

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

E-mail: golmohammadi50@gmail.com

^۱ نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم تشریح داشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

^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 هدف: امروزه مشخص شده است که ناحیه تحت بطنی SVZ (Subventricular Zone) در سیستم بطنی مغز پستانداران بالغ دارای جمعیتی از سلول های بنیادی عصبی است که نورون ها و سلول های گلیال را ایجاد می کنند. به دلیل کمبود مارکرهای خاص برای شناسایی این سلول ها روش ایجاد نوروسفر NSA (Neurosphere Assay) در محیط آزمایشگاهی روشی منداوی و انتخابی برای جداسازی، مطالعه و درک بیولوژی سلول های بنیادی عصبی رویانی و بالغ می باشد. روش های مختلفی برای ایجاد نوروسفر از مناطق مختلف سیستم عصبی مرکزی از جمله بطن های طرفی مغز وجود دارد. هدف از این مطالعه ارایه راهکاری جدید و کار آمد برای تولید نوروسفر بیشتر از ناحیه تحت بطنی بطن های طرفی مغز موش بالغ با استفاده از روش NSA می باشد.

روش کار: ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی مغز موش بالغ با دو روش متفاوت تشریح و جداسازی شده و براساس روش نوروسفر کشت داده شدند. در روش اول (روش ریتز و رینولدز) این ناحیه بصورت یکپارچه جدا شده و پس از ایجاد سوسپانسیون تک سلولی بصورت یکجا کشت داده شد. در روش دوم یا روش برش گیری، پس از برداشتن برش های سریالی ۴۰۰ میکرونی مغز، ناحیه تحت بطنی از برش های نیمه سری بطن های طرفی جمع آوری شده و بطور جداگانه با استفاده از روش NSA کشت داده شدند. پس از هفت روز نوروسفرهای اولیه حاصله از دو روش شمارش شده و میانگین آنها با هم دیگر مقایسه گردید.

یافته ها: میانگین تعداد نوروسفرهای بدست آمده در روش برش گیری بسیار بیشتر از روش اول بود ($P < 0.0001$). توزیع و پراکندگی سلول های نوروسفرساز یا سلول های بنیادی عصبی در طول محور قدامی-خلفی نیمه سری بطن های طرفی بکسان نبوده و بالاترین تراکم این سلول ها در فاصله ۷۴/۰ میلی متری سمت سری نقطه برگما مشاهده گردید.

نتیجه گیری: روش دوم یا روش برش گیری بدلیل تولید نوروسفر زیاد از ناحیه تحت بطنی نسبت به روش اول یا روش کشت یکجا این ناحیه، روشی کار آمد و مناسب می باشد.

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

پذیرش: ۸۶/۷/۳

دربافت: ۸۶/۴/۲۱

مقدمه

بویایی (Olfactory bulb) و تشکیلات هیپوکامپ، نورون زایی اتفاق می افتد [۵،۱]. تولید مستمر و مدام اسلول های جدید در CNS حاکی از وجود اسلول های بنیادی عصبی، یعنی اسلول هایی که قابلیت تکثیر، نوسازی و ایجاد اسلول های تمایز یافته را دارند، می باشد [۶].

بر خلاف باور قدیمی مبنی بر حالت سکون در سیستم عصبی مرکزی (CNS)^۱ و عدم تولید اسلول های عصبی در این سیستم، امروزه کاملاً مشخص شده است که حداقل در دو ناحیه از مغز پستانداران بالغ یعنی پیاز

^۱ Central Nervous System

مطالعه قرار می‌گیرند. این مطالعه برآن است با معرفی روشی جدید و دقیق‌تر (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 NSA ناحیه تحت بطنی، بطن‌های طرفی با استفاده از CNS به مطالعه و مقایسه نتایج حاصله از دو روش فوق پردازد. به عبارتی دیگر ضمن بررسی تأثیر روش‌های جدا سازی بافت‌های عصبی و نحوه کشت آنها بر نتایج حاصله از دو روش فوق، روشی کارآمد و موثر جهت تولید نوروسفر بیشتر از ناحیه تحت بطنی بطن‌های طرفی ارایه نماید. همچنین در این مطالعه الگوی توزیع و پراکندگی سلول‌های نوروسفر ساز یا سلول‌های بنیادی عصبی در طول محور قدامی-خلفی نیمه سری بطن‌های طرفی نیز مشخص می‌شود.

