

## بررسی نقش مایع مغزی نخاعی جنین رت در تمایز و تکوین سلول‌های عصبی از رده سلولی pheochromocytoma (سلول‌های PC12)

محمد نبیونی<sup>۱</sup>، کاظم پریور<sup>۲</sup>، هما محسنی کوچصفهانی<sup>۱</sup>، جواد رسولی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم

<sup>۲</sup> استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم و تحقیقات

<sup>۳</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم

### چکیده

**سابقه و هدف:** مایع مغزی-نخاعی (CSF) حاوی فاکتورهای رشد و نوروتروفیک متعددی می‌باشد که آن را به عنوان عامل تنظیم کننده *neurogenesis* و تکثیر سلولی مطرح می‌سازد. سلول‌های PC12 که به عنوان مدل تمایز نورونی در *invitro* استفاده می‌گردند، در پاسخ به *NGF*، *FGF*، *EGF* و *GDNF* به نرون‌های شبه سمپاتیک تمایز می‌یابند.

**روش بررسی:** CSF از ناحیه *Cisterna magna* جنین‌های *rat* (بین روزهای ۱۷ تا ۲۰) گرفته شد. سلول‌های PC12 در محیط RPM-1640 با FBS ۱۰ درصد کشت شدند. توانایی حیات و تکثیر سلولی توسط تست *MTT* اندازه‌گیری شد. بیان مارکرهای تمایز عصبی (*MAP-2* و  $\beta$ -III tubulin) توسط ایمونوسیتوشیمی بررسی شد.

**یافته‌ها:** پروتئین‌های *MAP-2* و  $\beta$ -III tubulin در گروه‌های حاوی CSF جنینی *E17* و *E19* بیان شدند، در حالی که در گروه کنترل بیان نشدند. توانایی حیات و تکثیر سلولی به طور معنی‌داری در سلول‌های کشت شده در محیط حاوی CSF جنینی *E18* در مقایسه با سلول‌های محیط کنترل افزایش یافت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق در راستای مطالعات قبلی می‌باشد که نقش فاکتورهای نوروتروفیک CSF را در تمایز نورونی آشکار می‌سازد. ما در این تحقیق، تمایز عصبی سلول‌های PC12 به القای CSF را به محتوای آن به ویژه فاکتورهای رشد آن نسبت می‌دهیم. **واژگان کلیدی:** مایع مغزی نخاعی، سلول‌های PC12، تمایز نورونی.

### مقدمه

مایع مغزی-نخاعی (Cerebrospinal Fluid: CSF) به طور عمده توسط شبکه کوروئید که یک ساختار اپی تلیالی با عروق فراوان می‌باشد، ترشح می‌گردد. این مایع که از مراحل اولیه رشدونمو لوله عصبی تا مغز بالغ در سیستم عصبی به شکل دائمی ترشح می‌گردد، فضای داخلی مغز (بطن‌های چهار گانه) و فضای اطراف سیستم عصبی (فضای زیرعنبوتیه‌ای) را

پر می‌نماید (۱). با توجه به اینکه مغز فاقد سیستم لنفاتیکی می‌باشد (۲)، مطالعات ابتدایی فقط مایع مغزی-نخاعی را به عنوان جایگزینی برای این سیستم مطرح می‌نمود و بیشتر این بررسی‌ها با تأکید بر نقش مایع مغزی-نخاعی در سیستم عصبی از جنبه‌های مکانیکی و حفاظتی صورت می‌گرفت (۳). این در حالی است که مطالعات اخیر در این زمینه به شکل بارزی بر تغییرات و نقش مایع مغزی-نخاعی طی روند تکوین و رشد ونمو سیستم عصبی تأکید می‌نمایند (۴). از جمله این مطالعات می‌توان به نتایج حاصله از بررسی‌های *in vitro* اشاره نمود که به خوبی نشان می‌دهند مایع مغزی-نخاعی جنینی به عنوان یک مایع غنی از پروتئین در تکثیر، تمایز و مهاجرت

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت معلم، دانشکده علوم پایه، دکتر محمد نبیونی

(email: nabiyuni@tmu.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۷/۱۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱/۲۷

نخاعی در تکثیر و تمایز نورونی سلول های PC12، بر نقش این مایع فیزیولوژیک در تمایز نورونی تاکید گردد، زیرا که مقالات و مطالعات در این زمینه و به ویژه در زمینه تمایز نورونی در سیستم عصبی (*in vivo*) و همچنین در محیط *in vitro* کم و محدود می باشند. در این تحقیق سعی شده با بررسی توان تمایزی مایع مغزی- نخاعی در این سلول ها مدلی مناسب جهت مطالعات تمایزی در محیط *in vitro* فراهم گردد. ما امیدواریم که این بررسی بتواند به ادامه مسیر بحث نقش رشدونموی مایع مغزی- نخاعی جنینی در تمایز عصبی سیستم عصبی کمک نماید.

