Archive of SID

مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال سوم ● شماره ۱ ● صفحات ۵۰۱ تا ۵۰۶ ● بهار ۱۳۸۴

نقش اسید رتینوئیک و بستر آستروسیت در تمایز سلولهای بنیادی هیپوکامپ

* دکتر منوچهر صفری[۱]، دکترملیحه نوبخت[۲]، دکتر ناهید رهبر[۳]، دکتر فریده قاضی[۴]، دکتر محمد تقی جغتائی[۵]، معصومه بخشایش[۶]

چکیده

سابقه و هدف : سلولهای بنیادی، سلولهایی چند استعدادی می باشند که از نواحی متفاوتی از بدن یک موجود زنده استخراج می گردند . این سلولها در محیط کشت با استفاده از فاکتورهای متفاوت رشد و لایه تغذیه کننده سلولی قابلیت تکثیر و تمایزبرای مدت زمان طولانی را دارا می باشند . لایه تغذیه کننده سلولی آستروسیت که با استفاده از فاکتور سیتوزین آرابینوزید غیر فعال گردیده قابلیت تمایز سلولهای بنیادی کشت داده در سطح خود را به دیگر سلولها دارا می باشد . هدف اصلی این پژوهش تمایز سلولهای بنیادی هیپوکامپ با استفاده از این لایه مغذی و فاکتورهای رشد اسید رتینوئیک و ایزومر آن ۹ -RAcis به سلولهای تولید کننده اپسین است.

مواد و روشها: در این تحقیق پایه ازجنین ۱۸ روزه موش نژاد اسپراگوداولی استفاده شد . در روز ۱۸ مادر سزارین و مغز جنینها خارج گردید. بلافاصله داخل محلول HBSS قرار داده شد سپس با استفاده از روش Backer هیپوکامپ ها جدا شد وبا روش Fishbach سلولهای آن جدا گردید. سلولهای بدست آمده در داخل فلاسک $25\ cm^2$ کشت داده شد؛ بعد از ۳ روز سلولها را با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جدا ودر دو مقداریکی با دانسیته بالا ۲۰۰۰۰۰ و دیگری با دانسیته پائین ۲۰۰۰۰ سلول در داخل پلیت ۶ خانه، کشت داده شد منتها قبل از انتقال سلولها به پلیتها کف رولهای پلیت را یک ردیف Poly L lysin و ردیف دیگررا با آستروسیتهای غیر فعال پوشش دادیم . مدت ۴ روز سلولها در محیط کامل DMEM / F۱۲ و FBS ۱۰٪ نگهداری نموده و سپس به مدت ۶ روز دوزهای متفاوت ATRA و ۹ -RAcis به چاهکهای پلیتها اضافه گردید . در پایان با استفاده از منوکلونال آنتی بادی ضد اپسین سلولها بررسی شدند .

یافته‌ها: بعد از مدت ۶ روز اضافه کردن فاکتورهای فوق به سلولهای موجود درهر چاهک پلیت در دوز۱۰۰nM از ۹ -RAcis و ۵۰۰nM از ATRA بیشترین سلولهای تمایز یافته بدست آمد و در پلیتهائی که از بستر پلی لیزین به عنوان لایه مغذی استفاده شد تمایزی مشاهده نگردید . همچنین تمایز در دانسیته بالای سلولی بیشتر از دانسیته پایین بوده است .

نتیجه‌گیری: بستر آستروسیت و فاکتورهای خارجی مانندایزومرهای اسید رتینوئیک قابلیت تمایز سلولهای بنیادی هیپوکامپ به سلولهای تولید کننده اپسین را دارا می باشند .