روش کار

تشریح و جدا سازی ناحیه تحت بطنی، بطن‌های طرفی:

روش اول: در این روش که بر اساس شیوه ارایه شده توسط ریتز و رینولدز [۱۰] صورت پذیرفت، مous های نر ۶ تا ۸ هفته‌ای نژاد CBA با تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال (۱۲۰ mg/kg) و جابجایی مهره‌های گردنبه کشته شده و بلا فاصله مغز آنها از جمجمه خارج گردید. با استفاده از اسکالپل یک برش کرونال در پشت پیازهای بویایی و یک برش کرونال دیگر در محل کیاسماهی بنیانی ایجاد شد (شکل A.1). بخشی از مغز که در بین دو برش کرونال فوق واقع شده و محتوى نیمه سری بطن‌های طرفی بود برای کشت ناجیه تحت بطنی بطن‌های طرفی با روش NSA استفاده گردید. به منظور تشریح و جدا سازی ناجیه تحت بطنی، این بخش از مغز در وضعیتی قرار گرفت که سطح روستراخ آن به سمت پایین و سطح کودال آن رو به بالا باشد (شکل B.1).

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

در سال ۱۹۹۲، رینولدز و وايس با ابداع روشی بنام روش نوروسفر^۱ NSA با استفاده از یک محیط کشت فاقد سرم، وجود سلول‌های بنیادی عصبی را هم در مغز مous بالغ و هم در مغز رویان مous نشان دادند [۷]. در محیط کشت فاقد سرم، سلول‌های تمايز یافته CNS قادر به رشد و بقاء نبوده و از بین می‌روند در حالیکه سلول‌های بنیادی عصبی حتی در تراکم بسیار پائین سلولی نیز وارد فاز تکثیری شده و کلونی‌های چند ظرفیتی یا نوروسفرها را ایجاد می‌کنند که می‌توان با جدا سازی و کشت مجدد سلول‌های یک نوروسفر، نوروسفرهای ثانویه بیشتری را ایجاد نمود و چنانچه این سلول‌ها در محیط کشت تمايزی قرار گیرند به انواع سلول‌های اصلی CNS (عنی نورون، آستروپیت و الیگوئندروسیت تبدیل می‌شوند. بدین ترتیب رینولدز و وايس نشان دادند سلول‌هایی که جدا نموده اند ویژگی‌های اصلی سلول‌های بنیادی یعنی تکثیر، نوسازی و تمايز به سلول‌های بالغ و عملکردی را دارا می‌باشند [۸,۶].

اگر چه از سال ۱۹۹۲ تا کنون NSA بعنوان روشی انتخابی و استاندارد برای جدا سازی، مطالعه و درک بیولوژی سلول‌های بنیادی عصبی به شمار می‌رود، ولی هیچ پروتکل استانداردی برای مقایسه نتایج حاصله از تحقیقات مختلف که از این روش استفاده می‌نمایند، وجود ندارد و احتمال اینکه با تغییر محیط کشت، روش تشریح و جدا سازی بافت‌های عصبی و حتی نحوه کشت آنها نتایج متفاوتی بدست آید، بسیار زیاد می‌باشد [۹]. از جمله روش‌های ارایه شده برای جدا سازی سلول‌های بنیادی عصبی از ناجیه تحت بطنی بطن‌های طرفی مغز مous بالغ با استفاده از NSA روش ریتز و رینولدز^۲ می‌باشد [۱۰]. در این روش ناجیه تحت بطنی بطن‌های طرفی بصورت یک پارچه از نیمه سری بطن‌های طرفی جدا گشته و با استفاده از NSA بصورت یکجا کشت داده می‌شود و پس از هفت روز نوروسفرهای حاصله شمارش شده و مورد

¹ Neurosphere Assay

² Rits & Rinolds

برش ها ترتیب برش ها را از سمت سری به سمت دمی مشخص می کنند.