### مواد و روشها

جمع آوری مایع مغزی- نخاعی از جنین های Rat در روزهای جنینی مشخص (E17-E20) صورت گرفت. مایع مغزی- نخاعی توسط پیپت پاستور از ناحیه *cisterna magna* این جنین ها جمع آوری گردید. مقادیر جمع آوری شده از این مایع به داخل میکروتیوب های استریل منتقل شد و پس از سانتریفوژ نمودن با دور ۱۴۰۰۰ rpm مایع رویی به دمای ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید. از هر جنین بسته به سن آن با این روش می توان به طور متوسط حدود ۵۰-۵ میکرولیتر نمونه مایع مغزی- نخاعی جمع آوری نمود. به منظور جمع آوری نمونه های مایع مغزی- نخاعی جنینی، از حدود ۱۰۰ رت مادر حامله استفاده گردید. در ادامه تحقیق، به منظور کشت سلول ها از نسبت های ۷، ۱۰ و ۲۵ درصد (v/v) مایع مغزی- نخاعی جنینی نسبت به محیط کشت استفاده گردید. دلیل استفاده از این نسبت های متفاوت، تعیین نسبت موثر مایع مغزی- نخاعی در تمایز و تکثیر این سلول ها می باشد و دلیل دیگر اینکه این نسبت ها بر حسب مطالعات قبلی که بر روی مایع مغزی- نخاعی انجام شده بود، انتخاب گردید. برای اندازه گیری محتوی پروتئین کل نمونه های مایع مغزی- نخاعی جنینی رت از روش بردفورد که یکی از دقیق ترین روش های اندازه گیری میزان پروتئین می باشد استفاده شد. در روش بردفورد از رنگ کوماسی برلیانت بلو G-250 استفاده می شود. اتصال رنگ به پروتئین موجب می شود که ماکزیم جذب از ۴۶۵ نانومتر (رنگ قرمز) به ۵۹۵ نانومتر (رنگ آبی) تغییر یابد.

ابتدا برای رسم نمودار استاندارد بردفورد، محلول هایی پروتئینی با غلظت های ۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر تهیه شدند. در این مطالعه از Bovine

سلول های پیش ساز عصبی طی فرایند رشدونمو مغز نقش پررنگی را ایفا می نماید (۵). قابل ذکر است که مطالعات صورت گرفته بر روی رت های Hydrocephalus Texas (H-TX) اثبات می نماید که محتویات مایع مغزی- نخاعی می تواند خود به تنهایی عامل توقف رشدونمو سیستم عصبی گردد که این فرایند از طریق متوقف شدن تقسیم سلولی در مغز صورت می گیرد (۸-۶).

مقادیر بالایی از برخی پروتئین ها توسط شبکه کوروئید ساخته و به داخل مایع مغزی- نخاعی جنینی ترشح می گردند که از آن جمله می توان به فاکتورهای رشدی همچون nerve growth factor (TGF- $\beta$ )، transforming growth factor (NGF)، insulin growth factor (IGF)، brain derived neurotrophic factor (BDNF) (۱۱-۹). با توجه به مقادیر بالای این فاکتورهای رشد در مایع مغزی- نخاعی جنینی و تغییرات معنی دار میزان این پروتئین ها در روزهای حساس رشد و نمو مغز، به عنوان مثال طی روزهایی که به عنوان دوره زمانی نورونزئیس (E17 و E18) شناخته می شوند، نقش رشد ونموی مایع مغزی- نخاعی را به حضور و عملکرد این فاکتورها نسبت می دهند (۶). سلول های PC12 با منشا تومور فوق کلیوی Pheochromocytoma می باشند (۱۲)، و تحت تاثیر برخی فاکتورهای رشد اعم از EGF، b-FGF، NGF، TGF- $\alpha$  و GDNF (۱۶-۱۳) توانایی تمایز به نورون های شبه سمپاتیک را دارا می باشند. این خصوصیات منحصر به فرد سلول های PC12 است که آنها را به عنوان مدلی مناسب برای بررسی تمایز نورونی و همچنین بیماری های مرتبط با نقص در سیستم عصبی مطرح می سازد. با توجه به این نکته که نقش و عملکرد مایع مغزی- نخاعی جنینی در طی فرایند تکوین و رشد و نمو سیستم عصبی هنوز به شکل دقیق و کامل بررسی نگردیده است و از طرفی مطالعات *in vitro* معدودی در زمینه تمایز نورونی و حتی تمایز عصبی صورت گرفته است، در این تحقیق توان تمایزی مایع مغزی- نخاعی روزهای مختلف از جنین های rat نژاد ویستار بر روی رده سلولی PC12 بررسی و همچنین مقایسه ای بین رفتار تکثیری و میزان بقای این سلول ها تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی روزهای مختلف انجام گردید.

با توجه بررسی های انجام شده در زمینه نقش رشدونموی مایع مغزی- نخاعی در دهه اخیر می توان عنوان نمود که این مطالعات بر نقش فاکتورهای رشد و نوروتروفیک آن در رشد نمو سیستم عصبی تاکید دارند. در این تحقیق سعی شده است که با تایید نقش این فاکتورهای حیاتی در مایع مغزی-

