تمایز سلولهای عصبی فعال از سلولهای بنیادی جنینی موش در محیط آزمایشگاهی

حسین بهاروند .M.Sc☆♦، کلاس ماتایی .Ph.D★

☆ پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

★دانشگاه ملی استرالیا، گروه علوم زیستی مولکولی JCSMR

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۹۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

چکیده

* **هدف:** ارزیابی خاصیت پرتوانی (pluriportency) سلولهای بنیادی جنینی موش و تمایز آنها به سلولهای عصبی.

* **مواد و روشها:** از سلولهای بنیادی جنین موش نژاد C57BL/6 تولید شده در آزمایشگاه موسوم به (رویان B1)، برای تولید سلولهای عصبی استفاده شد. بدین منظور از سلولهای رویان B1 اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies) ساخته شد و به دنبال آن سلولهای پیشساز عصبی به واسطه فاکتورهای رشد اپیدرمی و فیبروبلاستی (bFGF, EGF) انتخاب شدند. سلولهای حاصل با حذف فاکتورهای رشد وکشت در محیطهای مناسب به سلولهای عصبی وگلیال تمایز یافتند. برای ارزیابی نورونهای تولید شده در محیط آزمایشگاه به غیر از مورفولوژی از آزمونهای ایمونوهیستوشیمی و الکتروفیزیولوژی استفاده شد.

* **یافته‌ها:** مطالعات ایمونوهیستوشیمی با آنتی بادی علیه MAP-2 (Microtubule Associated Protein-2) آنزیم TH(Tyrosine Hydroxylase)؛ GAD, (Glutamic Acid Decarboxylase) نشان داد که سلولهای حاصل، نورون بوده و دارای جمعیتی از نورونهای مولد GABA و دوپامین هستند.

مطالعات الکتروفیزیولوژی نیز نشان داد، سلولهای مزبور پتانسیل عمل را به طور خود به خود تولید می‌کنند و نسبت به تحریکات الکتریکی نیز واکنش نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد: سلولهای بنیادی جنینی رویان B1 قابلیت تولید نورون را داشته و نورونهای تمایز یافته در محیط آزمایشگاهی دارای عملکرد هستند.

گل واژگان: سلولهای بنیادی جنینی، تمایز، نورون

مقدمه

تکوین سیستم عصبی در پستانداران توسط عوامل اپی ژنتیکی و پیامهای سلولی اندوژن طی جنین زایی و بعد از آن انجام می‌شود (۱، ۲).

تبیین دقیق این پیامها طی جنین زایی مشکل است. از این رو شناخت مکانیسمهای تنظیم کننده این مراحل هدف بسیاری از مطالعات زیست‌شناسی تکوینی است. از سوی دیگر تولید برنامه‌ریزی شده فراوان سلول تمایز یافته، برای بکارگیری پیوند، مورد توجه دانشمندان است. در این ارتباط، سلولهای بنیادی جنینی (Embryonic stem cells, ES)، سلولهایی با قابلیت تمایز زیاد در محیط آزمایشگاهی از اهمیت خاصی برخوردارند.

سلولهای بنیادی جنینی، سلولهایی هستند که از توده سلولی داخلی بلاستوسیستها به دست می‌آیند (۳، ۴). این سلولها دارای دو خصوصیت مهم هستند که مجموع این خصوصیات آنها را به صورت ابزاری توانمند در مطالعه تکوین پستانداران قرار داده است. اولین خصوصیت سلولهای ES آن است که دارای توان نوسازی (renewal) بالایی هستند و بدون تمایز به تقسیمات خود ادامه می‌دهند و حتی بعد از ۲۵۰ تقسیم در محیط کشت، باز هم خصوصیت پرتوانی (Pluripotency) خود را حفظ می‌کنند (۵) و قابلیت تمایز در محیط آزمایشگاهی به انواع سلولها را دارند. دومین خصوصیت آن است که با تزریق سلولهای ES درون بلاستوسیستهای میزبان، سلولهای ES پس از الحاق (Integration) در توده سلولی داخلی بلاستوسیستهای میزبان، جمعیتی از تمام رده‌های سلولی (Cell Lineage) از جمله سلولهای زاینده (germ line) را به وجود می‌آورند (۶، ۷). بنابراین جانور حاصل، شامل سلولهای تمایز یافته از سلولهای ES تزریقی و توده سلولی داخلی بلاستوسیست میزبان است که این خصوصیت نشان دهندهٔ پرتوانی این سلولهاست. بنابراین سلولهای ES پیوندی در ساخت سیستم عصبی هم دخالت دارند (۷). معتقدند که سلولهای ES پیوندی از طریق مراحل تکوینی طبیعی و همانند سلولهای جنینی اولیه عمل می‌کنند. در حالت طبیعی، سلولهای توده داخلی (ICM)، اکتودرم اولیه را به وجود می‌آورند و این لایه طی گاسترولاسیون سه لایه جنینی (اکتودرم، مزودرم و اندودرم) را می‌سازد. سپس مزودرم ونورواکتودرم را در خط میانی القا می‌کند تا سیستم عصبی را بسازد (۸).

تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای عصبی با ایجاد ساختار کروی شکل به نام اجسام جنینی (embryoid bodies) سرعت می‌گیرد. در واقع اجسام جنینی، ساختارهایی متشکل از سلولهای ES هستند که تمایز ابتدایی در آنها رخ داده است. به طوری که سلولهای آن، ژنهای سه لایه زایندهٔ جنینی را بیان می‌کنند و در واقع با تقلید از همان مراحل ابتدایی جنینی القاء لازم صورت می‌گیرد. به دنبال آن تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای عصبی با روشهای متفاوتی همچون تیمار اجسام جنینی با رتینوئیک اسید (۸، ۹، ۱۰)، انتخاب دودمان سلولهای عصبی به واسطهٔ فاکتورهای رشد (۱۱) و یا تقلید از شرایط in vivo در محیط آزمایشگاهی (۱۲) انجام می‌گیرد.

درک بهتر مکانیسمهای تکوین با تمایز سلولهای ES در محیط آزمایشگاهی، بیشتر می‌شود. لذا در این مطالعه با استفاده از روش انتخاب دودمان سلولهای عصبی به واسطه فاکتورهای رشد توان تمایز سلولهای ES به سلولهای عصبی بررسی شد و عملکرد آنها توسط الکتروفیزیولوژی ارزیابی گردید.

مواد و روشها

* سلولها و محیط کشت

در این مطالعه از سلولهای بنیادی جنینی (ES) رویان B1 استفاده شد (۱۳). این سلولها دارای موفولوژی ES، کاریوتایپ طبیعی، جنسیت نر و الکالین فسفاتاز مثبت بودند و ژن OCT-4 (نشانگر Pluripotency) را بیان می‌کردند.

سلولهای مزبور بر سلولهای فیبروبلاستی جنینی موش و در محیط کشت (DMEM; Gibco BRL, Life Technologies 10829-081, Dulbeco's) همراه با افزودنیهای ذیل کشت شدند:

1) Leukemia inhibitory factor 1000 I.U (LIF, ESGORO Chemicon), Fetal calf serum (FCS, Multiser TRACE, 15-010-0500v), L-Glutamin 2mM (Gibco BRL, 15039-021), Nonessential amino acids 0.1 mM (Sigma, M7145), β- Mercaptoethanol 0.1 mM (Sigma, M7522)

اساس روش تمایز سلولهای ES رویان B1 همانند روش Rolletschek و همکارانش (۲۰۰۱) بود (۱۴). در مرحله اول سلولهای ES در قطرات آویزان (۲۰۰ سلول به ازای هر قطره) به مدت دو روز کشت شدند. طی این مدت اجسام شبه جنینی (EB) به وجود می‌آیند. EB برای دو روز دیگر در پلیت باکتریایی کشت شدند. طی این مدت محیط کشت سلولها عبارت بود از:

Iscove's modification of DMEM (IMDM, Gibco, 31980-030) که حاوی ۲۰ درصد FCS و آلفا مونوتیوگلیسرول 450mM به جای بتامرکاپتواتانل بود. این روز به عنوان روز چهارم کشت نامگذاری شد.