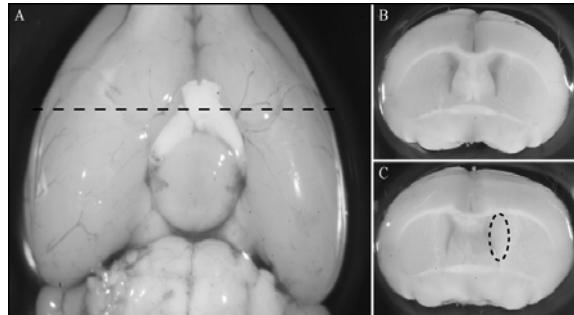
NSA: نواحی تحت بطئی جدا شده در روش اول و دوم با استفاده از هضم آنزیمی (Trypsin-EDTA) و مکانیکی به حالت سوسپانسیون تک سلولی در آمد. در روش اول بصورت یک جا و در روش دوم برای هر برش بصورت جداگانه در فلاسک های T25 کشت داده شدند، محیط کشت استفاده شده عبارت بود از: (Gibco) F-12 / DMEM (1:1)، ۵ میلی مولار بافر هیپز (Sigma)، ۰.۶٪ گلوکز (Sigma)، ۳ میلی مولار بیکربنات سدیم (Sigma)، ۲ میلی مولار ال-گلوتامین (Sigma) و ۰.۳۰ نانومولار سلنایت سدیم (sigma). به محیط فوق، فاکتورهای رشد (BD Bioscience) Roche، EGF با غلظت ۲۰ نانو گرم در میلی لیتر (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 از نوروسفرهای ایجاد شده با روش NSA. (A) بزرگنمایی $60\times$. (B) بزرگنمایی $40\times$.

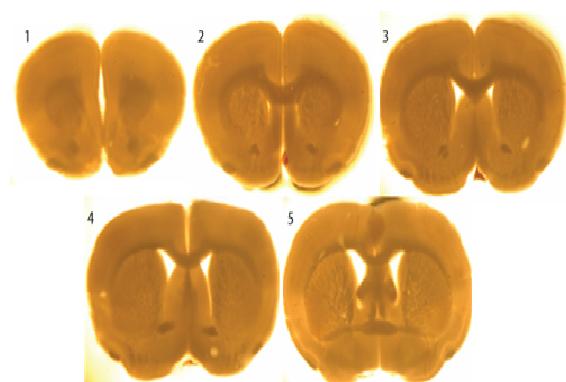
برای آنالیز داده ها از نرم افزار Prism 4.01، Independent Graphpad Inc. USA

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



شکل ۱. (A) نمای شکمی مغز موش بالغ که محل برش کرونال دوم بر روی کیاسماهی بینایی با خط چین مشخص شده است. (B) سطح روسترال نیمه قدامی مغز پس از ایجاد برش کرونال از محل کیاسماهی بینایی. (C) ناحیه تحت بطئی بطن طرفی که برای جداسازی سلول های بینایی 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 ویروتوم (vibratome) برش های کرونال $400\text{ }\mu\text{m}$ میکرونی بصورت سریال تهیه گردید. آنگاه با استفاده از یک اسکالپل و در زیر میکروسکوپ تشریح ناحیه تحت بطئی از برش های موجود در نیمه سری بطن های طرفی بصورت جداگانه خارج شده و جهت کشته با روش آماده سازی شد (شکل ۲).



شکل ۲. برش های $400\text{ }\mu\text{m}$ میکرونی ایجاد شده در ناحیه نیمه سری بطن های طرفی مغز موش بالغ. نواحی زیر بطئی هر کدام از برش های فوق پس از جدا سازی و تبدیل به سوسپانسیون تک سلولی با استفاده از روش NSA بطور جداگانه کشته داده شدند. شماره

های بدست آمده در این مطالعات بین حداقل ۱۵۰ تا حداکثر ۹۰۰ عدد متغیر بوده و میانگین تقریبی 500 ± 50 را می‌توان برای آنها در نظر گرفت [۱۳-۱۱]. همچنین در این مطالعه الگوی توزیع نوروسفرهای حاصل از کشت ناحیه تحت بطنی برش های ۴۰۰ میکرونی نشان داد که توزیع و پراکندگی نوروسفرها 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 ۰/۷۴ میلی متری سمت سری نقطه برگما می باشد [۱۴].