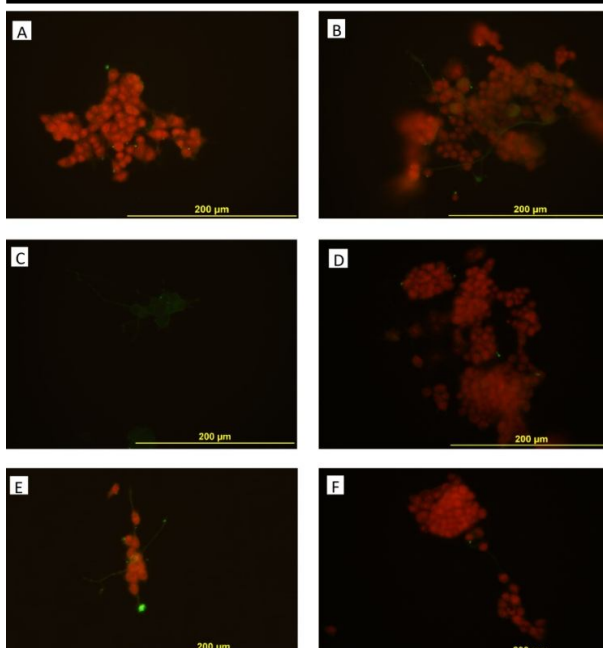
سلول‌های PC12 کشت شده در پلیت‌های ۲۴ خانه حاوی پلی‌دی‌لازین (Merck) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰X مورد بررسی قرار گرفتند. طول بزرگ‌ترین استتاله‌های عصبی در هر سلول PC12 اندازه‌گیری شد، به نحوی که استتاله‌های عصبی که هم اندازه یا بزرگ‌تر از قطر سلول‌های PC12 بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه‌گیری طول زوائد عصبی در این سلول‌ها توسط نرم افزار Image J 1.43u صورت گرفت. نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری طول استتاله‌های نورونی به روش One-way ANOVA بررسی گردید.

ارزیابی میزان بقای سلولی (viability assay)، رده سلولی PC12 تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی روزهای مختلف جنینی به روش MTT صورت گرفت. طی این روش، پس از تاثیر مایع مغزی- نخاعی جنینی (E17-E20) محیط کشت القایی توسط محیط کشت حاوی ۱۰ درصد محلول MTT-5% جایگزین شد. پس از اضافه نمودن این ماده سلول‌های زنده (3-MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) را به فوماراز که رنگ آبی تولید می‌نماید تبدیل می‌کنند. بعد از حدود ۳ ساعت به سلول‌ها محلول ایزوپروپیل حاوی HCl (0.04N) اضافه گردید و بعد از گذشت ۱۸-۴ ساعت جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (Milton Roy Spectronic 21D) با طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مانند روش اندازه‌گیری محتوی کل پروتئین، ابتدا جذب دستگاه توسط نمونه Blank صفر شد، سپس جذب کووت نمونه‌ای حاوی رنگ فورمازان سنجیده شد. سپس نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری میزان کاهش ماده MTT به روش آماری Kruskal-Wallis بررسی گردید.

بررسی بیان مارکرهای عصبی MAP-2 و  $\beta$ -III tubulin در سلول‌های PC12 به روش ایمنوسیتوشیمی (Immunocytochemistry) انجام شد. سلول‌ها پس از سه بار شستشو با PBS (هر بار به مدت ۵ دقیقه) توسط پارافرم آلدئید ۴ درصد فیکس شدند، پس از ۱۵ دقیقه سلول‌های فیکس شده ۳ مرتبه توسط TPBS شستشو شدند. در مرحله بعد به منظور نفوذپذیر شدن به مدت ۳۰ دقیقه با Triton X-100 در دمای اتاق آنکوباسیون صورت گرفت. سپس ۳ بار شستشوی ۵ دقیقه‌ای توسط TPBS انجام شد که پس از آن ۴۵ دقیقه بلوکه شدن توسط BSA صورت گرفت. سلول‌ها طی طول شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی اولیه مونوکلونال (mouse anti-MAP-2, mouse anti- $\beta$ -III tubulin- Abcam) آنکوبه شدند. در نهایت، سلول‌ها پس از سه مرحله شستشو با TPBS (Tween 20- PBS) به مدت یک

Serum Albumin (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. سپس در لوله‌های آزمایش ۵ میلی‌لیتر معرف بردفورد [Coomassie Brilliant Blue G-250(Merck) ۰/۰۱٪، اتانول ۹۵٪، ۱۰٪ اسید فسفریک ۰/۸۵٪] ریخته شد و به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد BSA (Sigma) تهیه شده اضافه گردید. پس از طی مدت زمان ۵-۶ دقیقه نمونه‌های تهیه شده را در کووت‌های شیشه‌ای ریخته و پس از صفر نمودن دستگاه اسپکتروفتومتر توسط نمونه Blank (در این تحقیق از آب مقطر استفاده گردید) جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر سنجیده شد. با استفاده از جذب‌های به دست آمده از غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم BSA در میلی‌لیتر منحنی استاندارد رسم گردید. برای تعیین مقدار پروتئین مایع مغزی- نخاعی مورد نظر، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع مغزی- نخاعی به ۵ میلی‌لیتر معرف بردفورد اضافه شد و پس از صفر نمودن اسپکتروفتومتر توسط نمونه Blank جذب کووت‌های حاوی محلول بردفورد و مایع مغزی- نخاعی سنجیده شد. با توجه به جذب محلول بدست آمده در ۵۹۵ نانومتر و منحنی استاندارد، غلظت پروتئین در مایع مغزی- نخاعی محاسبه گردید. نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری محتوی کل پروتئین در این تحقیق به روش آماری Kruskal-Wallis بررسی گردید.