تعداد EB ۱۰ در هر خانه پلیت ۶ خانه (TPP) و در محیط IMDM+20% FCS(Multiser, TRACE, 15-010-0500) کشت شد.

انتخاب سلولهای پیشناز عصبی بر اساس روش Okabe و همکاران، ۱۹۹۶ انجام شد (۱۱). روز بعد که EBها به کف ظرف چسبیده‌اند، محیط کشت DMEM/F12 حاوی 5μg/ml انسولین (Sigma, I6634)، 30nM سدیم سلنایت (Sigma, S5261) و 5μg/ml فیبرونکتین (Invitrogen, 12173-091) جایگزین محیط قبلی شد و هر دو روز یکبار محیط کشت تعویض شد.

در روز 8+4، EBها با استفاده از 0.53mM(Gibco BRL, 15305-014) EDTA و تریپسین ۰/۰۵ درصد در Hank´s buffered saline برای سه دقیقه جدا شدند و به صورت‌تک سلولی در آمدند. پس از سانتریفوژ، سلولها بر روی کاوراسلیپهای پوشیده شده از Poly L-ornithine (Sigma,P3655), Laminin(Sigma, L 2020) برای

شش روز در محیط کشت DMEM/F12(Gibco, 12456-018) حاوی سدیم 20nM پروژسترون (Sigma, P7556)، 1μg/ml, 100μM Putrescine (Sigma, P5780) لامینین 25mg/m انسولین، 50mg/ml ترانسفرین، 30nm سلنایت کشت شدند. (طی این مدت، محیط کشت هر دو روز یکبار عوض شد).

در ضمن روزانه

(Basic fibroblast growth factor, (Sigma, F0291)bFGF10ng/m (Epidermal growth factor, sigma E4127) EGF20ng/m به محیط کشت اضافه شد. در روز 14+4 تمایز نورونهای بالغ با کشت سلولها در محیط کشت Neuroblast(Gibco, 211030-049) حاوی ۲درصد B27(Gibco, 17504-0044) و ۱۰درصد FCS انجام شد. دو هفته بعد یعنی در روز 28+4 سلولهای حاصل ارزیابی شد.

* آنتی بادیها و ایمونوفلورسنس

چهارده روز پس از کشت نهایی، سلولهای کشت شده بر کاوراسلیپ با چهار درصد (W/V) پارافرمآلدهید تثبیت و برای ایمونوفلورسنس پردازش شدند.

آنتی بادیهای مونوکلونال علیه پروتئینهای مرتبط با میکروتوبول [MAP2(a+b)]، (Microtubuls associate proteins) (1:250)] (Sigma, M1406)آنزیمهای [(Glotamic acid decarboxylase) GAD (1:50) Boehringer Monnheim]، [JTH GmbH, (Tyrosin hydroxylase)] (TH) (1:250) 381-017-1 بررسی شد.

تمام آنتی‌بادیها در این تجربه مونوکلونال موشی بودند. آنتی بادی ثانویه FITC-Conjugation offinipure donkey anti-mouse IgG، (Jackson Immono research labratories, 715-095-150) استفاده شد.

* میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

برای SEM، سلولها در محلول ۲درصد گلوتار آلدهید در ۰/۱M بافر سدیم کاکودیلات (pH=۷/۴) در دمای آزمایشگاه برای دو ساعت، تثبیت (fix) شدند. به دنبال آن سلولها ES در محلول بافر تتراکسید اسیوم به مدت ۱/۵h مورد تثبیت مجدد قرار گرفتند و با اتانول آبگیری شدند. سپس سلولها در نقطهٔ بحرانی خشک شده و بر پایه‌های آلومینیومی قرار گرفتند و با طلا پوشانده شدند. نمونه‌ها با میکروسکوپ Cambridge S360 SEM مشاهده شدند.

* آزمون کامپنوت (Campont)

برای تشخیص این نکته که آیا سلولهای عصبی تولیدی، مربوط به سیستم عصبی محیطی و یا مرکزی هستند از روش کامپنوت استفاده شد که روش آن قبلاً بیان شده است (۱۵). روش این کار عبارت بود از: کف پتری (Flacon, 35mm) با کلاژن (Calf SKIN) که دو برابر با آب رقیق شده بود، پوشانده شد. دو روز بعد پس از خشک شدن کلاژن کف ظرف با چند سنجاق که کنار هم چسبانده شده بودند، خراشیده شد. نوریتهای (neurite) در حال رشد تمایلی به عبور از خراشها ندارند و بنابراین از بین آنها می‌شوند. در واقع خراشها، نوریتهای در حال رشد را به اتاقکهای ظرف کامپنوت هدایت می‌کنند. قبل از چسباندن ظرف کامپنوت به کف پتری، مقداری متیل سلولز یک درصد رقیق شده در محیط کشت بدون سرم روی ناحیه خراشیده شده گذاشته شد تا از چسبیدن کامل ظرف کامپنوت به کف پتری جلوگیری شود. سپس کف ظرف کامپنوت را به گریس (USA high vacum grease, Corning Corporation) آغشته شد وروش پتری چسبانده شد. در روز ۴+۸ سلولها با آنزیم تریپسین به صورت منفرد در آمده و در محیط Naurobasal حاوی FCS ۱۰درصد ۲B27درصد کشت شدند. لازم به ذکر است که ظرف کامپنوت متشکل از دو خانه و یک شیار است. لذا سلولها در یک خانه قرار گرفته و بدنبال آن نورونهای محیطی در صورت وجود با عبور از ظرف، اکسون خود را به سمت مقابل و به سمت اطاقک مقابل می‌فرستند.

* الکتروفیزیولوژی

برای بررسی عملکرد نورونهای تمایز یافته، ۱۴-۱۲ روز بعد از کشت نهایی، ۶ نورون مورد ارزیابی الکتروفیزیولوژی قرار گرفت. بدین منظور کاوراسلیپ (coverslip) حاوی نورونهای کشت یافته بر آن، به صفحه میکروسکوپ (Olympus optical, 50 Tokyo, Japan) منتقل شدند و در معرض مایع مصنوعی aCSF (مایع مغزی، نخاعی) قرار گرفتند. سرعت perfusion این مایع حدود ۲ml/min بود. ترکیبات مایعی aCSF (بر حسب mM) عبارت بودند از: (۱۱۹) Nacl، (۲/۵) Cl، (۱/۳) MgCl2، (۲/۵) CaCl2، (۱/۰) Na2HPO، ۲۶/۲ NaHCO3، (۱۱) glucose. این مایع با ۹۵درصد CO2، ۵درصد O2 به تعادل رسیده و دمای آن در حدود ۳۳-۳۲ درجه سانتی‌گراد بود.

ثبتهای کل سلول (whole- cell recording) از جسم سلول نورونها و با استفاده از ویدئو میکروسکوپی تداخلی - افتراقی (differential - interfrence videomicroscopy) انجام شد. پیپتهای پچ (patch) دارای مقاومت ۵-۲ (مگااهم) بودند. این پیپتها از جنس شیشه بروسیلیکات بودند. محلول داخلی پیپتها (بر حسب mM) عبارت بودند از:

(۲) Mg2-ATP, (۱۰) HEPES, (۸) NaCl, (۱۳۵) KMeSO4 (۰/۳) Na3-GTP, (۰/۱) Spermin,

pH با استفاده از KOH برابر ۷/۳ تنظیم شد و اسمولاریته بین ۲۹۰-۲۸۰ تنظیم گردید. در ضمن ۵۰μm از green BAPTA-1(Molecular probes, Eugene, OR) OregoN به داخل پیپتها اضافه شد.

