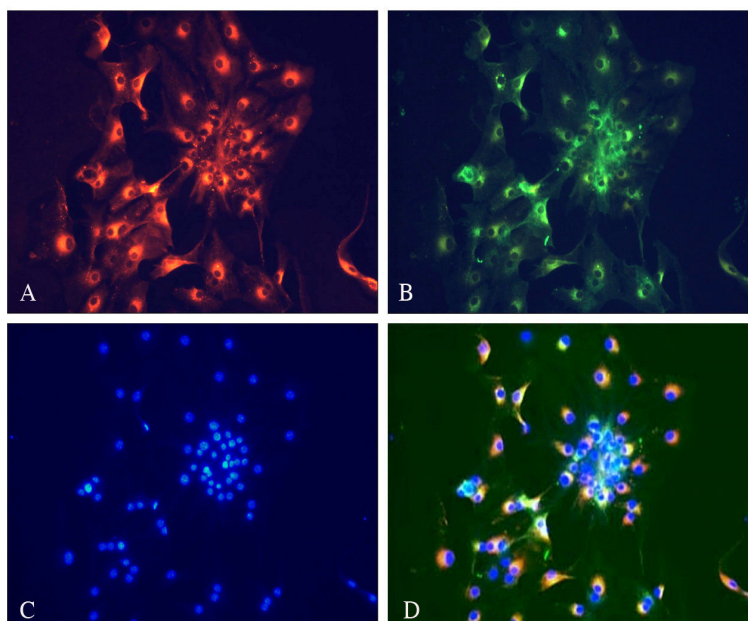
شد. تقریباً تمام سلولهایی که جهت ارزیابی استفاده شدند دارای توانائی جذب Dil-Ac-LDL و نیز قابلیت اتصال به BS-1 Lectin بودند (شکل ۲). سلولهایی که آنتی بادی CD31 به آنها متصل شده بود بدلیل اینکه آنتی بادی ثانویه بر علیه آنها کونژوگه به یک ماده فلورسنت با رنگ قرمز بود (Texaz Red) با فیلتر Texaz-red به رنگ قرمز و سلولهایی که BS-1 lectin به آنها متصل شده بود چون کونژوگه به رنگ فلورسنت سبز بود با فیلتر FITC به رنگ سبز قابل مشاهده بودند. همچنین سلولهایی که آنتی بادی بر علیه VE-cadherin به آنها متصل شده بود نیز بدلیل اینکه آنتی بادی ثانویه بر علیه آنتی بادی اولیه کونژوگه به رنگ فلورسنت سبز بود با فیلتر FITC به رنگ سبز قابل مشاهده بودند (شکل ۳). در گروه کنترل منفی که از آنتی بادی اولیه جهت ارزیابی آنها استفاده نشده بود، اما مشابه بقیه سلولهای گروه آزمایش، سایر مراحل بر روی آنها انجام شد و هیچگونه سیگنال فلورسنت قرمز یا سبزی در آنها مشاهده نگردید. از



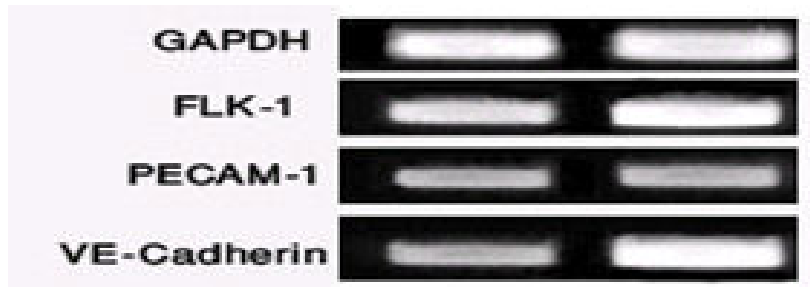
شکل ۱: A) نمائی از یک نوروسفر اولیه که حدود ۸ روز بعد از جداسازی سلولهای بنیادی عصبی از مغز تشکیل شده است. B) سلولهای بنیادی عصبی در محیط کشت تمایزی و دیشهای آغشته به فیبروتکتین کشت داده شدند، بتدریج این سلولها به سلولهای اندوتلیال تمایز یافته و مورفولوژی سنگفرشی کسب نمودند. C) ۴۸ ساعت پس از انتقال سلولهای تمایز یافته (روز سوم) بر روی ماتری ژل، توانستند ساختارهای شبه مویرگی (Tube Formation) را تشکیل دهند. بزرگنمایی تصویر 100 A و بقیه تصاویر ۲۰۰ است.



شکل ۲: (A) درصد بالایی از سلولهای تمایز یافته را نشان می دهد که لیپوپروتئین کم چگال کوئز و گه به Dil که یک رنگ فلورسنت قرمز است را جذب کرده اند (B) همان سلولها را نشان می دهد که به BS-1 lectin متصل شده اند. (C) هسته سلولها در نتیجه رنگ آمیزی با رنگ DAPI به رنگ آبی دیده می شوند. (D) تصویر فاز کنتراست سلولهای تصویر قبلی را نشان می دهد.



