مجلـه علمـی پـژوهشـی دانشگـاه علـوم پزشکـی اردبیـل

دوره هشتم، شماره دوم، تابستان۱۳۸۷، صفحات ۱۷۹ الی ۱۸۶

روش جدید و کار آمد برای تولید نوروسفر بیشتر از بطن طرفی مغز موش بالغ

دکتر محمد قاسم گل محمدی[۱]، حسن آذری[۲]، دکتر محمد مردانی[۳]، دکتر ابراهیم اسفندیاری[۴]، رادنی لی ریتز[۵]

[۱] نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل **E-mail:** golmohammadi50@gmail.com

[۲] استادیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز [۳] دانشیار علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی اصفهان [۴] استاد علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

[۵] عضو هیئت علمی و محقق دانشگاه کوئینزلند استرالیا

چکیده

زمینه و هد ف: امروزه مشخص شده است کـه ناحیـه تحـت بطنـی SVZ (Subventricular Zone) در سیـستم بطنـی مغـز پستانداران بالغ دارای جمعیتی از سلول های بنیادی عصبی است که نورون ها و سلول های گلیـال را ایجـاد مـی کننـد. بـه دلیـل کمبـود مارکرهـای خـاص بـرای شناسـایی ایـن سـلول هـا روش ایجـاد نوروسـفر NSA (Neurosphere Assay) در محـیط آزمایشگاهی روشی متداول و انتخابی برای جداسازی، مطالعه و درک بیولوژی سلول هـای بنیـادی عـصبی رویـانی و بـالغ مـی باشد. روش های مختلفی برای ایجاد نوروسفر از مناطق مختلف سیستم عصبی مرکزی از جمله بطن هـای طرفـی مغـز وجـود دارد. هدف از این مطالعه ارایه راهکاری جدید و کار آمد برای تولید نوروسفر بیشتر ازناحیه تحت بطنی بطن های طرفی مغـز موش بالغ با استفاده از روش NSA می باشد.

روش کار: ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی مغز مـوش بـالغ بـا دو روش متفـاوت تـشریح و جداسـازی شـده و براساس روش نوروسفر کشت داده شدند. در روش اول (روش ریتز و رینولدز) این ناحیه بصورت یکپارچه جدا شده و پـس از ایجاد سوسپانسیون تک سلولی بصورت یکجا کشت داده شد. در روش دوم یا روش برش گیری، پـس از برداشـتن بـرش هـای سریالی ٤٠٠ میکرونی مغز، ناحیه تحت بطنی از برش های نیمه سری بطن های طرفی جمـع آوری شـده و بطـور جداگانـه بـا استفاده از روش NSA کشت داده شدند. پس از هفت روز نوروسفرهای اولیه حاصله از دو روش شمارش شده ومیانگین آنهـا با همدیگر مقایسه گردید.

یافته ها: میانگین تعداد نوروسفرهای بدست آمده در روش برش گیری بسیار بیشتر از روش اول بـود ($P < ۰/۰۰۱$). توزیـع و پراکندگی سلول های نوروسفرساز یا سلول های بنیادی عصبی درطول محور قدامی- خلفی نیمـه سـری بطـن هـای طرفـی یکسان نبوده و بالاترین تراکم این سلول ها در فاصله ۰/۷٤ میلی متری سمت سری نقطه برگما مشاهده گردید.

نتیجه گیری : روش دوم یا روش برش گیری بدلیل تولید نوروسفرزیاد از ناحیه تحـت بطنـی نـسبت بـه روش اول یـا روش کشت یکجای این ناحیه، روشی کار آمد و مناسب می باشد.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی عصبی، ناحیه تحت بطنی، روش ایجاد نوروسفر

دریافت: ۸۶/٤/۲۱ **پذیرش:** ۸۶/۷/۳

مقدمه

بر خـلاف بـاور قـدیمی مبنـی بـر حالـت سـکون در سیستم عصبی مرکزی (CNS)[۱] و عدم تولید سلول های عصبی در این سیستم، امروزه کاملاً مشخص شده است که حداقل در دو ناحیه از مغز پستانداران بالغ یعنی پیـاز بویایی (Olfactory bulb) و تشکیلات هیپوکامپی، نورون زایـی اتفـاق مـی افتـد[۵،۱]. تولیـد مـستمر و مـداوم سلول های جدید در CNS حاکی از وجـود سـلول هـای بنیـادی عـصبی، یعنـی سـلول هـایی کـه قابلیـت تکثیـر، نوسازی و ایجاد سلول های تمـایز یافتـه را دارنـد، مـی باشد[۶].

