

اثر مایع مغزی-نخاعی جنینی بر توانایی تکثیر و حفظ حالت بنیادی پروژنیاتورهای عصبی رت نژاد ویستار

سیامک یاری Ph.D.^{*}، کاظم پریور Ph.D.^۱، محمد نبیونی Ph.D.^۱، محمد کرامتی پور Ph.D.^۲

۱- دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: yarisiamak@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲۱

چکیده

هدف: در سال‌های اخیر شواهد چندی، نقش تکوینی برای مایع مغزی-نخاعی قابل شده‌اند. در این مطالعه تاثیر مایع مغزی-نخاعی جنینی بر توانایی تکثیر و ویژگی‌های بنیادی بودن سلول‌های پروژنیاتور عصبی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کورتکس جنین‌های ۱۵/۵ روزه رت نژاد ویستار در شرایط استریل جدا و به‌روش آنزیمی به سوسپانسیون سلولی تبدیل گشت. سپس سلول‌ها با تراکم ۵۰ الی ۱۰۰ سلول در هر میکرولیتر محیط کشت DMEM/F12 حاوی مکمل N2 و فاکتور رشد EGF و FGF-2 کشت داده شد. در گروه کنترل فقط از محیط کشت استاندارد استفاده شد در حالی که گروه‌های آزمایشی با مایع مغزی-نخاعی روزهای مختلف جنینی (۱۶، ۱۸ و ۲۰) به نسبت ۱۰ به ۱۰۰ (حجمی-حجمی) تیمار شدند. شمارش تعداد نوروسفرها و بیان مارکر ویمنتین جهت بررسی توانایی تکثیر و حالت بنیادی مورد استفاده قرار گرفت. میزان بقای سلولی با استفاده از تست MTT سنجیده شد. نتایج بدست آمده از طریق آزمون آنالیز واریانس یک طرفه بررسی شد.

نتایج: مایع مغزی-نخاعی جنینی روزهای ۱۶ و ۱۸ تعداد نوروسفرها و همچنین میزان بقای سلولی را افزایش داد.

نتیجه‌گیری: مایع مغزی-نخاعی جنینی روزهای مختلف جنینی به صورت وابسته به زمان تاثیرات متفاوتی بر تکثیر و بقای سلول‌های پروژنیاتور عصبی می‌گذارند. همچنین این مایع حالت بنیادی سلول‌های پروژنیاتور عصبی را در حالت بنیادی تثبیت می‌کند.

واژگان کلیدی: مایع مغزی-نخاعی جنینی، نوروسفر، تزاید سلولی

مقدمه

در طی فرآیند نورولاسیون با جوش خوردن چین‌های عصبی، مایع آمنیوتی درون لوله عصبی شکل گرفته، محبوس می‌شود و از این مقطع زمانی به بعد به این مایع عنوان مایع مغزی-نخاعی اطلاق می‌شود (۱). در مراحل بعدی رشد و نمو جنینی سلول‌هایی که سطح داخلی لوله عصبی را پوشش می‌دهند شروع به ترشح مایع مغزی-نخاعی می‌کنند و در مراحل بعدی با پیشرفت تکوین جنین گروهی از سلول‌های اپی‌تلیالی تخصص یافته در موقعیت سقف بطن‌های مغز جنین شروع به شکل‌گیری می‌کنند که این سازمان بافتی، شبکه کورویئیدی نامیده می‌شود و در ادامه حیات جانور نقش اصلی ترشح مایع مغزی نخاعی را بر عهده می‌گیرد (۲). در دهه‌های گذشته مطالعات دانشمندان اغلب بر روی عمل‌کردهای فیزیولوژیکی این مایع استوار بود. لذا وظایفی شامل حذف سموم متابولیکی، ممانعت از تاثیرات مخرب ضربات فیزیکی به واسطه نقش هیدروستاتیکی که این مایع با پخش کردن نیروهای وارده ایفا می‌کند و همچنین ایجاد حالت بافبری در برابر ضربان‌های سرخرگی و بسیاری اعمال دیگر که با ویژگی‌های هیدروستاتیکی مایع مغزی نخاعی مرتبط می‌باشد (۳ و ۴).

در سال‌های اخیر نقش تکوینی مایع مغزی نخاعی مورد توجه قرار گرفت. Miyam و همکاران (۳) نشان دادند که مایع مغزی نخاعی نقش حیاتی در تکوین سیستم عصبی مرکزی بر عهده دارد.

مطالعات نشان داد که در بسیاری از بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی شامل مالتیپل اسکلروزیس و آلزایمر میزان فاکتورها و مورفوزن‌های حاضر در مایع مغزی نخاعی تفاوت فاحشی نسبت به حالت طبیعی را به نمایش می‌گذارد (۵، ۶ و ۷). همچنین در گروهی دیگر از بیماری‌های عصبی شامل هیدروسفالی و اسپینا بیفیدا به علت اختلال در جریان مایع مغزی-نخاعی آسیب‌های شدید و غیرقابل برگشتی به تکوین طبیعی مغز جنین و نوزاد بعد از تولد وارد می‌شود (۸ و ۹).

مطالعات پروتئومیکی مایع مغزی-نخاعی جنینی تفاوت معنی‌داری را از لحاظ محتوای پروتئینی و همچنین میزان فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های موجود در آن، نسبت به مایع مغزی نخاعی جانور بالغ نشان می‌دهد. همچنین مطالعات نشان

داده است که این ویژگی (تفاوت محتوی پروتئینی مایع مغزی-نخاعی جنین به بالغ) در اکثر گونه‌های مهره‌داران شامل پرندگان، جوندگان و پستانداران مشاهده می‌شود (۱۰ و ۱۱).