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 (نمودار ۲).

بحث

NSA ابتدا در سال ۱۹۹۲ توسط رینولدز و وايس 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

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 501 ± 73 و 2273 ± 349 بوده و تفاوت معنی دار آماری بین این دو روش وجود دارد ($P < 0.001$) (نمودار ۱).

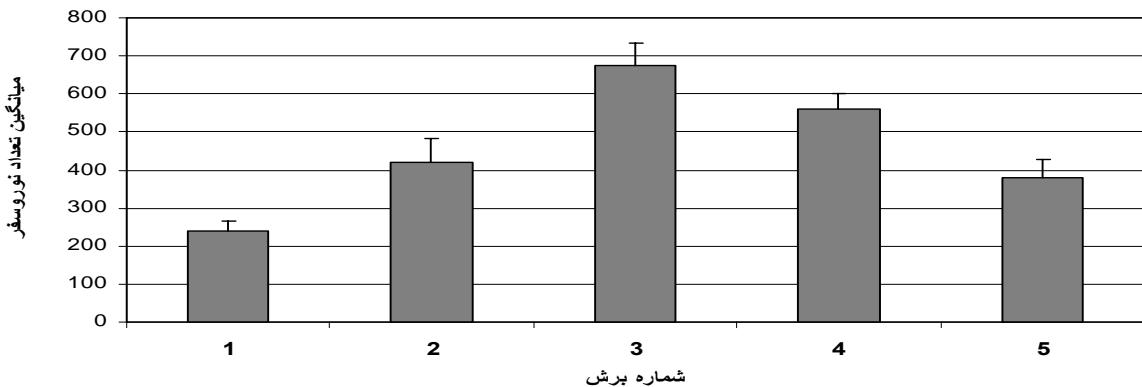
جدول ۱. تعداد نوروسفرهای حاصله از کشت ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی با استفاده از روش اول (روش ریتز و رینولدز)

شماره موش	تعداد نوروسفر
۱	۴۵۵
۲	۳۹۸
۳	۵۲۴
۴	۵۵۰
۵	۵۸۰
میانگین	۵۰۱/۴

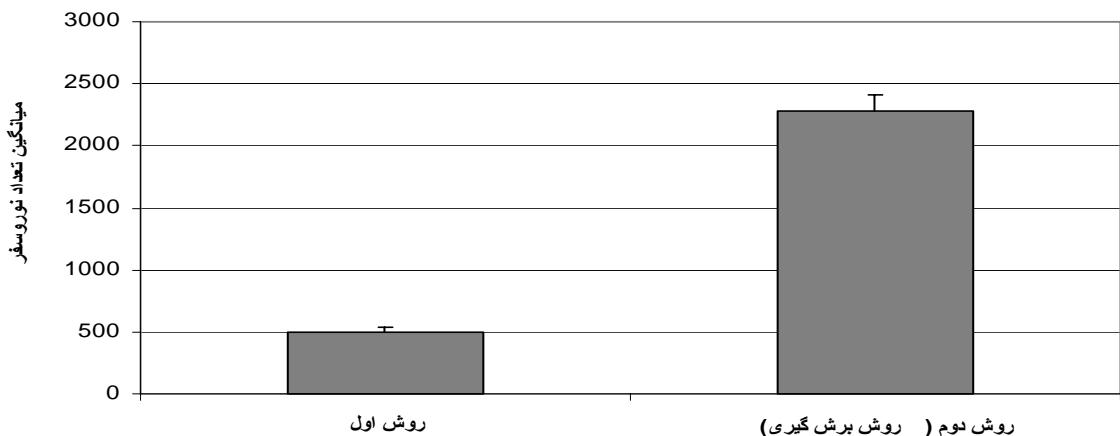
بررسی نتایج حاصل از مطالعاتی که بمنظور تولید نوروسفر از ناحیه تحت بطنی بطن های طرفی از روشی مشابه روش اول (روش ریتز و رینولدز) استفاده نموده اند نیز نشان می دهد که مجموعه نوروسفر

