مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۱، شماره ۳، پاییز ۹۰، صفحات ۱۷۵ تا ۱۸۲

Original Article

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

محمد نبیونی[۱]، کاظم پریور[۲]، هما محسنی کوچصفهانی[۱]، جواد رسولی[۳]

[۱] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم
[۲] استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم وتحقیقات
[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، 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 می گردند، در پاسخ به NGF، FGF، EGF و GDNF به نورون‌های شبه سمپاتیک تمایزمی یابند.*

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 اندازه گیری شد. بیان مارکرهای تمایز عصبی (MAP-2 و β-III tubulin) توسط ایمونوسیتوشیمی بررسی شد.*

یافته ها: *پروتئین‌های MAP-2 و β-III tubulin در گروه‌های حاویCSF جنینیE17 وE19 بیان شدند، در حالی که در گروه کنترل بیان نشدند. توانایی حیات و تکثیر سلولی به طور معنی‌داری در سلول‌های کشت شده در محیط حاویCSF 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، تمایزعصبی 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 طورعمده توسط شبکه کوروئید که یک ساختاراپی 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 زیرعنکبوتیه‌ای) را پر می‌نماید (۱). با توجه به اینکه مغز فاقد سیستم لنفاتیک می‌باشد(۲)، مطالعات ابتدایی فقط مایع مغزی- نخاعی را به عنوان جایگزینی برای این سیستم مطرح می‌نمود و بیشتر این بررسی‌ها با تاکید بر نقش مایع مغزی- نخاعی در سیستم عصبی از جنبه‌های مکانیکی و حفاظتی صورت می‌گرفت (۳). این در حالی است که مطالعات اخیر دراین زمینه به شکل بارزی بر تغییرات و نقش مایع مغزی- نخاعی طی روند تکوین و رشد ونمو سیستم عصبی تاکید 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**: nabiuni@tmu.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۶/۱۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱/۲۷

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-04-11]

سلول‌های پیش‌ساز عصبی طی فرایند رشدونمو مغز نقش پررنگی را ایفا می‌نماید (۵). قابل ذکر است که مطالعات صورت گرفته برروی رت‌های Hydrocephalus Texas (H-TX) اثبات می‌نماید که محتویات مایع مغزی- نخاعی می‌تواند خود به تنهایی عامل توقف رشدونمو سیستم عصبی گردد که این فرایند از طریق متوقف شدن تقسیم سلولی درمغز صورت می‌گیرد (۸-۶).

مقادیر بالایی از برخی پروتئین‌ها توسط شبکه کوروئید ساخته و به داخل مایع مغزی- نخاعی جنینی ترشح می‌گردند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای رشدی همچون transforming growth factor β (TGF-β)، nerve growth factor (NGF)، insulin growth factor (IGF)، neurotrophin 3 (NF-3)، brain derived neurotrophic factor (BDNF) اشاره نمود (۱۱-۹). با توجه به مقادیر بالای این فاکتورهای رشد در مایع مغزی- نخاعی جنینی و تغییرات معنی‌دار میزان این پروتئین‌ها در روزهای حساس رشد و نمو مغز، به عنوان مثال طی روزهایی که به عنوان دوره زمانی نوروژنزیس (E17 وE18) شناخته می‌شوند، نقش رشد ونموی مایع مغزی- نخاعی را به حضور و عملکرد این فاکتورها نسبت می‌دهند (۶). سلول‌های PC12 با منشا تومور فوق کلیوی Pheochromocytoma می‌باشند (۱۲)، و تحت تاثیر برخی فاکتورهای رشد اعم از NGF، b-FGF، EGF، TGF-α و GDNF (۱۶-۱۳) توانایی تمایز به نورون‌های شبه سمپاتیک را دارا می باشند. این خصوصیات منحصر به فرد سلول‌های PC12 است که آنها را به عنوان مدلی مناسب برای بررسی تمایز نورونی و همچنین بیماری‌های مرتبط با نقص درسیستم عصبی مطرح می‌سازد. 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 وکامل 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 جنین‌های rat نژاد ویستار بر روی رده سلولی PC12 بررسی و همچنین مقایسه‌ای بین رفتار تکثیری و میزان بقای این سلول‌ها تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی روزهای مختلف انجام گردید.