رده سلولی PC12، سلول‌هایی گرد با قطر حدود ۱۴-۶ میکرومتر با doubling time ۴۸ ساعت می‌باشند و چسبندگی به سطح در این رده سلولی ضعیف است. این سلول‌ها در محیط RPMI-1640 همراه با Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco- invitrogen, UK) به نسبت ۱۰٪ محیط کشت، پنی- سیلین به میزان ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر و استرپتومایسین به ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (Gibco- invitrogen, UK) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO<sub>2</sub> ۵٪ کشت داده شدند. برای بررسی میزان بقای سلولی و القای تمایز، سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای حاوی پلی‌دی‌لازین با تعداد ۴۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت تعویض محیط کشت انجام شد، بدین نحو که محیط کشت قبلی با محیط القایی حاوی FBS ۱ درصد و مایع مغزی- نخاعی روزهای جنینی مختلف به نسبت‌های ۷، ۱۰ و ۲۵ درصد به سلول‌ها اضافه گردید. برای بررسی ایمنوسیتوشیمیایی سلول‌ها به مدت یک هفته تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی روزهای جنینی E17-E20 قرار گرفتند. لازم به ذکر است که از (Sigma) b-FGF (10ng/ml) برای تمایز نمونه‌های کنترل مثبت استفاده گردید.



**شکل ۲-** بیان مارکر عصبی MAP-2 توسط سلول های PC12 (A). نمونه کنترل (B) سلول های تیمار شده با b-FGF (10ng/ml) (C). مایع مغزی - نخاعی E17 (D)، مایع مغزی - نخاعی E18 (E)، مایع مغزی - نخاعی E19 (F) و مایع مغزی - نخاعی E20. بیان مارکر عصبی در این سلول ها تحت تاثیر مایع مغزی - نخاعی E17 و E19 قابل مشاهده می باشد در حالی که نمونه کنترل و همچنین سلول های تیمار شده با مایع مغزی - نخاعی E18 و E20 بیان مارکر را نشان نمی دهند. تحت تاثیر b-FGF به عنوان نمونه کنترل مثبت سلول ها میزان بیشتری از بیان این پروتئین را نشان می دهند.

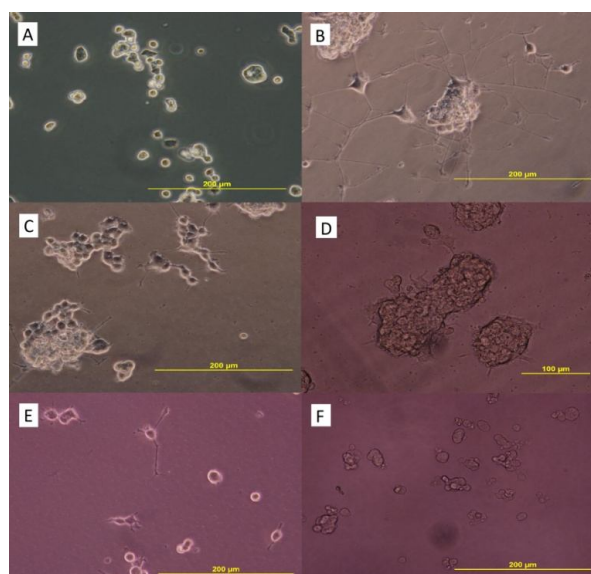
این سلول ها در معرض فاکتور رشد b-FGF همراه با سایر گروه های آزمایشی به مدت یک هفته قرار گرفتند که از این سلول های تمایز یافته به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. از طرف دیگر نتایج بررسی ایمنوسیتوشیمیایی مارکرهای عصبی MAP-2 و  $\beta$ -III tubulin داده های بدست آمده از تغییرات مورفولوژیکی را قویا تایید می نمایند، بدین نحو که این سلول ها تحت تاثیر مایع مغزی - نخاعی E17 و E19 مارکرهای فوق الذکر را که برای تمایز عصبی اختصاصی می باشند، به نحو بارزی بیان می کنند، هر چند که میزان تمایز و همچنین طول زوائد عصبی در این گروه ها با نسبت کمتری در مقایسه با سلول های تیمار شده با b-FGF مشاهده گردید (شکل ۲ و ۳).

طول استتاله ها در سلول های تیمار شده با مایع مغزی - نخاعی روزهای E17 و E19 افزایش معنی داری نسبت به نمونه های کنترل را نشان داد. این در حالی است که سلول های کشت داده شده در مجاورت مایع مغزی - نخاعی روزهای E18 و E20 تفاوت چندانی را با نمونه های کنترل نشان ندادند (شکل ۴). همان طور که در بالا ذکر شد، نمونه هایی که با b-FGF تمایز یافته اند، میزان

ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد همراه با آنتی بادی ثانویه (Sigma) (goat anti-mouse) کنژوگه شده با FITC انکوبه شدند. در آخر، سلول ها با اضافه کردن رنگ (Propidium Iodide) به منظور رنگ آمیزی هسته، توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی و عکس برداری گردیدند. برحسب نوع داده ها، از آزمون های آماری One-way ANOVA و Kruskal-Wallis استفاده شد. کلیه محاسبات آماری توسط نرم افزار Instat3 انجام شد.