[1] Central Nervous System

در سال ۱۹۹۲، رینولدز و وایس با ابداع روشی بنام روش نوروسفر NSA[1] با استفاده از یک محیط کشت فاقد سرم، وجود سلول های بنیادی عصبی را هم در مغز موش بالغ و هم در مغز رویان موش نشان دادند [۷]. در محیط کشت فاقد سرم، سلول های تمایز یافته CNS قادر به رشد و بقاءِ نبوده و از بین می روند در حالیکه سلول های بنیادی عصبی حتی در تراکم بسیار پائین سلولی نیز وارد فاز تکثیری شده و کلونی های چند ظرفیتی یا نوروسفرها را ایجاد می کنند که می توان با جدا سازی و کشت مجدد سلول های یک نوروسفر، نوروسفرهای ثانویه بیشتری را ایجاد نمود و چنانچه این سلول ها در محیط کشت تمایزی قرار گیرند به انواع سلول های اصلی CNS یعنی نورون، آستروسیت و الیگودندروسیت تبدیل می شوند. بدین ترتیب رینولدز و وایس نشان دادند سلول هایی که جدا نموده اند ویژگی های اصلی سلول های بنیادی یعنی تکثیر، نوسازی و تمایز به سلول های بالغ و عملکردی را دارا می باشند [۸،۶].

اگر چه از سال ۱۹۹۲ تا کنون NSA بعنوان روشی انتخابی و استاندارد برای جدا سازی، مطالعه و درک بیولوژی سلول های بنیادی عصبی به شمار می رود، ولی هیچ پروتکل استانداردی برای مقایسه نتایج حاصله از تحقیقات مختلف که از این روش استفاده می نمایند، وجود ندارد و احتمال اینکه با تغییر محیط کشت، روش تشریح و جدا سازی بافت های عصبی و حتی نحوه کشت آنها نتایج متفاوتی بدست آید، بسیار زیاد می باشد [۹]. از جمله روش های ارایه شده برای جداسازی سلول های بنیادی عصبی از ناحیه تحت بطنی بطن های طرفی مغز موش بالغ با استفاده از NSA روش ریتز و رینولدز[2] می باشد[۱۰]. در این روش ناحیه تحت بطنی بطن های طرفی بصورت یک پارچه از نیمه سری بطن های طرفی جدا گشته و با استفاده از NSA بصورت یکجا کشت داده می شود و پس از هفت روز نوروسفرهای حاصله شمارش شده و مورد مطالعه قرار می گیرند. این مطالعه برآن است با معرفی روشی جدید و دقیق تر (روش برش گیری)، با استفاده از محیط کشت مشابه با روش ریتز و رینولدز و با ایجاد تغییر در نحوه تشریح، جدا سازی و کشت ناحیه تحت بطنی، بطن های طرفی با استفاده از NSA به مطالعه و مقایسه نتایج حاصله از دو روش فوق بپردازد. به عبارتی دیگر ضمن بررسی تاثیر روش های جدا سازی بافت های عصبی و نحوه کشت آنها بر نتایج حاصله از دو روش فوق، روشی کارآمد و موثر جهت تولید نوروسفر بیشتر از ناحیه تحت بطنی بطن های طرفی ارایه نماید. همچنین در این مطالعه الگوی توزیع و پراکندگی سلول های نوروسفر ساز یا سلول های بنیادی عصبی در طول محور قدامی- خلفی نیمه سری بطن های طرفی نیز مشخص می شود.

روش کار

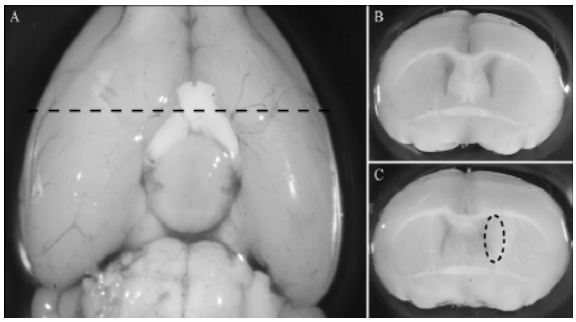
تشریح و جدا سازی ناحیه تحت بطنی، بطن های طرفی:

روش اول: در این روش که بر اساس شیوه ارایه شده توسط ریتز و رینولدز [۱۰] صورت پذیرفت، موش های نر ۶ تا ۸ هفته ای نژاد CBA با تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال (۱۲۰mg/kg) و جابجایی مهره های گردنی کشته شده و بلافاصله مغز آنها از جمجمه خارج گردید. با استفاده از اسکالپل یک برش کرونال در پشت پیازهای بویایی و یک برش کرونال دیگر در محل کیاسمای بینایی ایجاد شد (شکل A.۱). بخشی از مغز که در بین دو برش کرونال فوق واقع شده و محتوی نیمه سری بطن های طرفی بود برای کشت ناحیه تحت بطنی بطن های طرفی با روش NSA استفاده گردید. به منظور تشریح و جداسازی ناحیه تحت بطنی، این بخش از مغز در وضعیتی قرار گرفت که سطح روسترال آن به سمت پایین و سطح کودال آن رو به بالا باشد (شکل B.۱).

آنگاه با استفاده از یک فورسپس سر خمیده نوک تیز سپتوم موجود در بین دو بطن خارج گردیده و کنار گذاشته شد و ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های

[1] Neurosphere Assay
[2] Rits & Rinolds

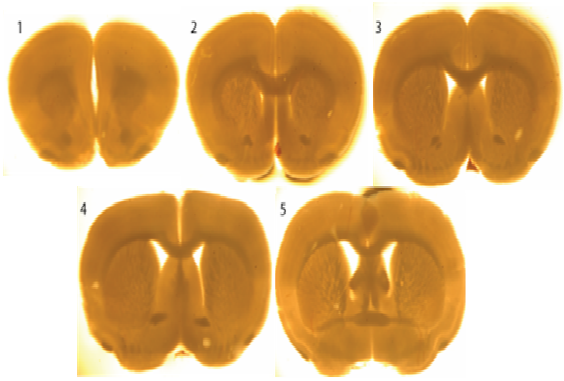
طرفی در حد فاصل بین کورپوس کالوزوم و تقاطع رابط های قدامی و خلفی مغز (شکل ۱. C) بصورت لایه ای نازک و یکپارچه به ضخامت تقریبی ۲ میلی متر بمنظور کشت با روش NSA جدا گردید.



شکل ۱. A) نمای شکمی مغز موش بالغ که محل برش کرونال دوم بر روی کیاسمای بینایی با خط چین مشخص شده است. B) سطح روسترال نیمه قدامی مغز پس از ایجاد برش کرونال از محل کیاسمای بینایی .C) ناحیه تحت بطنی بطن طرفی که برای جداسازی سلول های بنیادی عصبی با روش NSA استفاده می شود با خط چین مشخص شده است.

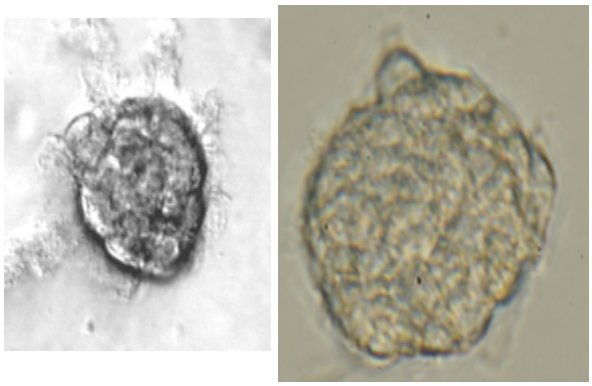
روش دوم یا روش برش گیری:

در این روش پس از خارج نمودن مغز از داخل جمجمه، پیازهای بویایی با یک برش کرونال جدا شده و از بخش باقیمانده مغز توسط یک ویبروتوم (vibratome) برش های کرونال ۴۰۰ میکرونی بصورت سریال تهیه گردید. آنگاه با استفاده از یک اسکالپل و در زیر میکروسکوپ تشریح ناحیه تحت بطنی از برش های موجود در نیمه سری بطن های طرفی بصورت جداگانه خارج شده و جهت کشت با روش NSA آماده سازی شد (شکل۲) .



شکل ۲.برش های ۴۰۰ میکرونی ایجاد شده در ناحیه نیمه سری بطن های طرفی مغز موش بالغ.نوا حی زیر بطنی هرکدام از برش های فوق پس از جدا سازی وتبدیل به سوسپانسیون تک سلولی با استفاده از روش NSA بطور جداگانه کشت داده شدند. شماره برش ها ترتیب برش ها را از سمت سری به سمت دمی مشخص می کند.