جدول ۲. تعداد نوروسفرهای حاصله از کشت ناحیه تحت بطنی هر کدام از برش های ۴۰۰ میکرونی نیمه سری بطن های طرفی با استفاده از روش دوم با روش گیری

شماره موش	تعداد نوروسفر در برش					جمع
	۵	۴	۳	۲	۱	
۱	۳۱۷	۶۵۰	۷۵۴	۶۵۶	۳۴۸	۲۷۱۶
۲	۱۶۶	۳۸۹	۴۵۱	۴۳۵	۴۰۰	۱۸۴۱
۳	۲۷۵	۲۷۲	۷۰۳	۵۹۶	۲۳۵	۲۰۸۱
۴	۲۴۳	۴۱۱	۷۶۹	۴۹۵	۳۶۰	۲۲۷۸
۵	۱۹۴	۳۸۲	۷۱۲	۶۱۴	۵۴۹	۲۴۵۱
میانگین	۲۳۹	۴۲۰/۸	۶۷۶	۵۵۹/۲	۳۷۸/۴	۲۲۷۳/۴



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 در برپوش شماره ۳ در فاصله ۷۴/میلی 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 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 ($P<0.001$).

به عنوان مثال رینولدز و وايس [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 [۱۷، ۱۸]. عوامل میتوژن و هورمون ها نیز از جمله ترکیباتی هستند که با تنوع و غلظت های مختلف 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 بددست آمده با روش NSA گردد، نحوه تشریح، جدا سازی و کشت مناطق مختلف سیستم عصبی مرکزی می باشد. در این مطالعه به منظور

نشان داد، لذا این روش معمولاً "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 [۱۵، ۱۶]. 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 بددست آمده با این روش گردد، تنوع ترکیبات مورد استفاده در محیط NSA کشت می باشد [۹].

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 ($P < 0.0001$). 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 روشنی 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 میکروسکوب تشریح انجام می شود و بنابراین روشنی 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 آنجاییکه 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 4×4 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.

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 هم دیگر 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 50.1 ± 7.3 (۵۰.۱±۷.۳) که با تعداد نوروسفرهای 150 تا 900 نوروسفربا میانگین 50.0 ± 5 (۵۰.۰±۵) حاصله از این ناحیه با روش مشابه در مطالعات دیگر [۱۱-۱۹] 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 دیگر آیا 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 نوروسفر این ناحیه است، استفاده شد. در این روش بحای جدا سازی و کشت یکپارچه ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی، ابتدا برش های سریال 4×4 میکرونی در مغز ایجاد شده و سپس نواحی زیر بطنی با دقت تمام و در زیر میکروسکوب 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

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 پذیر 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 کارآمد 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 ۰/۷۴ 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 تقدير و تشکر بعمل می آید.

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

اگر چه واپس و همکاران [۲۰] با روش NSA و تولید نوروسفر، وجود سلول های نوروسفر ساز 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 لومبوسکرال 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 محور قدامی-خلفی نیمه سری بطن های طرفی فراهم شده و مشخص گردید که توزیع این سلول ها در طول این محور بکسان نبوده و بیشترین تراکم در فاصله ۰-۰/۷۴ میلی متری سمت سری نقطه برگما دیده می شود.

بنابراین در مجموع می توان گفت تغییر در نحوه تشریح و جداسازی و نیز نحوه کشت ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن های طرفی بر نتایج حاصله یعنی تعداد NSA تاثیر می گذارد و روش برش گیری در مقایسه با روش کشت یکجای این ناحیه، بدلیل تولید نوروسفر زیاد روشی دقیق و کارآمد می باشد و بنظر می رسد که با استفاده از این روش با دقت و حساسیت بیشتری

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-Oquintana J, Quinones A. Neurosphere assays: growth factors and hormone differences 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.