کلمات کلیدی : اسید رتینوئیک ، رات ، سلول بنیادی ، فتورسپتور، هیپوکامپ

۱- دانشجوی دکترا ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران ، دانشکده پزشکی ، گروه علوم تشریحی(* نویسنده مسئول)
۲ - دانشیار ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران ، دانشکده پزشکی ، گروه علوم تشریحی
۳ - استادیار ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران ، دانشکده پزشکی ، گروه فارماکولوژی
۴ - استادیار، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، دانشکده پزشکی ، گروه بیولوژی سلولی
۵ - استاد ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران ، دانشکده پزشکی ، گروه علوم تشریحی
۶ - مربی ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران ، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بینائی از حواس قابل توجه انسان است. با افزایش سن و بیماریهائی همچون گلوکوم ، دیابت ، Retinitis Pigmentosa و دیگر بیماریها، سلولهای حساسه بینائی(فتورسپتورها) از بین خواهند رفت (۲،۱) و تحلیل رفتن فتورسپتورها یکی از علتهای شایع کوری در انسانها خواهد بود. جهش در سلولهای ردوپسین اولین بار در سال ۱۹۹۰ گزارش شد(۳).در حال حاضر بیش از ۱۰۰ نوع جهش ژنتیکی برای فتورسپتورها شناسائی شده و این فراوانی جهش ناهنجاریهای فراوانی را بدنبال خواهد داشت(۴). در سلولهای جهش یافته سلول توانائی انتقال ردوپسین از غشاء را ندارد و آنرا در داخل سلول انبار می کند (۵). بنا بر این پروتئینها ی انبار شده نمی توانند تشکیل پیگمانهای بینائی با cis-۱۱ را ایجاد نمایند(۶). در بعضی از بیماریها مانند Transient Retina Ischemia متعاقب افزایش فشار سیستولیک و یا انسداد شریان کاروتید داخلی و یا وجود آمبولی در شریانها ی چشمی در افراد دیابتی و یا افراد مسن موجب افزایش آپوپتوزیس در سلولهای بینائی و آسیب به شبکیه چشم شده که متعاقب آن سلولهای فتورسپتور از بین خواهند رفت که در حال حاضر هیچ درمانی برای این افراد وجود ندارد. دانشمندان از مدتها پیش توجه خاصی به سلولهای بنیادی و تمایز این گروه از سلولها به دیگر سلولهای بدن داشته اند. سلولهای بنیادی دارای دو خصوصیت قابل توجه می باشند نخست اینکه چند استعدادی بوده ، پس از تمایز قادرند به انواع متفاوت سلولی تبدیل شوند (۸،۷) و دوم ، بدون هیچگونه محدودیتی و بدون از دست دادن توانائی رشد و نمو ، بطور نامتناهی تقسیم میشوند. به عبارت دقیق تر این سلولها دارای قدرت تجدید خودبخودی می باشند(۹). وجود این دو ویژگی سبب شده که سلولهای مذکور به عنوان ابزاری مناسب در بسیاری از امور پژوهشی و درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

اگرچه سلولهای بنیادی بالغ نسبت به سلولهای بنیادی جنینی از نظر تمایز محدودیت هایی دارند ، اما مزیت مهمی که استفاده از سلولهای بنیادی بالغ را توجیه می کند این ا ست که از سلولهای خود فرد برای جایگزینی ناحیه آسیب دیده استفاده می شود که به دنبال آن سیستم ایمنی فرد فعال نمی گردد و بافت و سلولهای پیوند زده شده را پس نخواهد زد(۱۰). سلولهای بنیادی عصبی را از نواحی متفاوتی از مغز مانند هیپوکامپ، ناحیه اطراف بطنی ، مغز قدامی ، استریاتوم و پیاز بویائی می‌توان استخراج نموده و کشت داد(۱۲،۱۱). این سلولها نه تنها در جنین بلکه در بالغین نیز وجود داشته و توانائی تمایز دارند(۱۳). در تحقیقات صورت گرفته مشخص شده برخی از فاکتورها برای بقاء و برخی دیگر برای رشد و تمایز Neural Stem Cell (NSC) لازم و ضروری می باشند مانند Brain Drive Neurotrophic Factor (BDNF) برای تمایز سلولهای کورتکس به نورون لازم می باشند(۱۵،۱۴).و یا فاکتور Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) باعث مهار تکثیر سلولهای بنیادی مغز شده و از طرفی باعث تمایز این سلولها به سمت نورون خواهد شد(۱۷،۱۶). زنده ماندن و تکثیر سلولهای بنیادی استریاتوم وابسته به EGF ، سلولهای کورتکس وابسته به FGF و سلولهای طناب نخاعی وابسته به فیبرونکتین و عصاره جنینی می باشند(۱۸). رتینوئیک اسید فاکتوری است که در سیر تکامل از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است. اگر NSC را در معرض اسید رتینوئیک قرار دهیم به سمت تولید نورونهای GABAergic خواهد رفت(۱۸). و یا اگر از اسید رتینوئیک و فاکتورهائی مانند FGF۸, bFGF در محیط کشت استفاده نماییم NSC ها بیشتر به سمت سلولهای دوپامینرژیک تمایز خواهند یافت(۱۹).