سیگنالهای الکتروفیزیولوژی با استفاده از یک (Axon City, CA) Insteruments, Fosler Axopatch 1D amplifire با فرکانس ۱۰KHz (مراحل ۶۰۰ میلی ثانیه‌ای) و با استفاده از (Instru Tech, Port Washongton, NY) ITC-16 board به صورت دیجیتالی درآمد و در سطح ۵KHz سرعت نمونه برداری فیلتر شد.

سیگنالهای الکتروفیزولوژیک، با استفاده از کامپیوتر Macintash

و نرم‌افزار Axograph جمع‌آوری شدند. پروتوکولهای پالسی توسط نرم‌افزار مزبور تولید شدند و داده‌های حاصل با آن آنالیز شد. مقاومت سری (مگااهم) 7.69-15.4، و پتانسیل holding نیز در حد ۶۰mV- بود.

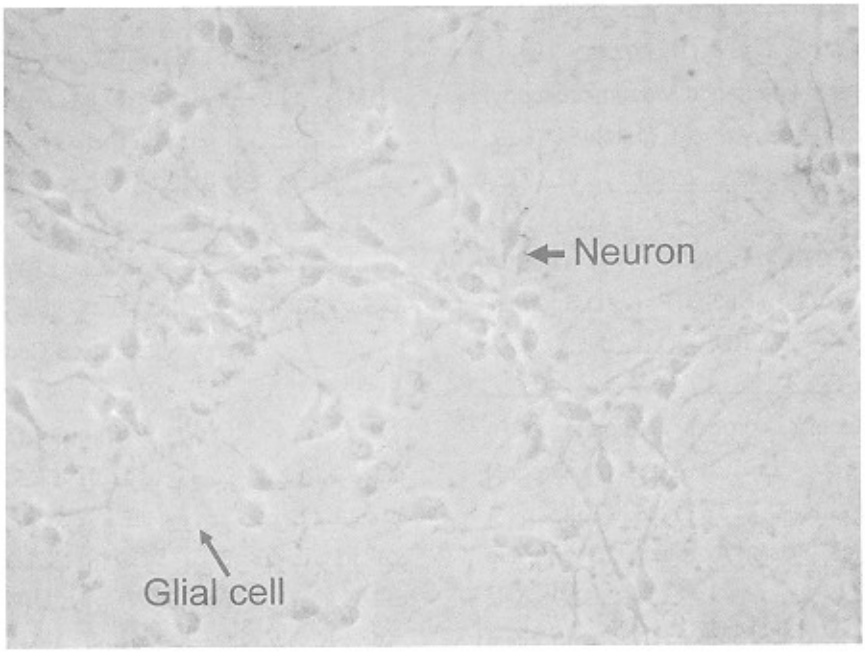
برای مطالعه وجود کانالهای کلسیمی از روش Power and Sah (۱۶) استفاده شد. بدین منظور با تهیه شرایط مذکور اندازه‌گیریهای فلورسنس تمام میدانها بر نورونها با استفاده از سیستم تصویری برداری بر اساس منوکروماتور (Polychrome II; T.I.L.L Photonics, Martinsried, Germany) انجام شد. نورونها با استفاده از یک عدسی شیی آبی (water immersion objective) ۶۰× numerical apperture, (۰/۹ Olympus optical روئیت شدند و در معرض نور با طول موج ۴۸۸nm قرار گرفتند. تصاویر با انتقال خطی in line transfer توسط دوربین (cooled CCD) (T.I.L.L photonics) به کامپیوتر منتقل شدند. در این دوربین قدرت تفکیک مکانی (resolution) به اندازه ۰/۳۳μm به ازای هر پیکسل بود. در ضمن در تهیه تصاویر، برای افزایش قدرت تفکیک زمانی (temporary resolution) و برای کاهش Photobleaching رنگ، زمان exposure ۱۰۰ میلی ثانیه به ازای هر فریم بود. به هنگام انتقالهای (transients) کلسیم در پاسخ به پتانسیلهای عمل؛ فریم‌ها با فرکانس ۳۳Hz تهیه شدند هر پتانسیل عمل با پالس جریان (current pulse) pA-۷۰۰ ۲۰۰ و به مدت ۱۰ میلی ثانیه اعمال شد (evoke). تصاویر به صورت offline و با استفاده از نرم افزار (T.I.L.L photonics) آنالیز شدند.

نواحی کوچک مربع شکلی (حدود ۱۰×۱۰ پیکسل) بر سوما و ناحیه نزدیک دندریت (proximal dendrite) انتخاب شده و مقدار فلورسنس این نواحی به طور متوسط اندازه‌گیری شد. تصاویر فلورسنسی confocal با استفاده از میکروسکوپ Zeiss Axioskop 2FS (Oberkichen, Germany) و با اسکن لیزر ۵۱۰ آرگون بدست آمد. مقدار قدرت تفکیک با این عمل ۱۰-۲۰ pixel/μm بود.

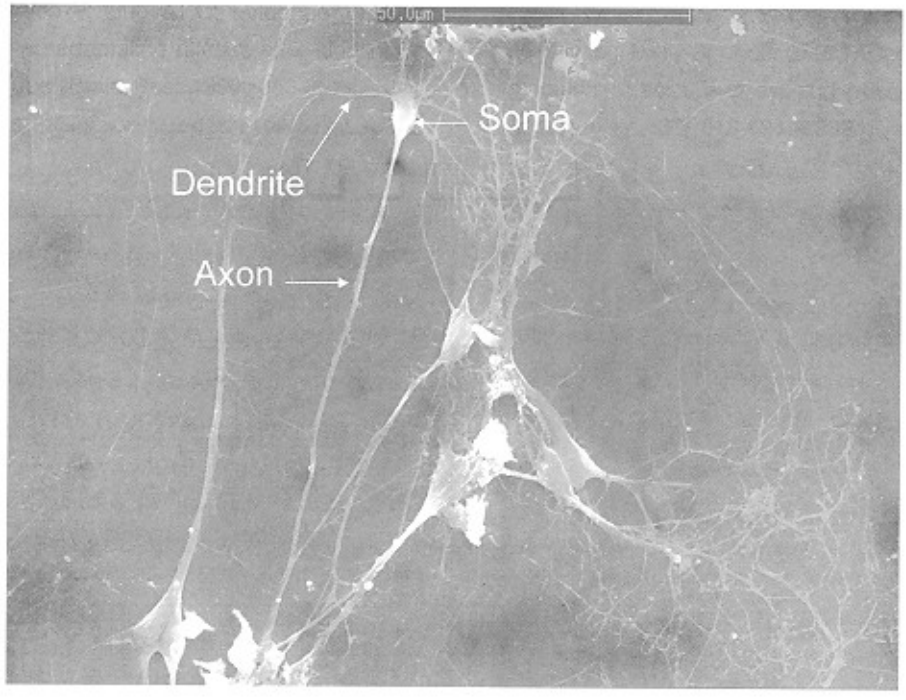
یافته‌ها

* تمایز نورونها

برای تولید سلولهای عصبی از سلولهای تمایز نیافته ES از روش Okabe و همکاران (۱۱) استفاده شد. اساس این روش بر تولید دودمان سلولهای عصبی به واسطه فاکتور رشد است. مراحل این روش عبارتند از: ۱ـ تولید سلولهایی که شامل سلولهای سه لایه زاینده جنینی (اکتودرم، مزودرم و اندودرم) است، ۲ـ تمایز انتخابی اکتودرم با حذف فاکتورهای رشد و یا به عبارتی حذف سرم از محیط کشت، ۳ـ تکثیر و نگهداری سلولهای پیشساز عصبی در حضور EGF، bFGF، ۴ـ القاء تمایز و حفظ نورونهای فعال و سلولهای گلیال با حذف bFGF/EGF و افزودن عوامل پیشبرنده تمایز و بقاء نورونی. لذا اجسام شبه جنینی (EB) در قطرات آویزان با تعداد ۲۰۰ سلول ES تهیه شدند زیرا معتقدند که تعداد اولیه سلولهای ES به ازای هر EB در تمایز نهایی بسیار مهم است. با کشت EB، در ظروف باکتریایی، EB بدون چسبیدن به کف ظرف، تمایز بیشتری می‌یابد. طی دو روز اول، EBکوچک و باکاره نامنظم است، اما تا روز چهارم EBها بزرگتر و مدورتر شدند و ظاهر سلولهای سطحی EB سالم بود. میکروسکوپ نوری نشان داد که اطراف EB را یک لایه سلول پهن احاطه کرده است.