با توجه بررسی‌های انجام شده در زمینه نقش رشدونموی مایع مغزی- نخاعی در دهه اخیر می‌توان 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- 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 می‌باشند. در این تحقیق سعی شده با بررسی توان تمایزی مایع مغزی- نخاعی در این سلول‌ها مدلی مناسب جهت مطالعات تمایزی درمحیط *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 جنین‌های Rat در روزهای جنینی مشخص (E17-E20) صورت گرفت. مایع مغزی- نخاعی توسط پیپت پاستور از ناحیه cisterna magna این جنین‌ها جمع آوری گردید. مقادیر جمع‌آوری شده از این مایع به داخل میکروتیوب‌های استریل منتقل شد و پس از سانتریفوژ نمودن با دور ۱۴۰۰۰ rpm مایع رویی به دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. از هر جنین بسته به سن آن با این روش می‌توان به طور متوسط حدود ۵۰-۵ میکرولیتر نمونه مایع مغزی- نخاعی جمع‌آوری نمود. به منظور جمع آوری نمونه‌های مایع مغزی- نخاعی جنینی، از حدود ۱۰۰ رت مادر حامله استفاده گردید. در ادامه تحقیق، به منظور کشت سلول‌ها از نسبت‌های ۷، ۱۰ و ۲۵ درصد (v/v) مایع مغزی- نخاعی جنینی نسبت به محیط کشت استفاده گردید. دلیل استفاده از این نسبت‌های متفاوت، تعیین نسبت موثر مایع مغزی- نخاعی در تمایز و تکثیر این سلول‌ها می‌باشد و دلیل دیگر اینکه این نسبت‌ها بر حسب مطالعات قبلی که بر روی مایع مغزی- نخاعی انجام شده بود، انتخاب گردید.

برای اندازه‌گیری محتوی پروتئین کل نمونه‌های مایع مغزی- نخاعی جنینی رت از روش بردفورد که یکی از دقیق‌ترین روش‌های اندازه‌گیری میزان پروتئین می‌باشد استفاده شد. در روش بردفورد از رنگ کوماسی برلیانت بلو G-250 استفاده می‌شود. اتصال رنگ به پروتئین موجب می‌شود که ماکزیمم جذب از ۴۶۵ نانومتر (رنگ قرمز) به ۵۹۵ نانومتر (رنگ آبی) تغییر یابد.

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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-04-11]

Serum Albumin (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. سپس در لوله‌های آزمایش ۵ میلی‌لیتر معرف بردفورد [(۰/۰۱٪ Coomassie Brilliant Blue G-250(Merck)، ۵٪ اتانول ۹۵٪، ۱۰٪ اسید فسفریک ۸۵٪)] ریخته شد و به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد BSA (Sigma) تهیه شده اضافه گردید. پس از طی مدت زمان ۵-۶۰ 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 ازغلظت‌های 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 قطرحدود 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) دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ کشت داده شدند. برای بررسی میزان بقای سلولی و القای تمایز، سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای حاوی پلی‌دی‌لایزین 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.

سلول‌های PC12 کشت شده در پلیت‌های ۲۴ خانه حاوی پلی‌دی‌لایزین (Merck) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰X مورد بررسی قرار گرفتند. طول بزرگ‌ترین استطاله عصبی درهر سلول PC12 اندازه‌گیری شد، به نحوی که استطاله‌های 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 استطاله‌های 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 MTT(3-(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 سلول ها 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 β-III tubulin در سلولهای PC12 به روش ایمنوسیتوشیمی (Immunocytochemistry) انجام شد. سلول‌ها پس ازسه بار شستشو با PBS (هر بار به مدت ۵ دقیقه) توسط پارافرم آلدهید 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 انکوباسیون 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-β-III tubulin- Abcam) انکوبه شدند. در نهایت، سلول‌ها پس از سه مرحله شستشو با TPBS(Tween 20- PBS) به مدت یک