NSA : نواحی تحت بطنی جدا شده در روش اول و دوم با استفاده از هضم آنزیمی (Trypsin-EDTA) و مکانیکی به حالت سوسپانسیون تک سلولی در آمده، در روش اول بصورت یک جا و در روش دوم برای هر برش بصورت جداگانه در فلاسک های T25 کشت داده شدند، محیط کشت استفاده شده عبارت بود از: (Gibco) (۱:۱) DMEM / F-12 ، ۵ میلی مولار بافر هیپز (Sigma) ، ۰/۶٪ گلوکز (Sigma) ، ۳ میلی مولار بیکربنات سدیم (Sigma) ، ۲ میلی مولار ال-گلوتامین (Stem Cell Technologies) ، ۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر انسولین (Sigma) ، ۱۰۰ میکروگرم درمیلی لیتر ترانسفرین (Serologicals) ، ۲۰ نانومولار پروژسترون (sigma) ، ۶۰ میکرومولار پوترسین (sigma) و ۳۰ نانومولار سلنایت سدیم (sigma). به محیط فوق، فاکتورهای رشد (BD Bioscience) EGF با غلظت ۲۰ نانو گرم در میلی لیتر(Roche, USA) bFGF با غلظت ۱۰ نانو گرم در میلی لیتر و نیز هپارین با غلظت ۱۰ نانو گرم در میلی لیتر افزوده شد(محیط کشت NSA). پس از هفت روز انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و CO_2 ۵ درصد، با استفاده از میکروسکوپ اینورت تمامی نوروسفرهای ایجاد شده در فلاسک های T25 بطور جداگانه شمارش شدند(شکل ۳).



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست ازنوروسفرهای ایجاد شده با روش NSA . A) بزرگنمایی ۶۰ × .B) بزرگنمایی ۴۰ ×

برای آنالیز داده ها از نرم افزار Prism 4.01, Graphpad Inc .USA و متد آماری Independent

Student T-test استفاده گردید. میانگین تعداد نوروسفرهای حاصله از هر برش و نیز میانگین مجموع نوروسفرهای بدست آمده از ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی با روش برش گیری مشخص شده و با میانگین تعداد نوروسفرهای ایجاد شده در روش اول مقایسه گردید.

یافته ها

نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که میانگین مجموع نوروسفرهای ایجاد شده از ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی در روش اول (جدول ۱) و دوم (روش برش گیری، جدول ۲). بترتیب ۷۳ ± ۵۰۱ و ۳۴۹±۲۲۷۳ بوده و تفاوت معنی دار آماری بین این دو روش وجود دارد ($p<۰/۰۰۰۱$) (نمودار ۱).

جدول۱. تعداد نوروسفرهای حاصله ازکشت ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی با استفاده از روش اول (روش ریتز و رینولدز)

شماره موش	تعداد نوروسفر
۱	٤٥٥
۲	۳۹۸
۳	٥۲٤
٤	٥٥۰
٥	٥۸۰
میانگین	٥۰۱/٤

بررسی نتایج حاصل از مطالعاتی که بمنظور تولید نوروسفر از ناحیه تحت بطنی بطن های طرفی از روشی مشابه روش اول (روش ریتز و رینولدز) استفاده نموده اند نیز نشان می دهد که مجموعه نوروسفر های بدست آمده در این مطالعات بین حداقل ۱۵۰ تا حداکثر ۹۰۰ عدد متغیر بوده و میانگین تقریبی ۵۰±۵۰۰ را می توان برای آنها در نظر گرفت [۱۳-۱۱]. همچنین در این مطالعه الگوی توزیع نوروسفرهای حاصل از کشت ناحیه تحت بطنی برش های ٤۰۰ میکرونی نشان داد که توزیع و پراکندگی نوروسفر ها در طول محور قدامی-خلفی نیمه سری بطن های طرفی یکسان نبوده و بیشترین تعداد نوروسفرها از قسمت میانی این ناحیه یعنی برش سوم ایجاد می شود که در فاصله ۰/۷٤ میلی متری سمت سری نقطه برگما می باشد [١٤].