بستر کشت در تمایز از اهمیت خاصی برخوردار است. در تحقیقات دانشمندان مشخص شده است که اگر سلولهای رده اکتودرمال را بر روی لایه ای از سلولهای مزودرمال کشت دهیم می توانیم سلولهای رده مزودرمال تولید نمائیم(۲۰). بنابر این در طی تمایز فاکتورهای فراوانی نقش دارند که می بایست آنها را بررسی نمود.

مواد و روشها

جداسازی و کشت سلولهای بنیادی:

در این پژوهش از موش نژاد اسپراگوداولی (انستیتو رازی تهران) استفاده شد. به منظور بدست 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 و سپس رحم باز و تمام جنینها را از داخل رحم خارج گردید و در داخل محلول Hanks Buffer Salt Solution (HBSS) سرد قرار داده شد بلافاصله به زیر هود منتقل گردید و سرهای آنان جدا شد. سپس با استفاده از روش

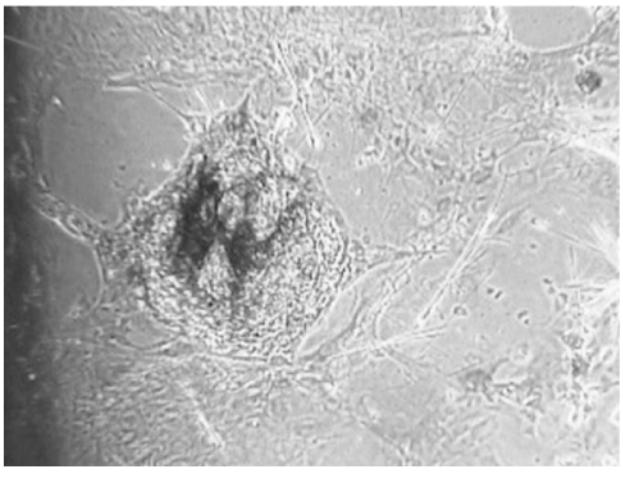
www.SID.ir

Archive of SID

Bankerهیپوکامپها را خارج نموده ، و با استفاده از روش pipette fair pasture و تریپسین۰/۰۱٪ با روش fishbach سلولهای هیپوکامپ از یکدیگر مجزا شدند. با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سلولها را درمحیط جدا نموده مایع بالائی را خارج نموده، سلولها به صورت یک صفحه نازک در کف فالکون باقی می مانند. ۲cc محیط کشت به فالکون حاوی سلول اضافه نموده و با استفاده از پیپت برقی سلولهارا به صورت معلق در آورده سپس با استفاده از تریپان بلو و لام هموسیتومتر سلولهای زنده شمارش شدند بعد از شمارش سلول آنها را در دوگروه دانسیته کم ۲۰۰۰۰ و زیاد ۲۰۰۰۰۰ داخل پلیتهای ۶ خانه قرار دادیم، قبل از انتقال سلولها به پلیت ابتدا ردیف اول پلیتها را با $10\ g/ml^2$ از poly L lysin و ردیف دوم با آستروسیتهای غیر فعال کورتکس پوشش داده شد . برای جدا سازی آستروسیت از کورتکس از روش Jurlink استفاده شد ، سپس بااستفاده از ۱۰ µM از Cytosine Arabinoside به مدت ۲۴ساعت در محیط کشت سلولهای آستروسیت غیر فعال گردیدند بعد با PBS استریل پلیتها شستشو داده و آماده استفاده می گردیدند . ابتدا در یک گروه از پلیتها سلولهای با دانسیته کم و در گروه دیگر سلولهای با دانسیته بالا قرار می گرفتند. مدت ۴ روز سلولها در داخل محیط DMEM/F۱۲و۱۰٪ FBS قرار می گرفتند بعد از این مدت دوزهای ۱-۱۰-۵۰-۱۰۰-۲۰۰-۳۰۰-۴۰۰- ۵۰۰ نانومول از ATRA و۹-RAcis را بطور جداگانه به هر ول اضافه نموده و مدت ۶ روز این دوزها را تست نموده و بعد از این مدت ایمیونوسیتوشیمی بر روی پلیتها انجام شد. برای هر گروه مورد آزمایش یک گروه کنترل منفی هم در نظر گرفته شد که تمام مراحل آزمایش بر روی آنها انجام می شد با این تفاوت که فاکتوری به محیط کشت آنها اضافه نشد . در پایان نتایج با استفاده از نرم افزار EXCEL version۲۰۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفت.