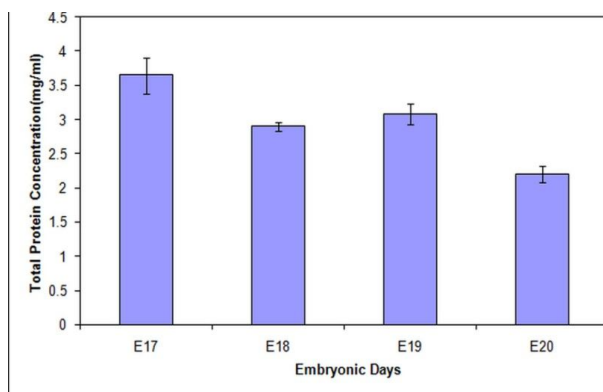
## یافته ها

در این مطالعه، سلول ها پس از اینکه به مدت یک هفته در معرض مایع مغزی - نخاعی روزهای مختلف جنینی قرار گرفتند، استتاله های عصبی از روز ۳ تیمار توسط مایع مغزی - نخاعی قابل مشاهده بودند. بررسی های مورفولوژیکی توسط میکروسکوپ فاز متضاد انجام شد که نتایج حاصل از این مشاهدات اولیه، تمایز ظاهری آشکار گروه های تحت تاثیر مایع مغزی - نخاعی روزهای جنینی E17 و E19 را در مقایسه با نمونه های کنترل نشان می دهند (شکل ۱).



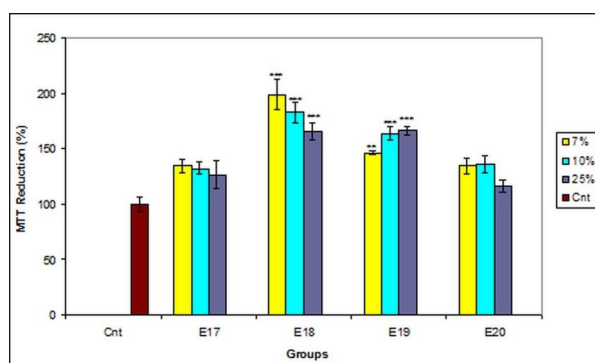
**شکل ۱-** بررسی تمایز نورونی توسط میکروسکوپ فاز متضاد (بزرگ نمایی 400X). (A) نمونه کنترل (B) نمونه های تیمار شده با b-FGF (10ng/ml) (C) مایع مغزی - نخاعی E17 (D) مایع مغزی - نخاعی E18 (E) مایع مغزی - نخاعی E19 (F) مایع مغزی - نخاعی E20. سلول های PC12 تحت تاثیر مایع مغزی - نخاعی E17 و E19 تمایز نورونی را نشان می دهند در حالی که تحت تاثیر E18 و E20 تغییر ظاهری نشان نمی دهند. این سلول ها تحت تاثیر b-FGF به عنوان نمونه کنترل مثبت میزان استتاله بیشتری نسبت به سایر گروه ها را نشان می دهند.

اندازه‌گیری میزان محتوی پروتئین کل مایع مغزی- نخاعی جنینی (E17-E20) نشان داد که میزان محتوی پروتئین کل در نمونه‌های مایع مغزی- نخاعی روزهای E17 و E19 (روزهایی که تمایز نورونی را در این سلول‌ها القا می‌نمایند) بیشتر از E18 و E20 می‌باشد (شکل ۵).



شکل ۵- نتایج تغییرات محتوی پروتئین کل مایع مغزی- نخاعی جنینی در روزهای متفاوت جنینی رت نژاد ویستار ( $P < 0.05$ ), ( $P < 0.01$ ) و ( $P < 0.001$ ).

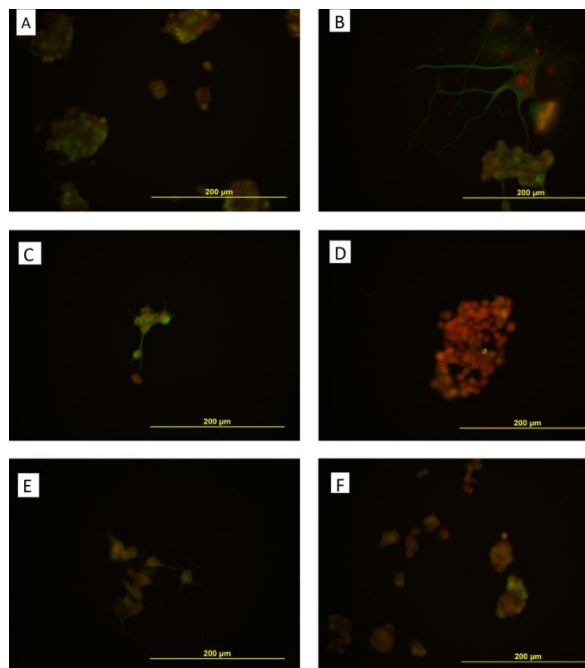
نتایج حاصل از بررسی بقای سلول‌های PC12 تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی روزهای متوالی جنینی نشان داد که بقای سلولی در نمونه‌های تیمار شده با مایع مغزی- نخاعی E18 افزایش معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها دارد (شکل ۶).



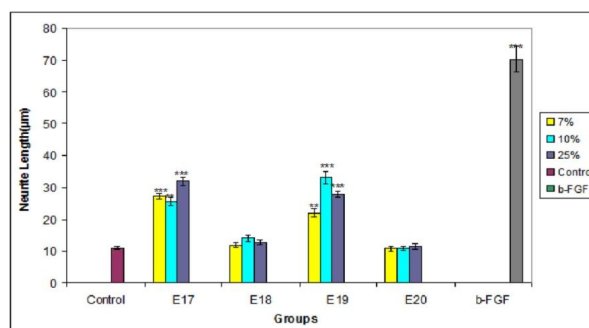
شکل ۶- تغییرات میزان بقای سلولی به روش MTT تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی جنینی رت نژاد ویستار ( $P < 0.05$ ), ( $P < 0.01$ ) و ( $P < 0.001$ ).