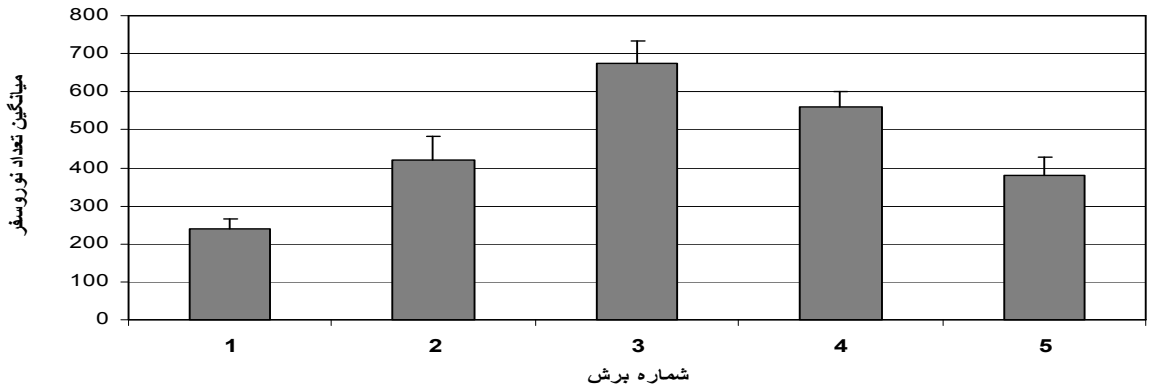
میانگین تعداد نوروسفرهای بدست آمده از این قسمت (برش سوم) بترتیب سه و دو برابر میانگین تعداد نوروسفرهای بدست آمده از قسمت سری و دمی این ناحیه می باشد. بنابراین بنظر می رسد که تراکم سلول های نوروسفر ساز یا سلول های بنیادی عصبی در قسمت میانی نیمه سری بطن های طرفی بیشتر از سایر قسمت های آن می باشد (نمودار۲).

بحث

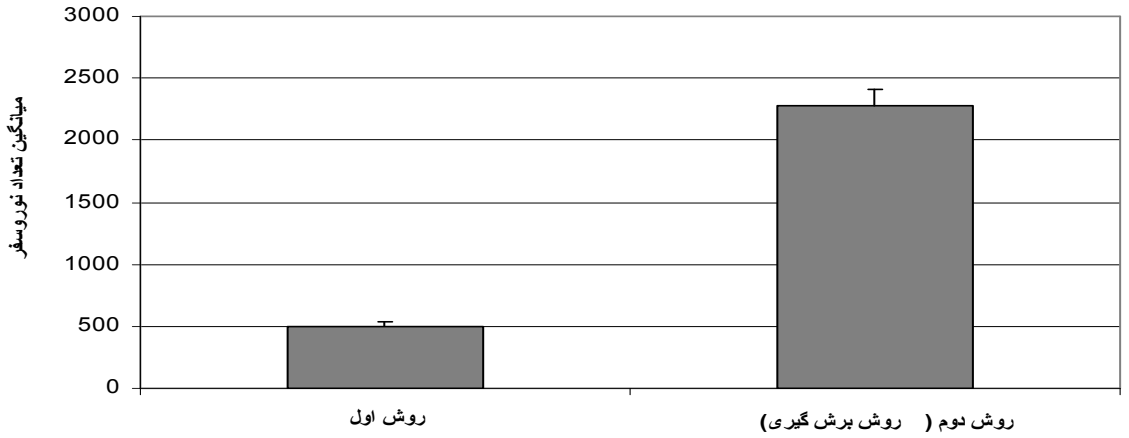
NSA ابتدا در سال ۱۹۹۲ توسط رینولدز و وایس بمنظور جدا سازی نوروسفرها از استریاتوم مغز موش بالغ استفاده شد [۷] و از آنجایی که بااستفاده از این روش می توان خاصیت نوسازی، تکثیر و قابلیت تمایز چند ظرفیتی موجود در سلول های بنیادی عصبی را

جدول ۲. تعداد نوروسفرهای حاصله ازکشت ناحیه تحت بطنی هرکدام از برش های ٤۰۰ میکرونی نیمه سری بطن های طرفی با استفاده از روش دوم یا روش برش گیری