سنجش آنزیمی:

فعالیت آلکالین فسفاتازی یکی از ویژگی های سلولهای تمایز نیافته است. در این روش با استفاده از۱.۴ α- Diaminobutane dihydro chloride (naphteal phosphate) کلونی های سلولی تمایز نیافته را رنگ کرده، در صورت وجود سلولهای تمایز نیافته کلونی ها رنگ قهوه ای پررنگ به خود می گیرند. سلولهای تمایز یافته و لایه مغذی هیچگونه فعالیت آلکالین فسفاتازی از خود نشان ندادند. (شکل ۱).



شکل ۱ - فعالیت آلکالین فسفاتازی کلونی سلولی حاوی سلولهای بنیادی با استفاده از روش نفتیل فسفات ،بزرگنمائی x ۲۰

ایمیونوسیتوشیمی:

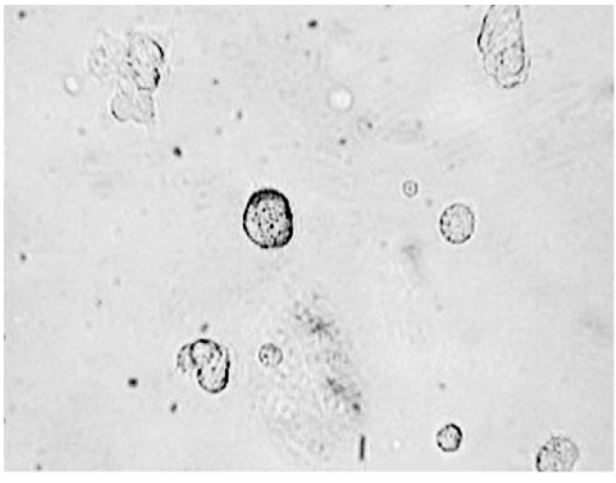
برای ایمیونوهیستوشیمی غیر مستقیم ابتدا بعد از اضافه کردن دوز های متفاوت از فاکتورهای فوق به مدت۶ روز، سلولها درپارافرمالدئید ۴٪ و ۰/۳٪ Triton X۱۰۰به مدت نیم ساعت فیکس شدند سپس به مدت نیم ساعت با PBS سرد ۳ مرتبه شستشو داده به مدت یک ساعت انکوبه در Normal Gout Serum درحرارت ۴C انکوبه شده تا مناطق غیر اختصاصی سلولها حذف گردند ، بعد مدت یک ساعت در آ نتی بادی اولیه منوکلونال آنتی بادی آنتی اپسین (RET P۱) انکوبه شدند ، بعد از آن مجددا شستشو و سپس در آنتی بادی ثانویه کونجوگه به آلکالین فسفاتاز به مدت یک ساعت قرار داده شدند در مرحله آخر سوبسترای مخصوص NBT/BCIPدر اختیار آنها قرار گرفت و در نهایت سلولها با استفاده از میکروسکوپ معکوس مشاهده گردیدند .

یافته ها

رسپتورهای ATRA جزء زیر گروه رسپتورهای استروئیدی هستند که شامل (RARs)و (RXR) می باشند (۱۶) . در روز اول سلولهای جدا شده از هیپوکامپ به صورت مجزا و در دو گروه سلولی کوچک و بزرگ قابل مشاهده بودند ، سلولهای کوچک بسیار زیاد و با قطر متوسط ۴۵nm و سلولهای بزرگتر از لحاظ تعداد کمتر از سلولهای کوچک بودند قطر متوسط آنها ۱۳۰nm بود(شکل ۲) .