شکل ۳: تصاویر ایمنوسیتوشیمی مربوط به سلولهای اندوتلیال حاصل از تمایز سلولهای بنیادین عصبی: (A) واکنش مثبت سلولهای تمایز یافته به آنتی بادی بر علیه CD31 را نشان می دهد. (B) واکنش مثبت سلولهای تمایز یافته به آنتی بادی بر علیه VE-cadherin را نشان می دهد. هسته سلولها در تصاویر A و B با DAPI رنگ شده اند (بزرگنمایی $\times 200$)



شکل ۴: بررسی بیان ژنهای FLK-1، CD31(PECAM-1) و VE-cadherin با استفاده از تکنیک RT-PCR. همانطور که مشاهده می‌شود، کشت دادن سلولهای بنیادین عصبی جدا سازی شده از مغز جنین موش در دیشهای پوشانده شده با فیبرونکتین و محیط کشت DMEM-F12 حاوی ۱۰ درصد FBS باعث می‌شود که این سلولها بتدریج به سلولهای اندوتلیال تمایز یابند. به طوریکه در روز ۸ آزمایش سلولها ژنهای FLK-1، CD31، VE-cadherin که از مارکرهای اختصاصی سلولهای اندوتلیال هستند را بیان می‌کنند. از ژن GAPDH بعنوان کنترل داخلی استفاده شد.

بحث

بنیادی عصبی پتانسیل تمایزشان وسیع تر از آن است که در گذشته تصور می‌شد، بطوریکه این سلولها قادرند به سلولهای غیر عصبی هم تمایز یابند، به عبارت دیگر به سلولهایی تمایز پیدا کنند که از یک لایه زایای غیر نوروکتودرمی مشتق می‌شوند (۹).

Parati و همکاران گزارش کردند که سلولهای بنیادی عصبی جدا شده از جنین انسان بعضی از مارکرهای اختصاصی سلولهای اندوتلیال را بیان می‌کنند (۸). این یافته این فرضیه را پایه‌ریزی کرد که احتمالاً سلولهای بنیادی عصبی قادرند به سلولهای اندوتلیال تمایز یابند. در همین راستا Oishi و همکاران طی انجام مطالعه‌ای که جهت اثبات این فرضیه طرح ریزی کردند و اقدام به تمایز سلولهای بنیادی عصبی جداسازی شده از مغز جنین موش به سلولهای اندوتلیال نمودند و این محققین گزارش کردند که سلولهای اندوتلیال تمایز یافته مارکرهای مخصوص سلولهای اندوتلیال را بیان

نتایج این مطالعه نشان داد سلولهای بنیادی عصبی جداسازی شده از مغز جنین موش قادرند تحت شرایط خاص آزمایشگاهی به سلولهای اندوتلیال تمایز یابند در حالیکه تحت شرایط مشابه سلولهای جداسازی شده از مغز جنین موش بالغ فاقد این توانایی می‌باشند. ماهیت بنیادی سلولهای مورد استفاده در این مطالعه در ابتدای مطالعه با انجام ارزیابی PCR تایید شد (اطلاعات نشان داده نشده است).

سلولهای بنیادی عصبی بعد از جداسازی قادرند به شکل یک توده بنام نروسفر رشد کنند. سلولهای تمایز نیافته‌ای که نروسفرها را تشکیل می‌دهند در معرض فاکتورهای رشد bFGF و EGF تکثیر شده و قادر به بیان آنتی‌ژن نستین می‌باشند، این سلولها به نوروئها و آستروسیتها تمایز می‌یابند و لذا سلولهای بنیادی عصبی نام گرفته‌اند (۹). اخیراً شواهدی ارائه شده است مبنی بر اینکه سلولهای

دارند در حالیکه سلولهای بنیادی عصبی به bFGF نیاز دارند (۹, ۱۲). همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که فرضیه مذکور در مورد سلولهای بنیادی عصبی بالغ صادق نیست. Vogel و همکاران (۱۲) گزارش کردند که سلولهای بنیادی عصبی جدا شده از نوروسفرهای تکثیر یافته در محیط آزمایشگاه، تجمع کاملاً خالصی از سلولهای بنیادی را به نمایش نمی‌گذارند، لذا یک احتمال ممکن در مورد توانائی تمایزی سلولهای بنیادی عصبی به سلولهای اندوتلیال این است که برخی از سلولهای بنیادی عصبی در نوروسفرها، مجدداً دچار برنامه‌ریزی ژنتیکی شده و خواص تکاملی پروژنیوتورهای عروقی را کسب کرده باشند. با افزایش تعداد پاساژها، سلولهای بنیادی عصبی ویژگیهای جدیدی پیدا می‌کنند که از جمله آنها می‌توان به افزایش چسبندگی، تسریع میزان رشد، تکامل وابسته به فاکتورهای رشد و تغییراتی در الگوی بیان ژنی آنها اشاره کرد (۹, ۱۳). در این مطالعه، ما نیز همانند Oishi و همکاران از پاساژهای ۵-۲ سلولهای بنیادی عصبی استفاده کردیم تا این احتمالات را تا حد امکان حذف کنیم (۹).