از نکات قابل توجه، ارتباط کمترین محتوی پروتئین کل پایین در مایع مغزی- نخاعی E20 با میزان بقای سلولی و استتاله عصبی پایین در سلول‌هایی است که تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی E20 قرار گرفته‌اند.

و اندازه استتاله عصبی آنها بزرگ‌تر از سایر نمونه‌ها می‌باشد که دلیل آن را می‌توان تفاوت توان تمایزی فاکتورهای رشد مختلف بر این سلول‌ها عنوان نمود.



شکل ۳- بیان مارکر تمایز عصبی  $\beta$ -III tubulin توسط رده سلولی PC12 (A). نمونه کنترل (B) سلول‌های تیمار شده با مایع مغزی- نخاعی E17 (C). مایع مغزی- نخاعی E18 (D). مایع مغزی- نخاعی E19 (E). مایع مغزی- نخاعی E20 (F). بیان این پروتئین در این رده سلولی تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی E17 و E19 قابل مشاهده می‌باشد در حالی که نمونه کنترل و همچنین سلول‌های تیمار شده با مایع مغزی- نخاعی E18 و E20 بیان مارکر را نشان نمی‌دهند. سلول‌ها تحت تاثیر b-FGF بیان این پروتئین را بیشتر نشان می‌دهند و همچنین طول زوائد عصبی در آنها طولی‌تر می‌باشد.



شکل ۴- میزان رشد زوائد عصبی در رده سلولی PC12 تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی جنینی رت نژاد ویستار ( $P < 0.05$ ), ( $P < 0.01$ ) و ( $P < 0.001$ ). میزان رشد زوائد عصبی در این سلول‌ها تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی E17 و E19 تفاوت معنی‌داری نسبت به کنترل نشان می‌دهند.

## بحث

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که تغییرات معنی‌دار در تمایز، میزان بقا و تکثیر سلول‌های PC12 ناشی از تغییر در محتویات مایع مغزی-نخاعی جنینی به ویژه محتویات پروتئینی آن در سنین متفاوت می‌باشد. با توجه به این که مایع مغزی-نخاعی روزهای متفاوت جنینی هر کدام تغییرات خاصی را در این سلول‌ها ایجاد می‌نمایند، این امر نشان دهنده نقش مایع مغزی-نخاعی به عنوان یک محیط مغذی و القا کننده برای این سلول‌ها می‌باشد. نتایج ما در بررسی حاضر نقش این مایع فیزیولوژیک را به عنوان عامل اصلی در افزایش تکثیر، بقا سلولی و همچنین القای تمایز نورونی در سلول‌های PC12، که مدلی برای تمایز نورونی می‌باشند، به اثبات می‌رساند. با توجه به این که تمایز نورونی در تکوین و رشد و نمو مغز و به ویژه کورتکس آن طی دوران جنینی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. می‌توان نتایج این تحقیق را گامی به جلو در اثبات تاثیر محتوی مایع مغزی-نخاعی جنینی در رشد و نمو سیستم عصبی مرکزی دانست.

حدود ۷۵ درصد مایع مغزی-نخاعی مغز توسط شبکه کوروئید در بطن‌های جانبی مغز تولید می‌گردد (۱۷). حدود ۸۰ درصد محتوی پروتئینی مایع مغزی-نخاعی از خون ناشی می‌شود، در حالی که ۲۰ درصد آن توسط خود مغز ترشح می‌گردد (۱۸). مطالعات زیادی در این زمینه صورت گرفته که نشان می‌دهند ترکیب غالب و تاثیرگذار مایع مغزی-نخاعی همان محتوی پروتئینی آن می‌باشد. به علاوه، بررسی‌ها بیانگر آن است که ترکیب پروتئینی مایع مغزی-نخاعی جنینی خیلی پیچیده از نوع بالغ می‌باشد و همچنین محتوی پروتئین آن بیشتر از نمونه‌های نوع بالغ می‌باشد (۲۰، ۱۹). در بررسی‌های به عمل آمده در این زمینه آشکار شده است که برخی پروتئین‌ها از جمله یک سری فاکتورهای رشد در ایجاد ساختار سه بعدی لایه نوروتلیوم در مراحل اولیه جنینی و بعدها طی شکل‌گیری کورتکس مغز نقش اصلی و حیاتی ایفا می‌نمایند (۲۱، ۴). مطالعه حاضر نیز به خوبی نشان می‌دهد که میزان محتوی پروتئین کل مایع مغزی-نخاعی در روزهای E17 و E19 (به ترتیب ۳/۶۵ و ۳/۰۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) که تمایز را در سلول‌های PC12 القا می‌نمایند نسبت به سایر روزها در بالاترین مقدار می‌باشد. البته این نکته حائز اهمیت است که محتوی پروتئین کل مایع مغزی-نخاعی (۲/۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در روز E18 را می‌توان عامل افزایش بقای سلولی یا به نوعی تکثیر سلولی دانست. لازم به ذکر است که

هر چه میزان کاهش ماده MTT توسط سلول‌های بیشتر باشد، رنگ بیشتری تولید می‌گردد و بنابراین بیان کننده تعداد بیشتر سلول در هر چاهک کشت است و با توجه به این نکته که مایع مغزی-نخاعی جنینی حاوی فاکتورهای محرک تکثیر سلولی می‌باشد (۲۱) می‌توان عنوان نمود که مایع مغزی-نخاعی E18 باعث افزایش تکثیر سلولی در این سلول‌ها می‌گردد. دلیل دیگر کاهش شدن کمتر MTT در سلول‌های PC12 تحت تاثیر مایع مغزی-نخاعی روزهای E17 و E19 (روزهایی که تمایز نورونی در این سلول‌ها القا می‌گردد) می‌باشد که به خوبی نشان می‌دهد در نمونه‌هایی که تمایز دیده می‌شود میزان تکثیر سلولی کمتر است.