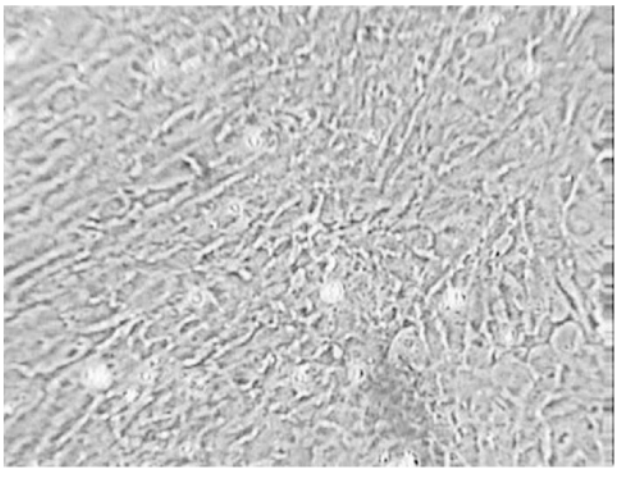
www.SID.ir

Archive of SID



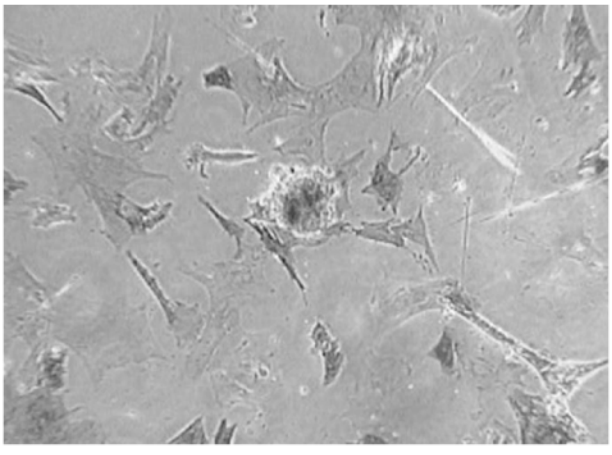
شکل ۲ -سلولهای بزرگ و کوچک بعد از جدا کردن سلولهای هیپوکامپ در محیط آزمایشگاه با بزرگنمائی ۱۰x

در روز دوم سلولها به لایه مغذی متصل شده و شکل اپیتلیالی به خود گرفتند(شکل۳).



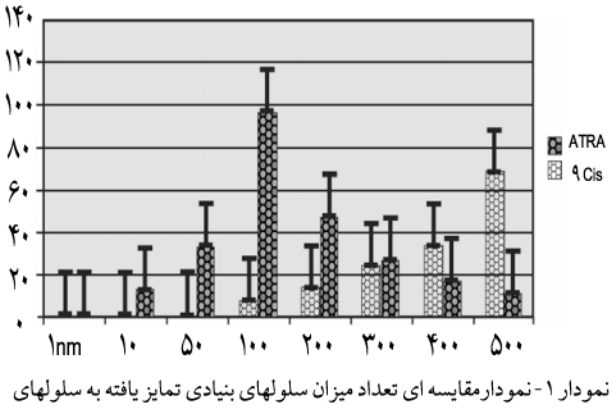
شکل ۳ - سلولهای جدا شده از هیپوکامپ بعد از ۴ روز سلولها کاملاً کف پلیت را پوشانده اند ، بزرگنمائی ۱۰x

در گروههای با دانسیته سلولی بالا سلولها بعد از مدت زمان ۴ روز تمام کف پلیت را پر کرده بودند و در گروههای با دانسیته پایین بعد از ۴ روزدر محیط کشت ،سلولها نتوانستند تمام کف پلیتها را پر کنند و در تماس کامل با یکدیگر باشند.بعد از مدت زمان ۶ روز که سلولها دوز های متفاوت ۹ - RA cis را دریافت کرده بودند در دوز ۱۰۰nM با بستر آستروسیت بیشترین تعداد سلولهای تمایز یافته مشاهده شد (شکل۴).