شکل ۱: سلولهای عصبی و سلولهای گلیال تولید شده از سلولهای بنیادی جنینی
(تصویر رنگی: صفحه ۱۹۸)



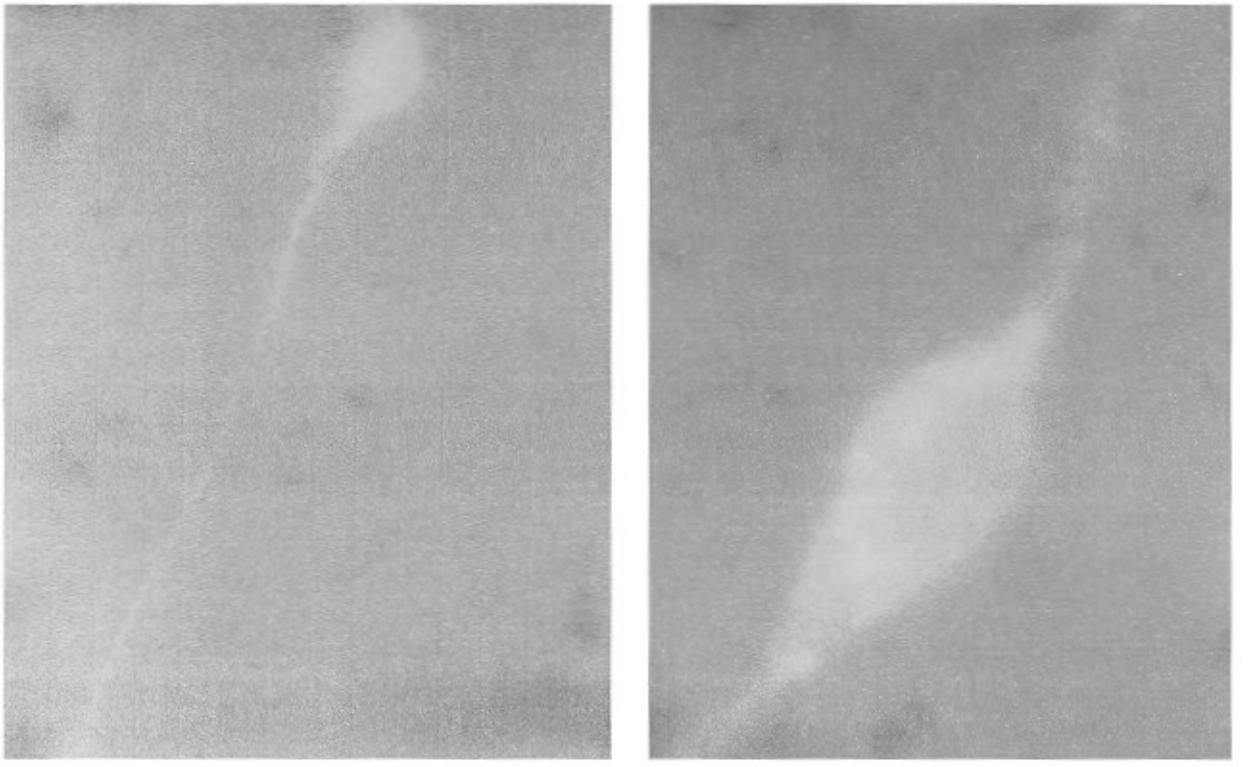
شکل ۲: تصویر سلول عصبی تمایز یافته با استفاده از میکروسکوب الکترونی نگاره (SEM)
(تصویر رنگی: صفحهٔ ۱۹۸)

به دنبال کشت EB در پلیتهای کشت سلولی، EB به کف ظرف چسبیده و سلولها شروع به مهاجرت از آن کردند. در این مدت محیط کشت فاقد سرم بود. لذا سلولهای اکتودرمی باقی مانده و سایر سلولها از بین می‌رود.

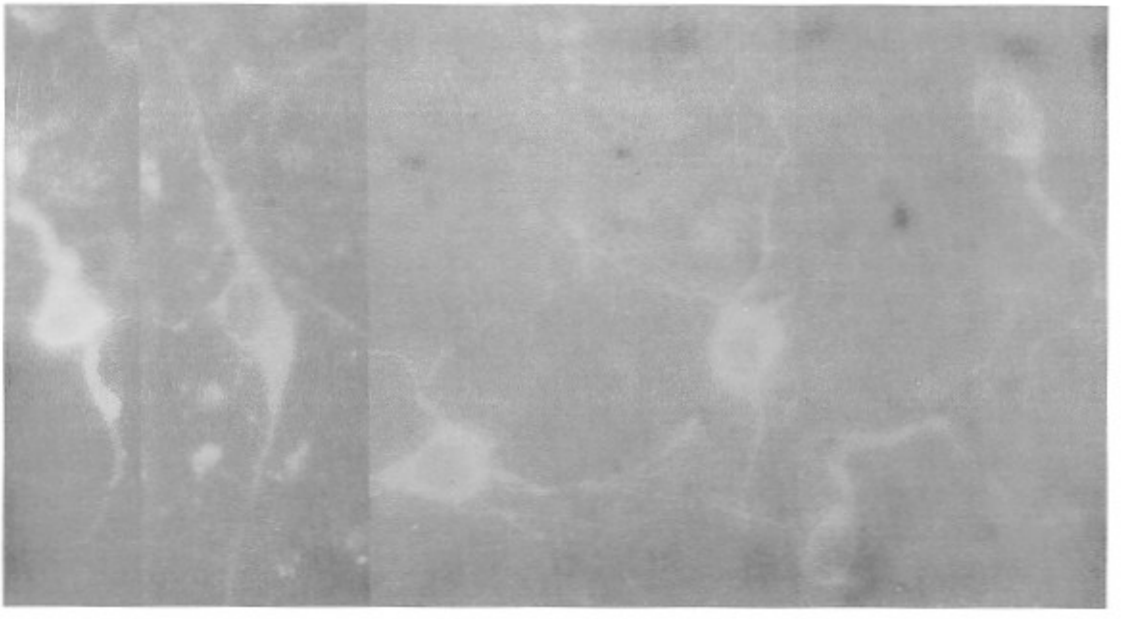
وجود سلولهای مرده در ظرف کشت، نشانگر رخداد مرگ سلولی در کشت EB بود. پس از پاساژ سلولهای حاصل از EB و کشت مجدد آنها در حضور bFGF/EGF، سلولهای پیشتاز عصبی ظاهر شدند فاکتورهای رشد مزبور سبب تکثیر سلولهای پیشساز عصبی می‌شوند.

کشت سلولهای پیشساز عصبی در محیط کشت Neurobasal به همراه B27 ۲درصد و FCS ۱۰درصد سبب بلوغ سلولهای مزبور شد (شکل ۱ و ۲). به طوری که مرفولوژی و مطالعه ایمونوهیستوشیمی سلولها نشان داد که سلولهای مزبور MAP/2 مثبت می‌باشند (شکل ۳). از طرفی مطالعه ایمونوهیستوشیمی نورونها با آنتی بادی علیه GAD و TH نشان داد که جمعیتی از نورونها مولد GABA (گاما آمینوبوتیریک اسید) و دوپامین هستند (شکل ۴ و ۵).