شماره موش	تعداد نوروسفر در برش					جمع
	۱	۲	۳	٤	٥	
۱	۳۱۷	٦٥۰	۷٥٤	٦٥٦	۳٤۸	۲۷۱٦
۲	۱٦٦	۳۸۹	٤٥۱	٤۳٥	٤۰۰	۱۸٤۱
۳	۲۷٥	۲۷۲	۷۰۳	٥۹٦	۲۳٥	۲۰۸۱
٤	۲٤۳	٤۱۱	۷٦۹	٤۹٥	۳٦۰	۲۲۷۸
٥	۱۹٤	۳۸۲	۷۱۲	٦۱٤	٥٤۹	۲٤٥۱
میانگین	۲۳۹	٤۲۰/۸	٦۷٦	٥٥۹/۲	۳۷۸/٤	۲۲۷۳/٤



نمودار ۱. نمودار توزیع و فراوانی نوروسفرهای حاصله از ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی با استفاده از روش برش گیری که نحوه توزیع و فراوانی سلول های نوروسفرساز یا سلول های بنیادی عصبی را نیز در این ناحیه نشان می دهد . بیشترین تراکم این سلول ها دربرش شماره ۳ در فاصله ۰/۷٤میلی متری سمت سری نقطه برگما دیده می شود. شماره برش ها ترتیب آنها را از ناحیه سری به دمی مشخص می کند.



نمودار ۲ . میانگین تعداد نوروسفرهای حاصله از ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی در روش اول (ریتز و رینولدز) و دوم (برش گیری) . تعداد نوروسفرهای بدست آمده در روش برش گیری بسیار بیشتر از روش اول بوده و تفاوت معنی دار آماری بین این دو وجود دارد (P<۰/۰۰۰۱).

نشان داد، لذا این روش معمولا" به عنوان روشی استاندارد و معروف برای تشخیص و جدا سازی این سلول ها مورد استفاده قرار می گیرد[۹]. در این روش شرایطی فراهم می شود که سلول های بنیادی عصبی به طور مداوم تقسیم شده و کلونی های چند ظرفیتی تمایز نایافته ای بنام نوروسفر را ایجاد می کنند[۱۶،۱۵]. علیرغم اهمیت NSA هیچ پروتکل استانداردی برای مقایسه نتایج حاصله از تحقیقات مختلف که از این روش استفاده می نمایند، موجود نمی باشد [۹]. یکی از مواردی که می تواند باعث تفاوت در نتایج بدست آمده با این روش گردد، تنوع ترکیبات مورد استفاده در محیط کشت NSA می باشد [۹].

به عنوان مثال رینولدز و وایس[۷] در مطالعات اولیه خود از محیط کشت فاقد سرم که محتوی ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر عامل رشد اپیدرمی (EGF) بود استفاده نمودند، در حالیکه در مطالعات دیگر از محیط کشت حاوی سرم نیز استفاده شده است [۱۸،۱۷]. عوامل میتوژن و هورمون ها نیز از جمله ترکیباتی هستند که با تنوع و غلظت های متفاوت در محیط های کشت مورد استفاده در NSA بکار برده می شوند [۹]. علاوه بر این عامل دیگری که ممکن است باعث ایجاد تفاوت در نتایج بدست آمده با روش NSA گردد، نحوه تشریح، جدا سازی و کشت مناطق مختلف سیستم عصبی مرکزی می باشد.در این مطالعه به منظور

بررسی این عامل، دو روش متفاوت برای تشریح، جداسازی و کشت ناحیه تحت بطنی بطن های طرفی در مغز موش بالغ به منظور تولید نوروسفر با استفاده از NSA مورد استفاده قرار گرفت و نتایج حاصله با همدیگر مقایسه گردید.

در روش اول که همان روش ریتز و رینولدز [۱۰] می باشد، ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی در مغزموش بالغ بطور یکپارچه خارج شده و با استفاده از روش NSA بصورت یک جا کشت داده می شود و پس از ۷ روز نوروسفرهای ایجاد شده شمارش شده و مورد ارزیابی قرار می گیرند.

در تحقیق حاضر ابتدا با استفاده از این روش میانگین تعداد نوروسفرهای حاصله از ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی بدست آمد (۷۳±۵۰۱) که با تعداد نوروسفرهای (۱۵۰ تا ۹۰۰ نوروسفربا میانگین ۵۰±۵۰۰) حاصله از این ناحیه با روش مشابه در مطالعات دیگر [۱۹-۱۱] مطابقت داشت. آنگاه این سوال مطرح گردید که آیا این تعداد نوروسفر ایجاد شده نماینده واقعی و مطلق سلول های بنیادی عصبی یا سلول های نوروسفرساز موجود در این ناحیه می باشد؟ به عبارت دیگرآیا تغییر در نحوه تشریح و کشت این ناحیه تغییری در تعداد نوروسفرهای بدست آمده از ناحیه فوق ایجاد می کند؟