شکل ۴ - سلولهای تیره رنگ شده با آنتی بادی منوکلونال آنتی اپسین بزرگنمائی ۲۰x

البته در دوزهای دیگرنیز تمایز وجود داشته اما نسبت به دوز ۱۰۰ نانومول کمتر بوده است . در گروههای با بستر پولی لیزین در تمام گروهها سلول تمایز یافته ای مشاهده نشد. در گروههای که در مدت زمان ۶ روز ATRA را دریافت می کردند در دوز ۵۰۰ نانومول با بستر آستروسیت بیشترین تعداد سلولهای تما یز یافته مشاهده گردید در دوزهای دیگر تمایز سلولی کمتر و یا اصلا دیده نشد. اما در مجموع با شمارش سلولهای تمایز یافته در پلیتها مشخص شد در دوز ۱۰۰ نانومول از۹- RAcis تعداد سلولهای تمایز یافته بیشتر از تمام دوزها بوده است (نمودار ۱).



نمودار ۱ - نمودارمقایسه ای تعداد میزان سلولهای بنیادی تمایز یافته به سلولهای شبه فتورسپتوردر دوزهای متفاوت ATRA و ۹ - RAcis در دانسیته بالا

بحث و نتیجه گیری

در سالهای اخیر مطالعات فراوان نشان داده که تقابل سلول به سلول برای تمایز نورونهای رتینال مهره داران در محیط in vivo یا in vitro لازم و ضروری می باشند(۱) . سلولهای رتین برای تحقیقات دانشمندان، به عنوان یک مدل، بطور گسترده ای مورد استفاده قرار

www.SID.ir

Archive of SID

می گیرند (۲). درآزمایشات کشت همزمان یاco- culture نشان داده شده که تمایز سلولهای اجدادی رتین به وسیله سیگنالهای قابل انتشاردر محیط خارج سلولی کنترل می گردد(۳). د رمطالعه حاضر نشان داده شد که اسید رتینوئیک و ایزومر آن می توانندبر روی سلولهای بنیادی هیپوکامپ استخراج شده از جنین موش، تاثیر گذاشته و باعث تمایز آنها به سلولهای حاوی اپسین گردد. Watanabe در سال ۱۹۹۲ نشان داد که سلولهای جدا شده از رتین جنین ۱۵ روزه رات را اگر با سلولهای رتین رات بالغ به صورت همزمان کشت دهیم بیشتر سلولهای جنینی به سلولهای استوانه ای تمایز خواهند یافت (۵،۴) و در تحقیقات ما کشت همزمان سلولهای هیپوکامپ با آستروسیت ها باعث تمایز سلولهای هیپوکامپ گردیده است .

MattewKelly. درتحقیقات خود نشان دادند که ۵۰۰ نانومول از ATRA می تواند باعث تمایز سلولهای بنیادی رتینا به سلولهای استوانه ای در محیط آزمایشگاه گردد. همچنین سلولها وابسته به دوز عمل می نمایند. بیشترین تاثیر در دوز ۵۰۰ نانومول و کمترین تاثیر در دوز ۱۰ نانومول بوده است (۷،۶) اما در تحقیق ما دوز ۱۰nm ATRA باعث تمایز نگردید و ایزومر آن یا۹-RA cis بیشتر از خود اسید رتینوئیک باعث تمایز شده است .