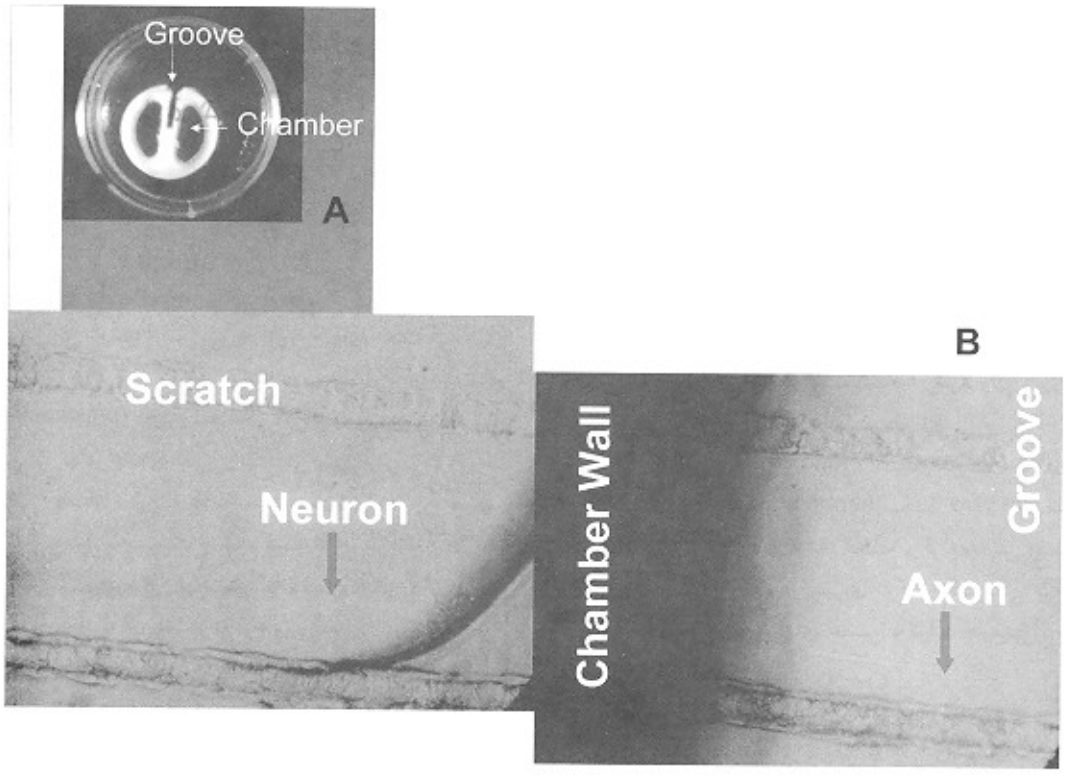
شکل ۳: سلولهای عصبی تولیدی رنگ‌آمیزی شده با آنتی بادی MAP-2
(تصویر رنگی: صفحهٔ ۱۹۸)



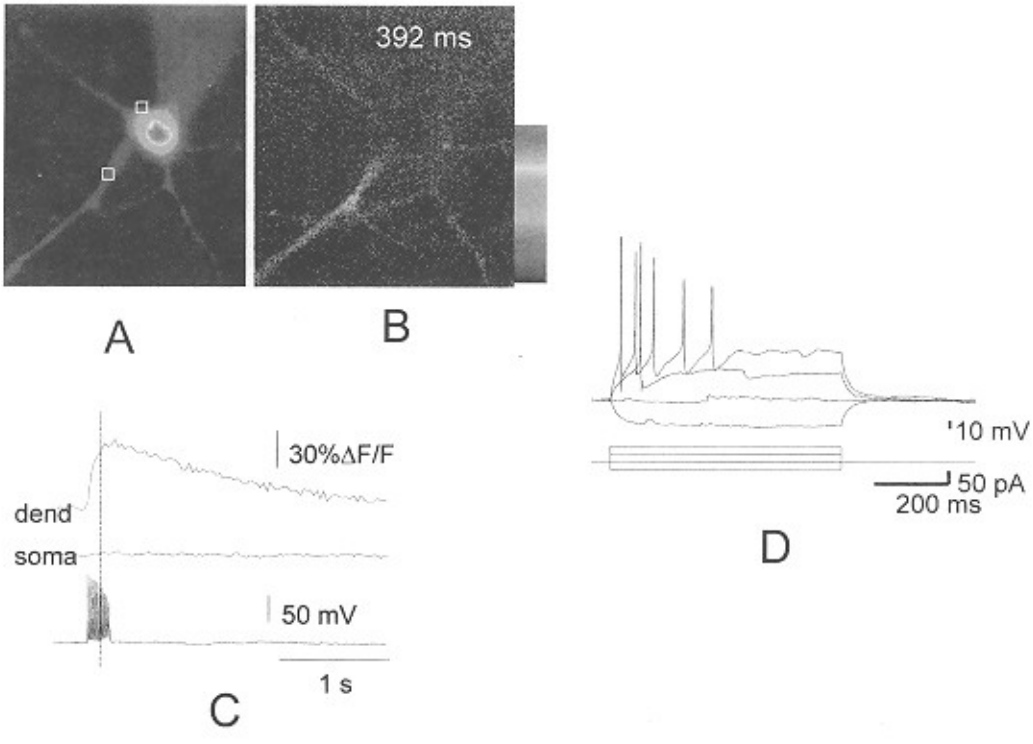
شکل ۴: سلولهای عصبی تولیدی رنگ‌آمیزی شده با آنتی بادی GAD
(تصویر رنگی: صفحهٔ ۱۹۹)



شکل ۵: سلولهای عصبی تولیدی رنگ‌آمیزی شده با آنتی بادی TH
(تصویر رنگی: صفحهٔ ۱۹۹)



شکل ۶: A) تصویر ظرف کامپنوت در کف پتری دیش. دقت شود که ظرف دارای دو اتاقک و یک شیار است. B) آکسون یک نورون از یک اتاقک به ظرف مقابل فرستاده شده است. آکسون در محل شیار ظرف کامپنوت دیده می‌شود و جسم سلولی در اتاقک ظرف است.
(تصویر رنگی: صفحهٔ ۲۰۰)



شکل ۷: تصویر فلورسنس یک سلول که با Oregon Green BAPTA-1، ۵۰μM رنگ شده است در A: علائم مربع شکل، نواحی است که میزان فلورسنس اندازه‌گیری شده است. هسته به صورت ناحیه روشن در سوما است. B: تصویر رنگی کاذب در جا به جایی یون Ca^{+2} طی یک پتانسیل عمل را نشان می‌دهد. دقت شود که افزایش کلسیم در دندریت وجود دارد و در سومانیست. C: افزایش یون کلسیم به صورت نموداری پس از تحریک. خط عمودی نشان دهنده زمانی است که در شکل B آمده است. D: پاسخ ولتاژی نسبت به یک سری از جریانهای اعمال شده با فواصل ۲۵pA.
(تصویر رنگی: صفحهٔ ۲۰۰)

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد: که سلولهای ES رویان B1 می‌توانند سلولهای پیشساز عصبی با قابلیت تقسیم، دارای توانایی بسط و تمایز و همچنین سلولهای گلیال و نورونهایی با قابلیت تشکیل سیناپس تولید کند. این مطالعه همانند مطالعات دیگران نشان داد که می‌توان از شرایط in vivo در محیط آزمایشگاهی تقلید کرد. با استفاده از روش Okabe و همکاران (۱۱) یعنی شرایط کشت بدون سرم و با فاکتورهای رشد به طور موثری سلولهای عصبی از سلولهای ES به دست می‌آیند.