پاره‌ای از مطالعات به خوبی بیانگر نقش مایع مغزی-نخاعی جنینی در تغییرات هیستوژنز مغز طی برخی بیماری‌های مادرزادی سیستم عصبی (به عنوان مثال هیدروسفالی مادرزادی) است، از آن رو که عدم تعادل در محتویات مایع مغزی-نخاعی در مرحله خاصی از تکوین جنینی می‌تواند شکل‌گیری و آرایش لایه‌های مختلف کورتکس مغز را تحت تاثیر قرار دهد (۲۲، ۲۳). این یافته که تکوین غیرطبیعی کورتکس تحت تاثیر تغییرات محتویات مایع مغزی-نخاعی می‌باشد، بیانگر تاثیر مایع مغزی-نخاعی در رشد و نمو مغز در حالت طبیعی است (۴). مطالبی که در قبل ذکر گردید نشان می‌دهد که مایع مغزی-نخاعی در تکوین طبیعی مغز طی مراحل رشد و نمو جنینی نقش ایفا می‌نماید. این امر با کشت این سلول‌ها در مایع مغزی-نخاعی خالص و افزایش بقای سلولی و تکثیر سلولی نشان داده شده است (۵). ما در این تحقیق توانستیم نشان دهیم که میزان تکثیر و بقای سلولی در سلول‌های تیمار شده با مایع مغزی-نخاعی روزهای جنینی متفاوت، وابسته به نسبت‌های استفاده شده (نسبت‌های ۷، ۱۰ و ۲۵ درصد مایع مغزی-نخاعی نسبت به محیط کشت) از این مایع فیزیولوژیک نمی‌باشد، بلکه می‌توان عنوان نمود که به واسطه تغییرات ایجاد شده طی روزهای متفاوت، وابسته به سن است. همچنین طی بررسی که بر روی جنین جوجه صورت گرفت نشان داده شد که در کشت قطعات مغز جنین جوجه در محیط *in vitro* تغییرات ایجاد شده در تکثیر و بقا سلولی و همچنین نورون‌زادگی تحت تاثیر مستقیم فاکتورهای رشد و به ویژه FGF2 (به عنوان عوامل پروتئینی) می‌باشند (۲۱). مطالعه دیگری بر روی جنین‌های جوجه نشان داد که مهار فاکتور رشد NGF در مایع مغزی-نخاعی این جنین‌ها می‌تواند منجر به مهار تکثیر سلول‌های پیش‌ساز عصبی و کاهش نورون‌زادگی در کورتکس این جنین‌ها گردد (۲۴). با توجه

ناپذیر به کورتکس مغز و سایر نواحی حساس مغز اشاره نمود (۶). همچنین تغییرات ایجاد شده در ترکیب مایع مغزی- نخاعی در بیماری‌هایی همچون آلزایمر می‌تواند به آسیب‌های جبران‌ناپذیری در سیستم عصبی مرکزی منجر گردد (۲۴). با توجه به این امر که مایع مغزی- نخاعی نقش غیر قابل انکاری در رشد و نمو طبیعی و حتی در ایجاد ناهنجاری‌های سیستم عصبی ایفا می‌نماید، ما امیدواریم که در این تحقیق توانسته باشیم درک صحیحی از نقش این مایع فیزیولوژیک در تکوین و رشد و نمو سلول‌های عصبی در محیط *in vitro* ارائه نموده باشیم که بتواند زمینه‌ای مناسب را برای مطالعات بیشتر در زمینه رشد و نمو طبیعی سیستم عصبی و همچنین بیماری‌های مرتبط با آن فراهم آورد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و تشکر خود را از مدیریت گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، آزمایشگاه سلولی - تکوینی و مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تربیت معلم به واسطه حمایت‌های مالی برای انجام این پروژه اعلام داشته و از آقای دکتر سلیمانی استاد محترم هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل اهدای آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در این پروژه صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

به کارهای ذکر شده و مطالعات مشابه در این زمینه می‌توان عنوان نمود که مایع مغزی- نخاعی جنینی تاثیرات تکثیری و تمایزی را که ایجاد می‌نماید، از طریق یک فاکتور رشد خاص و یا یک پروتئین منحصر به فرد اعمال نمی‌نماید، بلکه مجموعه‌ای از پروتئین‌ها، فاکتورهای رشد و نوروتروفیک در این امر دخیل می‌باشند. این امر به نوبه خود در تحقیق حاضر نیز نشان داده می‌شود، به نحوی که تمایز و تغییرات ایجاد شده در سلول‌های PC12 تحت تاثیر محتوی پروتئینی و فاکتورهای رشد موجود در مایع مغزی- نخاعی می‌باشد که غلظت این فاکتورهای رشد و نوروتروفیک در مایع مغزی- نخاعی طی روزهای جنینی مختلف متغیر می‌باشد (۹-۱۱). بررسی‌های حاصل از این تحقیق نشان می‌دهند که سلول‌های PC12 به عنوان مدل تمایز نورونی تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی استخراج شده از جنین‌های سنین متفاوت رفتارهای بیولوژیکی متنوعی از خود بروز می‌دهند. به نحوی که می‌توان تاثیر مایع مغزی- نخاعی سنین مختلف جنینی را در تمایز، تکثیر و بقای این رده سلولی در شرایطی کاملاً یکسان مشاهده نمود. در پایان لازم به ذکر است که هرگونه انسداد در جریان طبیعی مایع مغزی- نخاعی در سیستم عصبی مرکزی می‌تواند به ایجاد ناهنجاری‌ها و بیماری‌هایی همچون هیدروسفالی و اسپینا بیفیدا منجر گردد که از نتایج این نوع بیماری‌های سیستم عصبی می‌توان به آسیب‌های برگشت