به منظور پاسخ به این سوال از روش دوم که روشی جدیدتر و دقیق تر برای تشریح، جدا سازی و کشت ناحیه تحت بطنی بطن های طرفی بمنظور ایجاد نوروسفراز این ناحیه است، استفاده شد. در این روش بجای جدا سازی و کشت یکپارچه ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی، ابتدا برش های سریال ٤۰۰ میکرونی در مغز ایجاد شده و سپس نواحی زیر بطنی با دقت تمام و در زیر میکروسکوپ از برش های موجود در نیمه سری بطن های طرفی جدا گشته و بطور جدا گانه در محیط کشتی مشابه با محیط کشت مورد استفاده در روش ریتز و رینولدز کشت داده شدند. مقایسه میانگین تعداد نوروسفرهای بدست آمده در دو روش یاد شده نشان داد که تعداد نوروسفرهای ایجاد شده در روش دوم یعنی روش برش گیری بسیار بیشتر از روش اول بوده و تفاوت معنی دار آماری بین این دو وجود دارد ($P < ۰/۰۰۰۱$). بنابراین با توجه به یکسان بودن محیط کشت در هر دو روش مشخص می شود که نحوه تشریح، جدا سازی و کشت ناحیه زیر بطنی بطن های طرفی بر نتایج حاصله از این دو روش تاثیر گذار بوده و بنظر می رسد که روش برش گیری نسبت به روش معمول روشی دقیق تر، مناسب تر و کارآمد تر برای تولید نوروسفرهای بیشتر از ناحیه زیر بطنی بطن های طرفی می باشد.

علت ایجاد نوروسفر زیاد در روش برش گیری را می توان در مقایسه این روش با روش ریتز و رینولدز جستجو نمود؛ در روش برش گیری، تشریح ناحیه تحت بطنی در تمامی برش ها بطور جداگانه و با دقت تمام در زیر میکروسکوپ تشریح انجام می شود و بنابراین روشی مطمئن و قابل اعتماد برای جدا سازی دقیق ناحیه تحت بطنی بطن های طرفی می باشد. عامل دیگر احتمالاً مرگ سلولی بیشتر در روش اول می باشد. از آنجائیکه در این روش ناحیه زیر بطنی بصورت یکپارچه و یک جا برداشته می شود و برای ایجاد سوسپانسیون تک سلولی نیاز به هضم آنزیمی طولانی تر و عمل پی پت کردن شدیدتری (Trituration) می باشد، لذا بنظر می رسد که این روش نسبت به روش برش گیری تهاجمی تر بوده و احتمالاً منجر به مرگ سلولی بیشتری می شود.

عامل احتمالی دیگر برای ایجاد نوروسفر زیاد در روش برش گیری، کشت مجزای ناحیه زیر بطنی هر کدام از برش های ٤۰۰ میکرونی می باشد. در روش اول تمامی سوسپانسیون تک سلولی ایجاد شده از سراسر ناحیه زیر بطنی نیمه سری بطن های طرفی یکجا کشت داده می شوند، در حالیکه در روش برش گیری سلول های حاصل از ناحیه زیر بطنی هر برش بطور جدا گانه کشت داده می شوند و بنابراین به میزان بیشتری از مواد مغذی و عوامل لازم برای رشد و تکثیر برخوردار می باشند.

در این مطالعه همچنین با استفاده از روش برش گیری برای اولین بار نحوه توزیع و پراکندگی سلول های نوروسفرساز یا سلول های بنیادی عصبی در طول محور قدامی- خلفی نیمه سری بطن های طرفی مشخص گردید.

اگر چه وایس و همکاران [۲۰] با روش NSA و تولید نوروسفر، وجود سلول های نوروسفرساز یا سلول های بنیادی عصبی را در بافت های اطراف بطن های طرفی، سوم و چهارم و نیز قسمت های مختلف طناب نخاعی نشان داده و مشخص نمودند که بیشترین تراکم این سلول ها در بطن های طرفی و بخش لومبوساکرال طناب نخاعی می باشد، اما بدلیل کشت یکجای بافت دور بطنی اشاره ای به نحوه توزیع و پراکندگی این سلول ها در مناطق فوق نداشتند. اما در این مطالعه با روش برش گیری سریال در ناحیه بطن های طرفی و کشت مجزای ناحیه زیر بطنی هر کدام از برش ها، امکان تعیین الگوی توزیع و پراکندگی سلول های نوروسفر ساز یا سلول های بنیادی عصبی در طول محورقدامی- خلفی نیمه سری بطن های طرفی فراهم شده و مشخص گردید که توزیع این سلول ها درطول این محور یکسان نبوده و بیشترین تراکم در فاصله ۰/۷٤ میلی متری سمت سری نقطه برگما دیده می شود.