با توجه به اینکه اسید رتینوئیک و ایزومر آن نمی توانند به تنهائی باعث تمایز سلولهای بنیادی هیپوکامپ گردند و بسترسلولی در تمایز از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است . بر مبنای نظریه Rehcaga انتخاب فنوتیپ سلولهای بنیادی وابسته به حساسیت سلولها به فاکتورهای متفاوت است (۸). بعضی از مطالعات دانشمندان نشان داده که تمایزسلولهای رتین جنین رات به فتورسپتورها در محیط آزمایشگاه (Reh،۱۹۹۲) و همچنین درمرحله‌بعد از تولد (Akagawa،۱۹۹۰) و یا در جنین قورباقه (Harris، ۱۹۹۲) وابسته به دانسیته و تراکم سلولی در محیط کشت است(۱۰،۹). در مطالعه ما نیز تراکم از اهمیت خاصی برخوردار بود بطوریکه پلیت های با دانسیته پایین قابلیت تمایزی بسیار کمتری نسبت به پلیت های با دانسیته بالا داشته است ، بنا بر این ارتباط بین سلولی و احتمالا فاکتورهائی که خود سلولها در تماس با یکدیگر ترشح می نمایند یکی از عوامل بسیار مهم هم در زنده ماندن و تمایز سلولها می باشند، این که اما چه فاکتوری در این بین ترشح می گردد، هنوز دقیقا مشخص نشده است. (Altsuler،۱۹۹۳) در تحقیقات خود نشان داد که فاکتور Taurine قابلیت‌تمایز سلولهای بنیادی رتین به فتورسپتورها را دارد. بنا براین اسید رتینوئیک و این فاکتوراثری مشابه یکدیگردارند (۱۱). آنها ثابت کردندکه رتینوئیدها در بقاء و زنده ماندن سلولهای فتورسپتوردر کشت سلولهای رتین جنین جوجه در محیط آزمایشگاه نقش مهمی دارند. مطالعات دیگر نشان داد که رتینوئیک اسید نقشهای مشابه در دیگر سلولها دارد (۱۲). حد اقل ۴ نوع دهیدروژناز وابسته به ساخته شدن اسید رتینوئیک که توسط سلولهای رتین جنینی ساخته می شوند در طی تکامل و بعد از تکامل سلولهای رتین موش دیده شده است (۱۳). بر این مبنا اسید رتینوئیک یکی از فاکتورهای بسیار مهم در سیر تکاملی در سلولهای رتین می باشد(۱۴). در سال ۱۹۹۲ ، 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 اوماکزیمم مقدار دوز برای تمایز ۱۰۰nMبوده است . او همچنین نشان داد که تعداد سلولهای تمایز یافته در گروه آزمایش که محیط کشت انها فاقد سرم بوده است حداقل دو برابر گروه کنترل که محیط کشت آنها حاوی سرم بوده است می باشد . بنابراین سرم خود یک عامل مهاری برای تمایز محسوب میگردد . 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 می گردند و عمر کوتاهتری دارند. او نشان داد که در گروه سلولهای با دانسیته پائین بیان ژن bcl - xl۲bcl بسیار بالاتر بیان می گردند (۱۵،۱۶). تحقیقات حاضر هر چند بر روی بیان ژنها نبوده اما میتوان به این نتیجه رسید که در پلیتهای با دانسیته پائین ژنهای آپوپتوتیک فوق بیان گردیده و مانع بقاء آنها شده است . با توجه به یافته های فوق میتوان نتیجه گیری کرد که ATRA در تمایز اهمیت دارد اما ایزومر آن۹- RS cis اثرات به مراتب قوی تری در تمایز خواهد داشت دوم اینکه این فاکتورها بر روی بستر آستروسیتی اثر تمایزی دارند ، و بالاخره سوم اینکه در دانسیته بالا سلوهای بنیادی هیپوکامپ قابلیت تمایزی بیشتری نسبت به دانسیته پایین دارند .

پیشنهادات : در پایان پیشنهاد می گردد که بعد از انجام مراحل فوق سلولهای تمایز یافته رابر روی مدل حیوانی تزریق نموده و نتایج را مورد بررسی قرار داد.

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 . از تمامی همکاران این دو بخش تشکر می گردد .

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Adrin M. Rod photoreceptor maturation dose not vary with retinal eccentricity in mammalian retina. Current Eye Research. 1999; 8: 393-402.

2. Alvarez A. Stem cells in the developing and adult nervous system, Neural stem cell. 1998; 36: 105-10.

3. Class B. Identification of neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell. 1999; 96: 25-34.

4. Shen Q. Stem cells in the embryonic cerebral cortex. J Neurobiology. 1998; 36: 162-74.

5. Miyake WN. Periciliary structure of developing rat photoreceptor cells. J Electron Micros. 1999; 48: 929-35.

6. Kelly MW. Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors in vitro. Development. 1994; 120: 2091-02.

7. Keirstead HS. Stem cell transplantation into the central nervous system and control of differentiation. J Neuroscie. Resea. 2001; 63: 233-6.