با استفاده از این روش، جمعیتی زیاد از نورونها به دست می‌آید، به طوری که بیش از ۹۵درصد سلولها پیشساز نوروایپتلیالی در فاز تکثیر (proliferation phase) دارای نشانگر nestin هستند (۱۱). این نشانگر خاص سلولهای پیشتاز عصبی است. در ضمن بیش از ۶۰درصد سلولهای حاصل بعد از تمایز MAP-2 مثبت هستند (۱۱). این جمعیت بالای دودمانهای سلولی عصبی در سیستم کشت بدون سرم، امکان آنالیز بیوشیمیایی مکانیسم پیام‌رسانی از طریق گیرنده‌های فاکتورهای رشد و گیرنده‌های پیام میانجی‌های عصبی را فراهم می‌کند.

افزودن bFGF، سبب تحریک تکثیر سلولهای پیشتاز عصبی همانند سلولهای پیشتاز نوروایپتلیال CNS می‌شود (۱۷، ۱۸، ۱۹). با استفاده از روش کامینوت (۱۵) نشان داده شد که سلولهای عصبی حاصل از تمایز سلولهای ES رویان B1 مربوط به CNS (سیستم عصبی مرکزی) هستند. در واقع bFGF به تنهایی نمی‌تواند از سلولهای پیشساز PNS (سیستم عصبی محیطی) در محیط آزمایشگاهی حمایت نمایند (۲۰). تشابه تاثیر bFGF بر سلولهای پیشساز عصبی حاصل از ES رویان B1 و سلولهای اولیه CNS نشان می‌دهد که این دو دسته سلول با مکانیسمهای مشابهی به bFGF پاسخ می‌دهند. از طرفی مشخصات ایمنوهیستوشیمیایی نورونهای حاصل از رویان B1 نشان می‌دهد که سلولهای مزبور به CNS هستند به طوری که با آنتی GAD و آنتی TH مثبت هستند. شواهد غیر مستقیم برله این موضوع نیز توسط دیگران شده است (۱۰، ۱۱).

اندازه گیریهای الکتروفیزیولوژیک جریانهای یونی نشان داد که نورونهای حاصل پتانسیل عمل تولید می‌کنند، لذا به نظر می‌آید دارای کانالهایی یونی وابسته به سدیم و پتاسیم باشند. از طرفی نشان داده شد که نورونهای حاصل دارای کانالهای کلسیمی در استطاله‌های خود هستند. با استفاده از روشهای فارماکولوژیکی نیز وجود کانالهای کلسیمی در سلولهای نورون حاصل از سلولهای ES نیز گزارش شده است (۲۱).

گزارشات دیگری مبنی بر به کارگیری این روش در سلولهای ES انسانی و پریماتها جمعیت بالایی از سلولهای عصبی را در محیط کشت نهایی وجود دارد (۲۵-۲۲). در روشی دیگر، با به کارگیری رتینوئیک اسید برای القاء تمایز سلولهای عصبی در مرحله ساخت اجسام جنینی (EB)، مطرح است (۸، ۲۳، ۲۴). تفاوت بکارگیری رتینوئیک اسید و روش Okabe و همکاران (۱۱) در آن است که در روش دوم، درصد خلوص سلولهای گلیالی و عصبی بالاتر است در ضمن انتخاب سلولهای پیشساز عصبی در محیط کشت انجام می‌شود ولی در روش رتینوئیک اسید چنین انتخابی صورت نمی‌گیرد و تنها القاء انجام می‌شود.

در روشی دیگر Rathjen و همکارانش (۲۰۰۲) (۱۲) از شرایط جنین زایی (embryogenesis) محیط in-vivo تقلید کردند و از سلولهای ES، اکتودرم اولیه، صفحه و لوله عصبی را ساختند و به این ترتیب شرایطی را برای درک چگونگی تخصصی شدن (specification) سلولهای عصبی و تولید جمعیتهای خالص را فراهم نمودند.

مجموع نتایج حاصل نشان داد که نورونهای تولیدی از سلولهای ES رویان B1، مشخصات نورونهای فعال را دارند به طوری که از نظر مورفولوژی دارای دندریتها و آکسون بوده و از سویی دارای پروتئینهای اسکلتی نورونی نظیر MAP2 هستند. ثانیاً میانجی‌های عصبی و کانالهای یونی (Ca2+, K+, Na+) را بیان می‌کنند و بین آنها، سیناپسهای فعالی وجود دارد.

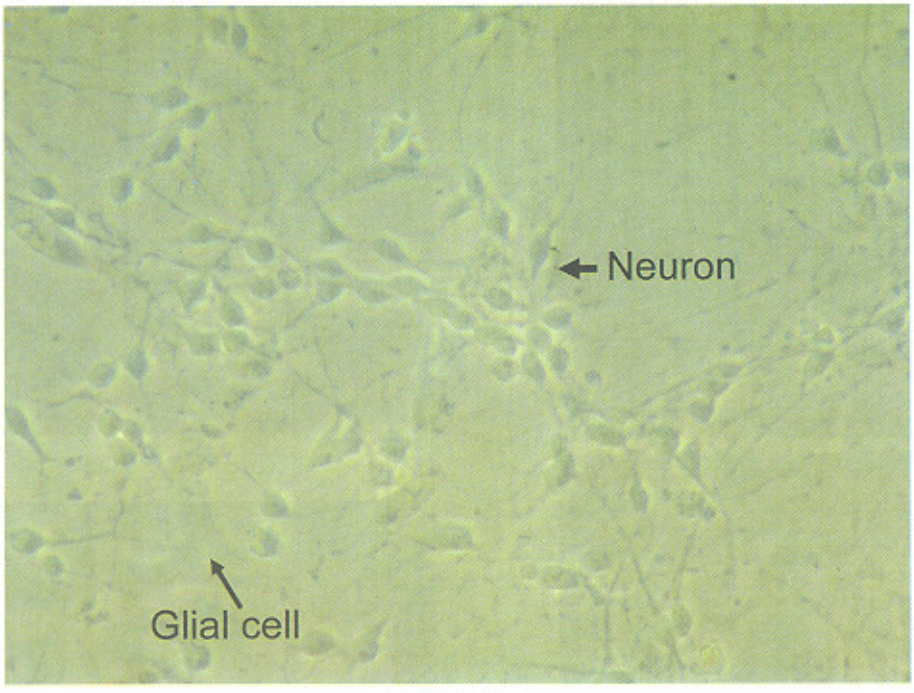
مجموع مطالعات در این زمینه از یک سو مدل آزمایشگاهی مناسبی را برای مطالعه تکوین و تجلی ژنهای سیستم عصبی در محیط آزمایشگاهی فراهم می‌کند و از سوی دیگر احتمالاً شرایطی را برای حصول سلولهای عصبی قابل پیوند به فرد آسیب دیده را ایجاد می‌نماید.

داده‌های موجود نشان می‌دهد که می‌توان از تکوین CNS در محیط in vitro تقلید کرد و به طور کارآمد، آن را در محیط آزمایشگاهی تجزیه و تحلیل نمود و سلولهای ES رویان B1 دارای چنین توانایی هستند. حتی با استفاده از جهش در سلولهای ES می‌توان نقش ژن مورد نظر را در تمایز عصبی مورد ارزیابی قرار داد.