بنابراین در مجموع می توان گفت تغییر در نحوه تشریح وجداسازی و نیز نحوه کشت ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی بر نتایج حاصله یعنی تعداد نوروسفرهای بدست آمده از این ناحیه به روش NSA تاثیر می گذارد و روش برش گیری در مقایسه با روش کشت یکجای این ناحیه، بدلیل تولید نوروسفر زیاد روشی دقیق و کار آمد می باشد و بنظر می رسد که با استفاده از این روش با دقت و حساسیت بیشتری می توان تغییرات ایجاد شده در جمعیت نوروسفر ساز ناحیه تحت بطنی را در نتیجه تاثیر عوامل ژنتیک و اپی ژنتیک مختلف مورد بررسی و مطالعه قرار داد. ضمن اینکه روش برش گیری تعیین نحوه توزیع و پراکندگی سلول های نوروسفر ساز و سلول های بنیادی عصبی را نیز در طول محور قدامی-خلفی نیمه سری بطن های طرفی امکان پزیر نمود.

نتیجه گیری

روش برش گیری بدلیل تولید نوروسفر بیشتر از ناحیه تحت بطنی بطن های طرفی نسبت به روش اول یا روش کشت یکجای این ناحیه، روشی کار آمد و مناسب می باشد که می تواند بمنظور جداسازی و مطالعه سلول های بنیادی عصبی از این ناحیه مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به میانگین بالای نوروسفرهای ایجاد شده از برش سوم که در فاصله ۰/۷٤ میلی متری سمت سری نقطه برگما واقع شده است، بنظر می رسد که این منطقه نسبت به سایر مناطق ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی از تراکم بالایی از سلول های نوروسفر ساز و سلول های بنیادی عصبی برخوردار می باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از یک طرح مشترک بین دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و دانشگاه کوئینزلند استرالیا است که در طی سال های ۱۳۸۵-۱۳۸۳ در این دو دانشگاه انجام شده است. بدینوسیله از تمامی اعضای محترم موسسه تحقیقاتی مغز کوئینزلند(QBI) در دانشگاه کوئینزلند استرالیا و گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تقدیر و تشکر بعمل می آید.

References

1- Gross CG. Neurogenesis in the adult brain; death of a dogma. Nat Rev Neurosci 2000, 1(1):67-73.
2- Luskin M. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. Neuron 1993, 11(1):173-189.

3- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Mateo AS, Merchant-Larios H. Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. J Neurosci 1998, 18(3):1020-1037.
4- Reznikov KY. Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus. Adv Anat Embryol Cell Biol 1991, 122(1):1-74.
5- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. Nature 2004, 427(6976):740-744.
6- Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. Development. 1990, Dec; 110 (4): 1001-20.
7- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science 1992, 255(5052):1707-1710.
8- Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. Development 1989, 106(4):619-633.
9- Chaichana K, Zamora-Berridi G, Camara-Ouintana J, Quinones A. Neurosphere assays: growth factors and hormone defferences in tumor and nontumor studies. Stem cells. 2006,Dec; 24(12):2851-7.
10- Rietze RL, Reynolds BA. Neural stem cell isolation and characterization. Methods Enzymol 2006, 419:3-23.
11- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. J Neurosci 2004, 24(38):8354-8365.
12- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA et al. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. J Neurosci 2002, 22(2):437-445.
13- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. J Neurosci 1997, 17(20):7850-7859.
14- Paxinos G, Franklin KBJ. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed. Academic Press; San Diego, 2001.
15- Reynolds BA, Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. Nat Methods 2005, 2(5): 333-6.
16- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. Neuron 2002, 36(6):1021-1034.
17- Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB et al. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. Exp Neurol 1999, 156(2):333-344.
18- Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. Proc Natl Acad Sci USA. 1992, 89(18):8591-8595.
19- Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. Proc Nat Acad Sci USA 1993, 90(5):2074-2077.
20- Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson A et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. J Neurosci 1996b, 16 (23):7599-7609.