### REFERENCES

1. Segal MB. Transport of nutrients across the choroid plexus. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 38-48.
2. Radebold K, Chernyak M, Martin D. Blood borne transit of CJD from brain to gut at early stages of infection. *BMC Infect Dis* 2001; 1: 20.
3. Segal MB. Extracellular and cerebrospinal fluid. *J Inherit Metabol Dis* 1993; 16: 617-38.
4. Miyan JA, Nabiyouni M, Zendah M. Development of the brain. A vital role for cerebrospinal fluid. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81: 317-28.
5. Miyan JA, Zendah M, Mashayekhi F. and Owen-Lynch P.J. Cerebrospinal fluid supports viability and proliferation of cortical cells in vitro, mirroring in vivo development. *Cerebrospinal Fluid Res* 2006; 3: 2.
6. Mashayekhi F, Draper CE, Pourghasem M, Bannister CM, Owen- Lynch PJ, Miyan JA. Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas (H-Tx) rat: a role for cerebrospinal fluid. *Brain* 2002; 125: 1859-74.
7. Owen-Lynch PJ, Draper CE, Mashayekhi F, Bannister CM, Miyan JA. Defective cell cycle control underlies abnormal cortical development in the hydrocephalic Texas rat. *Brain* 2003; 126: 623-31.
8. Cains S, Shepherd A, Nabiuni M, Owen-Lynch PJ, Miyan J. Addressing a folate imbalance in fetal cerebrospinal fluid can decrease the incidence of congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; 68: 404-16.
9. Xia YX, Ikeda T, Xia XY. Differential neurotrophin levels in cerebrospinal fluid and their changes during development in newborn rat. *Neurosci Lett* 2000; 280: 220-22.
10. Hochhaus F, Koehne P, Schaper C. Elevated nerve growth factor and neurotrophin-3 levels in cerebrospinal fluid of children with hydrocephalus. *BMC Pediatr* 2001; 1: 2.
11. Chiaretti A, Zorzi G, Di Rocco C. Neurotrophic factor expression in three infants with Ondine's curse. *Pediatr Neurol* 2005; 33: 331-36.

12. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 1976; 73: 2424-28.
13. Greene LA, Tischler AS. Nerve growth factor-induced process formation by cultured rat pheochromocytoma cells. *Nature* 1975; 258: 341-42.
14. Togari A, Dickens G, Kuzuya H, Guroff G. The effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *J Neurosci* 1985; 5: 307-16.
15. Nakafuku M, Kaziro Y. Epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  can induce neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells under particular culture conditions. *Federation of European Biochemical Societies* 1993; 3: 227-32.
16. Chen ZY, Chai YF, Cao L, Huang AJ, Cui RY, Lu CL. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes survival and induces differentiation through the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathway respectively in PC12 cells. *Neuroscience* 2001; 2: 593-98.
17. Edsbacke M, Tisell M, Jacobsson L, Wikkelso C. Spinal CSF absorption in healthy individuals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: 1450-55.
18. Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci* 2003; 21: 79-96.
19. Dziegielewska KM, Knott GW, Saunders NR. The nature and composition of the internal environment of developing brain. *Cell Mol Neurobiol* 2000; 20: 41-56.
20. Gato A, Martin P, Alonso MI, Martin C, Pulgar MA, Moro JA. Analysis of cerebro-spinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J Exp Zool* 2004; 301: 280-89.
21. Gato A, Moro JA, Alonso MI, Bueno D, De la mano A, Martin C. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat Rec* 2005; 284: 475-84.
22. Mashayekhi F, Draper CE, Bannister CM, Pourghasem M, Owen- Lynch PJ, Miyan JA. Deficient cortical development in the hydrocephalic texas (H-Tx) rat: a role for CSF. *Brain* 2002; 125: 1859-74.
23. Owen-Lynch PJ, Draper CE, Mashayekhi F, Bannister CM, Miyan JA. Defective cell cycle control underlies abnormal cortical development in the hydrocephalic texas rat. *Brain* 2003; 126: 223-31.
24. Mashayekhi F, Salehi Z. Infusion of anti-nerve growth factor into the cisternum magnum of chick embryo leads to decrease cell production in the cerebral cortical germinal epithelium. *Eur J Neurol* 2007; 14: 181-86.
25. Yaka E, Egrilmez MY, Keskinoglu P, Cavdar Z, Genc S, Genc K, et al. Biological markers in cerebrospinal fluid (CSF) and evaluation of in vitro effect of CSF on PC12 cell line viability in Alzheimer's disease. *Cell Biochem Funct* 2009; 27: 395-401.