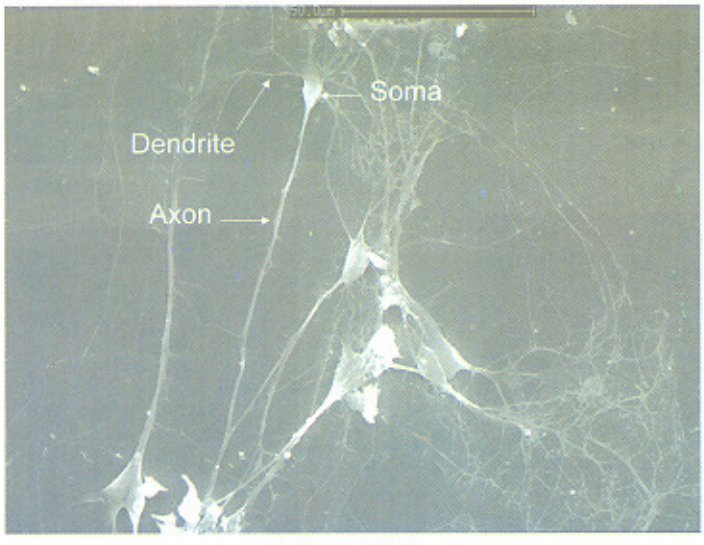
References

1. McKay RDG: The origins of cellular diversity in the mammalian. Cell; 1995; 58: 815-821
2. Luskin MB: Neuronal cell lineage in the vertebrate central nervous system. FASEB J 1994; 8: 722-730
3. Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from ealry mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci. US, 1981; 78: 7634-7638
4. Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-156
5. Suda Y, Suzuki M, Ikawa Y, Aixawa S, et al: Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential. J Cell physiol, 1987; 133: 197-201
6. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E: Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature 1984; 309: 255-256
7. Gossler A, Joyner AL, Rossant J, Skarnes WC: Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to

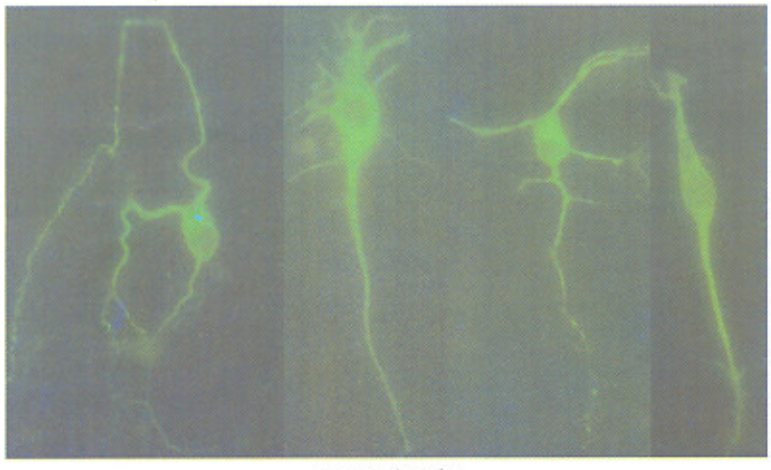
defect developmently regulated genes. Science 1989; 244: 463-465
8. Beddington RS and Smith JC: Control of vertebrate gastrulation: Inducing signals and responding genes. Curr Opin Genet Dev, 1993; 3: 655-661
9. Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J: In vitro diferrent of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. J cell science, 1995; 108: 3181-3188
10. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huttner JE, Gottlieb DI: Embryonic stem cells express neuronal proportions in vitro. Develop Biol 1995; 168: 342-357
11. Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, Mckay RDG: Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. Mech Develop 1996; 59: 89-102
12. Rathjen J, Haines BP, Hadson KM, Nesci A, Dunn S, Rothjen PD: Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: Homogeneous formation and differentiation of a neurectoderm formation and defferent of a neurectoderm population. Develop 2002; 129: 2649-61
۱۳) حسین بهاروند، کلاس ماتایی، تولید رده جدید سلولهای جنین از موش نژاد C57BL/6، مجله پزشکی کوثر، در دست چاپ
14. Rolletschek A, Chang IT, Guan K, Czyz J, Meyer M Wobus AM: Diferentiation of embryonic stem cell-drived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promotiny factors. Mech Develop 2001; 105: 93-104
15. Campenot RB: Independent control of the local environment of somas and neurites. In "Methods in Enzymology", (WB Joakoby and IH pastan, eds), 1979; 28: 302-307 Academic Press, New York
16. Power J, Sah P: Nuclear calcium signaling evoked by cholinergic stimulation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Neurosci, 2002; 22: 3454-3462
17. Ghosh A, Greenbery ME: Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. Neuron, 1995; 15: 89-103
18. Ray J, Peterson DA, Schinstine M, Gage FH: Proliferation, differentiation and long-term cultureofprimary hippocampal neurons. Proc Natl Acad Scc: 1993; 90: 3602-3606
19. Vicario-Abejon C, Johe KK, Hazel TG, Collazo D, Mckay RDG: Functions of basic-fibroblast growth factor and neurotrphins in the differentiation of hippocompal neurons. Neuron, 1995; 105-114
20. Stemple DL, Anderson DJ: Isolations of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. Cell 1992; 71, 973-985
21. Strubing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM: Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. Mech Develop. 53, 1995; 275-287
22. Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi M, Yoshikawa K, Nishikawa S, Nakasuji N, Sasai Y: Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity Proc. Natl Acad Sci USA, 2002; 99: 1580-1585
23. Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS: Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. Exp Neurol, 2001; 172: 383-397
24. Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Istkovits-Eldor J, Goldstein RS, Benvenisty N: Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. Brain Res. 2001; 913: 201-205
25. Westmoreland JJ, Hancock CR, Condie BG: neuronal development of embryonic stem cells: a model of GABAergic neuron differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun, 2001; 284: 674-680



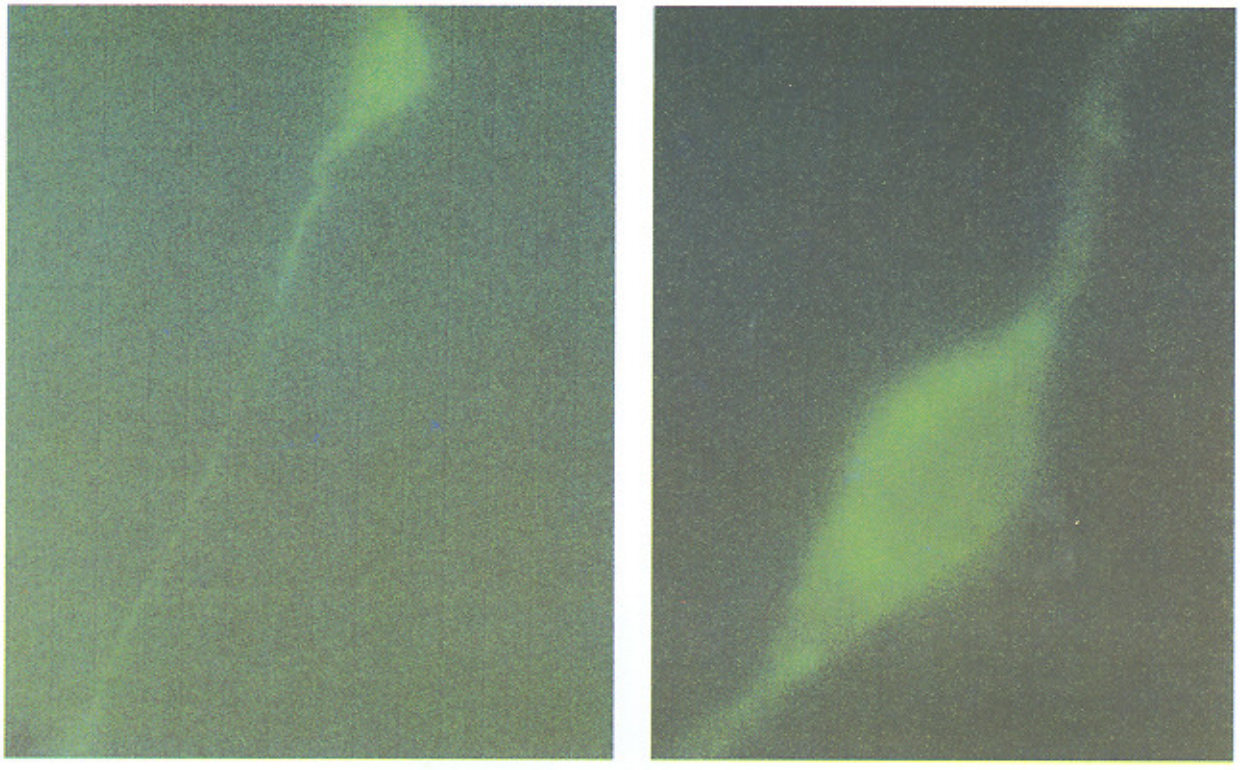
شکل ۱ (صفحهٔ ۱۵۸)