مشخصه‌های تکاملی دودمان سلولهای اندوتلیال هنوز به طور کامل به اثبات نرسیده است. تعیین منشأ عروق خونی که سیستم عصبی را تغذیه می‌کنند از اهمیت خاصی برخوردار است. بایستی به این سؤال پاسخ داده شود که آیا عروق خونی مغز از سلولهای لایه زایای اکتودرمی منشأ می‌گیرند که هیچ سلول آنژیوژنیک ندارد یا خیر؟ اخیراً به این باور رسیده‌اند که سلولهای اندوتلیال و سلولهای دیواره‌ای عروق پیش‌سازهای متفاوتی

می‌کنند (۹). با این وصف در مطالعه حاضر بیان مخصوص سلولهای اندوتلیال در سلولهای حاصل از تمایز سلولهای بنیادی عصبی جداسازی شده از مغز موش بالغ مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که سلولهای بنیادی عصبی جنینی و بالغ پتانسیل و رفتار تمایزی متفاوتی را از خود نشان می‌دهند. اما اینکه توانائی سلولهای بنیادی عصبی جنینی (مشتق از اکتودرم) به سلولهای اندوتلیال (از مشتقات مزودرم) به چه صورت قابل توجه است، هم می‌توان فرض کرد که توانائی تمایز به سلولهای اندوتلیال از خواص ویژه سلولهای بنیادی عصبی جنینی است و هم اینکه ممکن است سلولهای بنیادی نادری با منشأ غیر عصبی در دستگاه عصبی مرکزی وجود داشته باشند که دارای قدرت انعطاف‌پذیری (Plasticity) بیشتری می‌باشند. در راستای اثبات فرضیه دوم، اخیراً محققین توانسته‌اند علاوه بر مغز استخوان و عضله اسکلتی از مغز موش هم سلولهای مزانشیمی پر استعدادی را جدا سازی کنند (۱۱, ۱۰)، بطوریکه این سلولها قادرند در محیط آزمایشگاه تکثیر شده و به سلولهای مشتق از هر سه لایه جنین یعنی لایه‌های مزودرم، اکتودرم و آندودرم تمایز یابند. لذا ممکن است یک آلترناتیو محتمل از این سلولهای مزانشیمی، در نوروسفرهای (متشکل از سلولهای بنیادی عصبی جنینی) تکثیر شده در حضور bFGF وجود داشته و به سلولهای اندوتلیال تمایز یابد. از طرف دیگر آنچه این فرضیه را غیر محتمل می‌سازد این واقعیت است که سلولهای بنیادی مزانشیمی، در مقایسه با سلولهای بنیادی عصبی، برای رشد در محیط آزمایشگاه به مواد متفاوت دیگری همانند LIF و PDGF نیاز

احتمال وجود دارد که در مغز سلولهای پیش ساز اندوتلیوم از سلولهای بنیادی عصبی مغز جنین موش منشاء گرفته باشند (۹).

نتیجه گیری

از یافته‌های این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که سلولهای بنیادی عصبی جداسازی شده از مغز موشهای جنینی قادرند تحت شرایط خاص آزمایشگاهی به سلولهای پیش ساز عروق یا سلولهای اندوتلیال تمایز پیدا کنند در حالیکه تحت شرایط مشابه سلولهای بنیادی عصبی بالغ این پتانسیل را از خود نشان نمی‌دهند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با هزینه و مساعدت مدیریت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شد که بدینوسیله قدردانی بعمل می‌آید.

دارند (۹). اگرچه انجام مطالعه‌ای در زمینه تمایز سلولهای بنیادی رویانی موش به سلولهای رگساز نشان داد که سلولهای Flk-1 مثبت مشتق از بنیادی رویانی که به عنوان سلولهای پیش ساز عروق شناخته شده‌اند قادرند هر دو نوع سلولهای آندوتلیال و سلولهای دیواره عروق را تولید کنند و از این طریق نقش مهمی را در آنژیوژنز طبیعی ایفا می‌کنند (۱۴).

Palmar و همکاران گزارش کردند که هم نوروژنز و هم آنژیوژنز درون توده‌های تزایدی محکمی که مرتبط با عروق ریز منطقه ساب گرانول هایپوکامپ است رخ می‌دهند. نتایج ارزیابی ایمونوهیستوشیمی نشان داد که این توده‌های پرولیفراتیو مشتمل بر سلولهای پیش ساز عصبی، نوروبلاستها، سلولهای گلیال و سلولهای پیش ساز اندوتلیال می‌باشند (۱۵). Oishi و همکاران نیز در مطالعه خود الگوی بیانی مشابهی را در سلولهای تمایز یافته از سلولهای بنیادی عصبی جنین موش گزارش کردند. لذا این

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, Buhning 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.