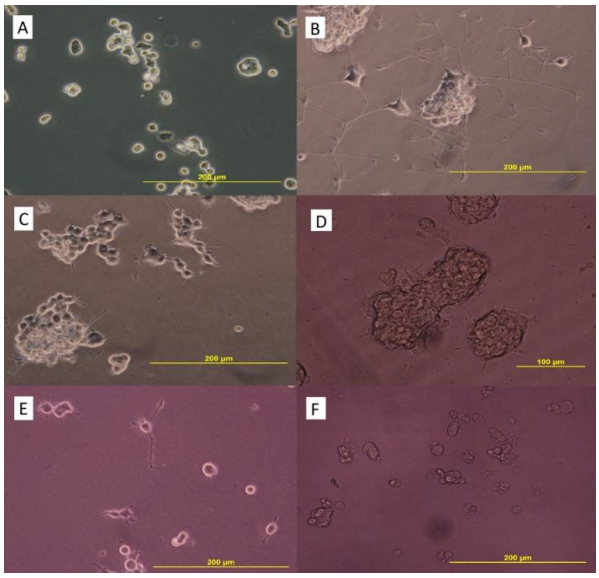
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-04-11]

ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همرا با آنتی‌بادی ثانویه (goat anti-mouse)(Sigma) کنژوگه شده با FITC انکوبه شدند. در آخر، سلول‌ها با اضافه کردن رنگ PI (Sigma) (Propidium Iodide) به منظور رنگ‌آمیزی هسته، توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی و عکس‌برداری گردیدند.

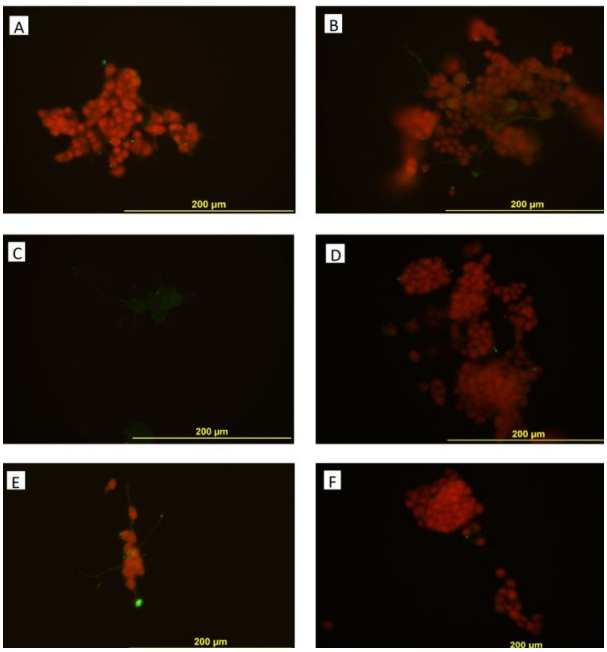
برحسب نوع داده‌ها، از آزمون های آماری One-way ANOVA و Kruskal-Wallis استفاده شد. کلیه محاسبات آماری توسط نرم‌افزار Instat3 انجام شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، سلول‌ها پس از اینکه به مدت یک هفته در معرض مایع مغزی- نخاعی روزهای مختلف جنینی قرار گرفتند، استطاله‌های عصبی از روز ۳ تیمار توسط مایع مغزی- نخاعی قابل مشاهده بودند. بررسی‌های مورفولوژیکی توسط میکروسکوپ فاز متضاد انجام شد که نتایج حاصل از این مشاهدات اولیه، تمایز ظاهری آشکار گروه‌های تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی روزهای جنینی E17 و E19 را در مقایسه با نمونه‌های کنترل نشان می‌دهند (شکل ۱).



شکل۱- 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 وF) مایع مغزی- نخاعی E20. سلولهای PC12 تحت تاثیرمایع مغزی- نخاعی E17 و E19 تمایز نورونی را نشان می‌دهند 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 استطاله بیشتری نسبت به سایر گروه ها را نشان می دهند.