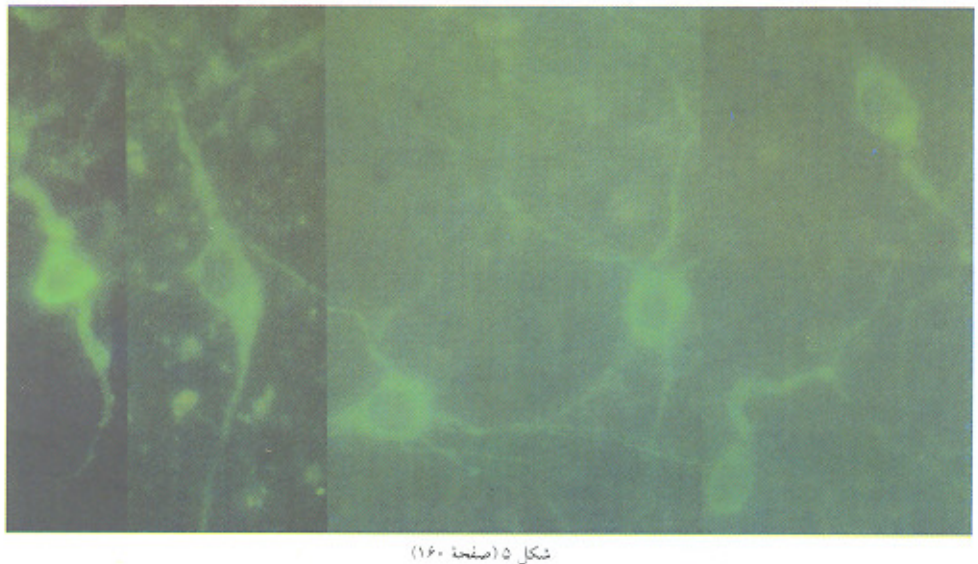
شکل ۲ (صفحهٔ ۱۵۹)



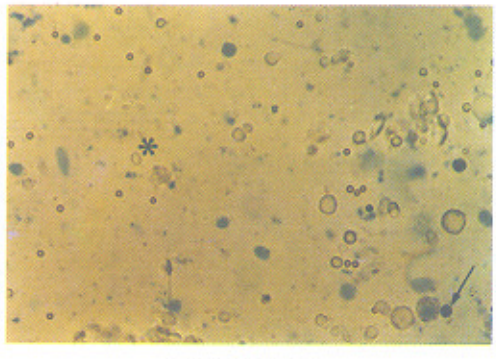
شکل ۳ (صفحهٔ ۱۵۹)



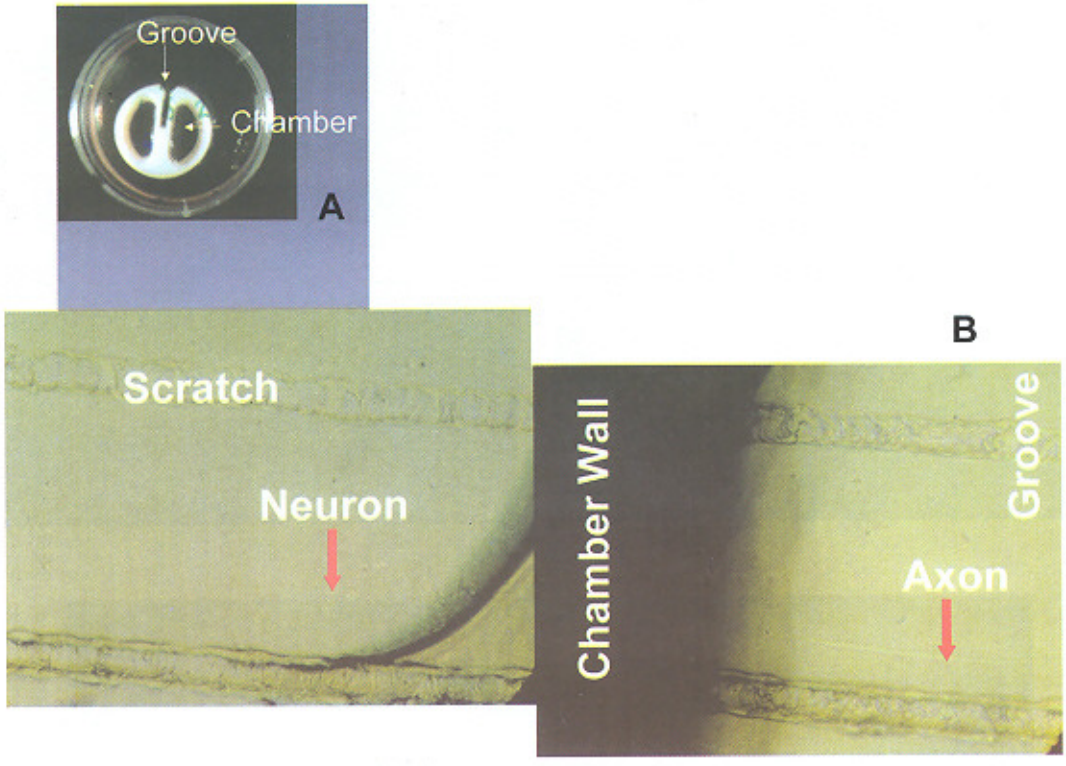
شکل ۴ (صفحهٔ ۱۶۰)



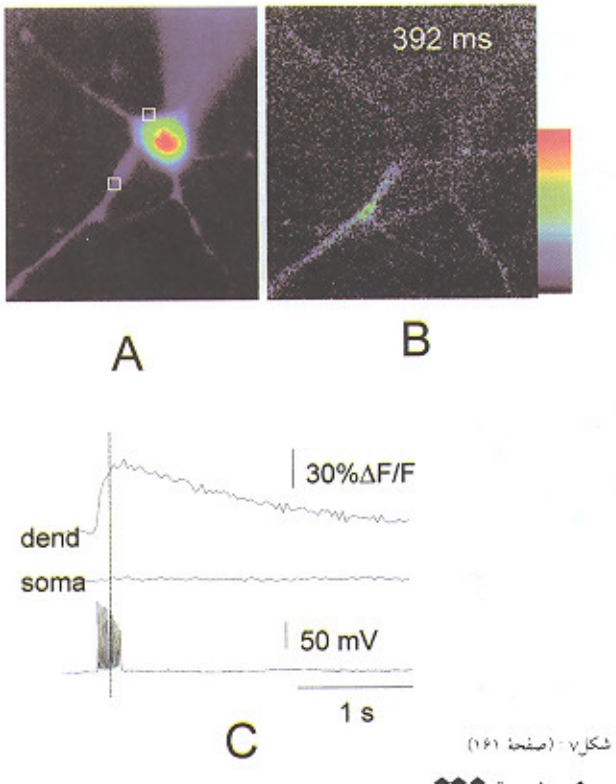
شکل ۵ (صفحهٔ ۱۶۰)



شکل ۲ (صفحهٔ ۱۸۷)



شکل ۶: (صفحهٔ ۱۶۱)



شکل ۷: (صفحهٔ ۱۶۱)