8. Reh T, Anchan R. EGF and FGF stimulate retinal neuroepithelial cell proliferation in vitro. Neuron. 1991; 6: 1-20.

9. Harris WA. Axonal pathfinding in the absence of normal pathways and impulse activity. J Neuroscience. 1999; 4: 1153-62.

10. Akagawa k . Presence of light- responding neurons in the reagregate cultures of the rat retinae. Brain Resea. 1998; 57: 143-45.

11. Altschuler DM. Taurine promotes the differentiation of a vertebrate retinal cell type in vitro. Development. 1999; 119: 1317-28.

12. Schmitt A. Identification of novel molecular component of the photoreceptor connecting cilium. Exp Eye Res. 2001; 73: 837-49.

13. Minoru T, Yasushi A. Bone marrow – Derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. Stem Cell. 2002; 20: 279-83.

14. Cheryl A. Retinoic acid Enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell- Derived precursors. J Neurobiology. 1998; 37: 281-90.

15. Tezel G, Gial M. Density – dependent resistance to apoptosis in retinal cell. Current Eye Research. 1999; 19: 377-88.

16. Amit M. Derived and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. J Anat. 2002; 200: 225-32.

17. Banker GA. Rat hippocampal neuron in dispersed cell culture. Brain Research. 1976; 126: 397-425

18. Jurlink BH. Astrocyte cell lineage. J Comp Neurolo. 1981; 200: 375-91.

19. Lillien L. Control of proliferation in the retina. Development. 2003; 115: 253-66.

20. Monica M. Reliability of a Rod photoreceptor outer segment grading system. Exp Eye Res. 2003; 72: 573-9.

21. Richard S. The cellular fate of mutant rhodopsin. J Cell Scien. 2002; 115: 2907-18.

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of retinoic acid and astrocyte as a feeder layer in differentiation of hippocampal stem cell

*Safari M; Msc[1] , Nobakht M; PhD[2] , Rahbar N; PhD[3], Ghazi F; PhD[4] , Goghataee MT; PhD[5], Bakhshayesh M; Msc[6]

Abstract

Background: Adult stem cells are pluripotent cells conventionally isolated from some part of body by different methods . From developmental stand point , murine neural stem cells represent an accessible and important system for studies of basic stem cell property such as self- renewal and multipotency.

Materials and methods: In this study hipocampal stem cells obtained from embryonic day 18 (E18). Pregnant female rats were killed , embryos heads separate and then hippocampus isolated by the method of Banker, then their cells dissociated by the methods of Fishbach, and plated in flask 25cm, after 3 days cells separated by tripsin , counted with trepan blue and hemocytometer , divided into two density (high 200000) and (low 20000 cells). Before transplantation of cells , six well plates coated with poly L lysin and inactivated astrocyte , Then isolated cells transplanted into 6 well plate for 4 days with medium DMEM/F12 supplemented with FBS10% . After 4 days different doses of ARTA and RA cis-9 added per well for 6 days , and then immunocytochemistery were done .

Results: After 6 days of treatment with above factors, doses of 100nM RA cis-9 and 500 nM ATRA have the more staining cells with monoclonal antibody . But in 100 nM RA cis-9 , we saw maximum differentiated cells . All of differentiation were done on wells with inactivated astrocyte layer in high and low density.

Conclusions: Inactivated astrocyte as a feeder layer and extrinsic factors such as All Transe Retinoic Acid (ATRA) and RA cis-9 can cause differentiation in hippocampal stem cells into photoreceptor like cell.

Key words: Acid retinoic , Hippocampus , Photoreceptor , Stem cells.

1 - (* Corresponding author) PhD Student, Iran University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of anatomy
2 – Associat professor, Iran University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of anatomy
3 – Assistant professor ,Iran University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of pharmacology
4- Assistant professor ,Iran University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of cellular biology
5 – Professor, Iran University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of anatomy
6 – Instructor, Iran University of Medical Sciences, Molecular and cellular research center

www.SID.ir