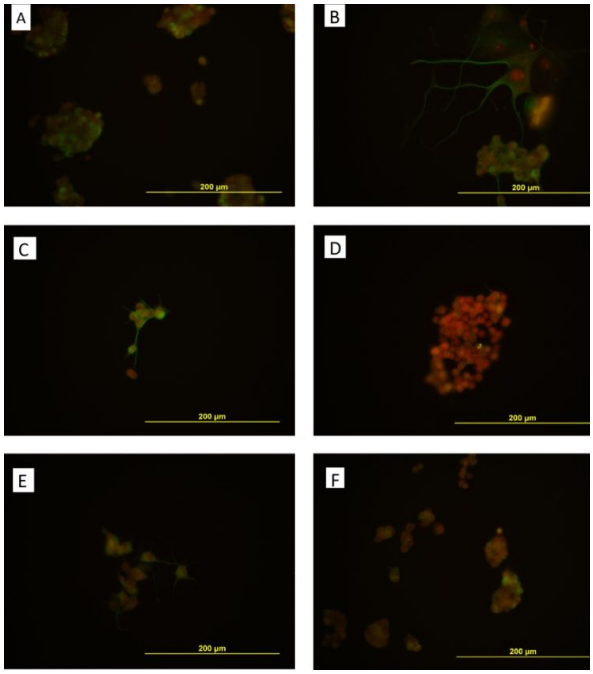
شکل ۲- بیان مارکرعصبی MAP-2 توسط سلول های PC12. A) نمونه کنترل B) سلول های تیمار شده با b-FGF(10ng/ml)، C) مایع مغزی- نخاعی E17، D) مایع مغزی- نخاعی E18، E) مایع مغزی- نخاعی E19 وF) مایع مغزی- نخاعی E20. بیان مارکر عصبی در این سلول ها تحت تاثیرمایع مغزی- نخاعی E17 و E19 قابل مشاهده می باشد در حالی که نمونه کنترل و همچنینی 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 سلول‌ها در معرض فاکتور رشد b-FGF همراه با سایر گروههای آزمایشی به مدت یک هفته قرار گرفتند که از این سلول‌های تمایز یافته به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. از طرف دیگر نتایج بررسی ایمنوسیتوشیمیایی مارکرهای عصبی MAP-2 و β-III tubulin داده‌های بدست آمده از تغییرات مورفولوژیکی را قویا تایید می‌نمایند، بدین نحو که این سلول‌ها تحت تاثیر مایع مغزی- نخاعی E17 و E19 مارکرهای فوق الذکر را که برای تمایز عصبی اختصاصی می‌باشند، به نحو بارزی بیان می کنند، هر چند که میزان تمایز و همچنین طول زوائد عصبی در این گروهها با نسبت کمتری در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با b-FGF مشاهده گردید (شکل ۲ و ۳).

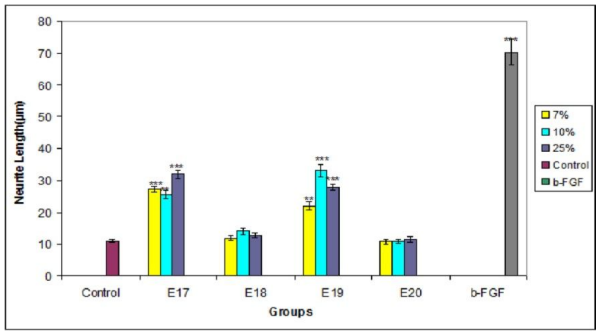
طول استطاله‌ها در سلول‌های تیمار شده با مایع مغزی- نخاعی روزهای E17 و E19 افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه های کنترل را نشان داد. این در حالی است که سلول‌های کشت داده شده در مجاورت مایع مغزی- نخاعی روزهای E18 و E20 تفاوت چندانی را با نمونه‌های کنترل نشان ندادند (شکل ۴). همان طور که در بالا ذکر شد، نمونه‌هایی که با b-FGF تمایز یافته‌اند، میزان

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-04-11]

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

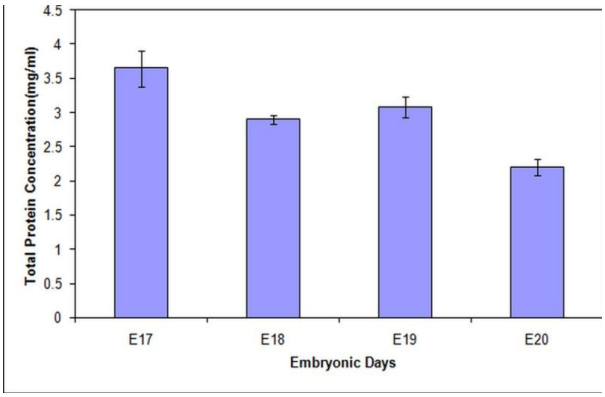


شکل ۳- بیان مارکرتمایزعصبی β-III tubulin توسط رده سلولی PC12. A) نمونه کنترل B) سلول های تیمار شده با b-FGF(10ng/ml) C) مایع مغزی- نخاعی E17، D) مایع مغزی- نخاعی E18، E) مایع مغزی- نخاعی E19 و F) مایع مغزی- نخاعی E20. بیان این پروتئین در این رده سلولی تحت تاثیرمایع مغزی- نخاعی E17 و E19 قابل مشاهده می باشد در حالی که نمونه کنترل و همچنینی سلول های تیمار شده با مایع مغزی- نخاعی E18 و E20 بیان مارکر را نشان نمی دهند. سلول ها تحت تاثیر b-FGF بیان این پروتئین را بیشترنشان می دهند و همچنین طول زوائد عصبی در آنها طویل تر می باشد.



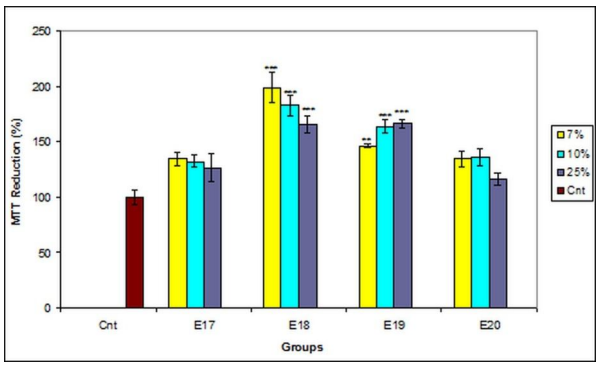
شکل ۴- میزان رشد زوائد عصبی در رده سلولی PC12 تحت تاثیرمایع مغزی-نخاعی جنینی رت نژاد ویستار (*P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱ و ***P<۰/۰۰۱). میزان رشد زوائد عصبی در این سلول ها تحت تاثیرمایع مغزی- نخاعی E17 و E19 تفاوت معنی‌داری نسبت به کنترل نشان می دهند.

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 وE19 (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<۰/۰۵، **P<۰/۰۱ و ***P<۰/۰۰۱).

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 تاثیرمایع مغزی- نخاعی جنینی رت نژاد ویستار (*P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱ و ***P<۰/۰۰۱).

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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-04-11]

بحث

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که تغییرات معنی‌دار در تمایز، میزان بقا وتکثیر 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 دراین سلول‌ها ایجاد می‌نمایند، این امر نشان دهنده نقش مایع مغزی- نخاعی به عنوان یک محیط مغذی و القا کننده برای این سلول‌ها می باشد. نتایج ما در بررسی حاضر نقش این مایع فیزیولوژیک را به عنوان عامل اصلی درافزایش 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 افزاینده 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 کاهیده شدن کمتر MTT در سلول‌های PC12 تحت تاثیرمایع مغزی- نخاعی روزهای E17 و E19 (روزهایی که تمایز نورونی در این سلول ها القا می گردد) 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 هیدرسفالی 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 (۲۳،۲۲). 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 نموی جینی 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 دراین تحقیق توانستیم نشان دهیم که میزان تکثیر و بقای سلولی در سلول‌های تیمار شده با مایع مغزی- نخاعی روزهای جنینی متفاوت، وابسته به نسبت های استفاده شده (نسبت های ۷، ۱۰ و ۲۵ درصد مایع مغزی- نخاعی نسبت به محیط کشت) ازاین مایع فیزولوژیک 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 نوروژنز تحت تاثیر مستقیم فاکتورهای رشد و به ویژه FGF2 (به عنوان عوامل پروتئینی) می باشند (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 نوروژنز در کورتکس این جنین‌ها گردد (۲۴). با توجه

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-04-11]

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 امربه نوبه خود در تحقیق حاضر نیز نشان داده می‌شود، به نحوی که تمایز و تغییرات ایجاد شده درسلول‌های 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 (۱۱-۹). 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 کاملا 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 ناپذیر به کورتکس مغز و سایر نواحی حساس مغز اشاره نمود (۶). همچنین تغییرات ایجاد شده در ترکیب مایع مغزی- نخاعی دربیماری‌هایی 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 زیست شناسی، 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.

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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-04-11]

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-a 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 neurotriphic 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. Edsbagge 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 hidrocephalic 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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-04-11]