شواهد نشان داده است که ظهور نخستین نورون‌ها در قشر مخ جنین انسان در مرحله کارنگی ۲۱ (CS 21) صورت می‌گیرد که از لحاظ زمانی تقریباً با شروع شکل‌گیری شبکه کورویئیدی و تولید CSF مقارن است (۱۲). این تقارن زمانی در رابطه با شکل‌گیری شبکه کورویئیدی و آغاز کورتیکوژنسیس، در سایر گونه‌های جانوری نظیر موش و رت نیز صدق می‌کند (۱۲).

در این مطالعه سعی بر آن شده است که تاثیر مایع مغزی نخاعی جنین‌های روزهای مختلف رت نژاد ویستار بر روی پروژنیوتورهای عصبی برگرفته از جنین رت مورد سنجش و ارزیابی قرار گیرد و تغییرات رفتار سلول‌های تیمار شده از نظر رشد و تکثیر و همچنین ویژگی‌های فنوتیپی به‌طور مقایسه‌ای ارزیابی قرار شود.

مواد و روش‌ها

حیوانات: رت‌های نژاد ویستار مورد آزمایش در این مطالعه از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی فراهم شد. تمامی آزمایش‌ها بر اساس قوانین اخلاقی مورد تایید دانشگاه خوارزمی صورت گرفت. در این مطالعه جنین‌های رت نژاد ویستار جهت جداسازی سلول‌های پروژنیوتور عصبی و همچنین جمع‌آوری مایع مغزی نخاعی مورد استفاده قرار گرفتند، به‌طوری‌که از جنین‌های روزهای ۶۱، ۸۱ و ۰۲ جهت جمع‌آوری مایع مغزی-نخاعی و از جنین‌های ۵۱/۵ روزه برای انجام کشت سلولی استفاده شد. روز مشاهده پلاک واژنی به‌عنوان روز صفر جنینی تلقی شد.

جمع‌آوری مایع مغزی-نخاعی: رت‌های حامله با تزریق فنوباربیترات سدیم کشته شدند و جنین‌های روزهای ۱۶، ۱۸ و ۲۰ از رحم رت حامله در شرایط کاملاً استریل خارج و به پتری‌های حاوی SBP سرد منتقل شدند. در ادامه با استفاده از لوله موئین استریل مایع مغزی نخاعی جنین‌های روزهای مختلف از محل *angam anretsic* و با استفاده از خاصیت موئینگی، جمع شد. لوله‌های حاوی مایع مغزی-نخاعی در طی مراحل جمع‌آوری در محیط ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از اتمام کار جمع‌آوری مایع مغزی-نخاعی، میکروتیوب‌های حاوی

با مایع مغزی-نخاعی روزهای مختلف جنینی جمع‌آوری می‌شود و به‌حالت سوسپانسیون سلولی درآورده شد. سپس سوسپانسیون سلولی به طرف‌های اندودشده با (Sigma) poly-L-lysine منتقل شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف، محیط کشت رویی سلول‌ها خارج و بعد از شستشوی سلول‌ها با PBS، با پارافرمالدهید ۴ درصد فیکس شدند.

در ادامه سلول‌ها با تریتون X-۱۰۰ (Sigma-USA) نفوذپذیر و با BSA آنتی‌ژن‌های غیراختصاصی بلوکه شدند. در نهایت سلول‌ها با آنتی‌بادی اولیه ویمنتین (Abcam-(Vimentin) (UK) با غلظت ۱/۵۰۰ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سلول‌ها بعد از شستشو به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با آنتی‌بادی ثانویه کوئزوگه شده با Cy3 (Abcam-UK) با غلظت ۱/۳۰۰ انکوبه گردیدند. سپس هسته سلول‌ها با پروپیدیم دیدید (Propidium Iodide=PI) (Sigma-USA) ۱/۱۵۰۰ رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ فلورسانس (Olympus, Tokyo, Japan) عکسبرداری شدند.

گروه‌بندی کشت‌های سلولی: کشت‌های سلولی به گروه‌های مختلف تقسیم شد. در گروه کنترل فقط از محیط کشت استاندارد جهت کشت نوروسفرها استفاده شد. و در گروه‌های آزمایشی از CSF های روزهای جنینی مختلف جهت تیمار کشت‌های سلولی استفاده شد. غلظت مورد استفاده CSF در تمامی گروه‌های آزمایشی ۱۰ درصد حجمی/حجمی بود.

آنالیزهای آماری: جهت آنالیزهای آماری از آزمون One-way ANOVA و Tukey's استفاده شد. داده‌ها به شکل میانگین \pm SEM بیان شدند و معنی‌داری میانگین‌ها با $P < 0.05$ نشان داده شدند.

نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مایع مغزی-نخاعی جنینی جمع‌آوری شده از روزهای مختلف جنینی، تاثیرات متفاوتی را بر رفتار تکثیری سلول‌های پروژنیاتور جنینی برجای می‌گذارند. آزمایشات نشان داد که تعداد نوروسفرهای موجود در گروه‌های تیمار شده با مایع مغزی نخاعی جنینی در روز ۱۶ و ۱۸ به طور معنی‌داری نسبت به نوروسفرهای گروه کنترل که تنها با عوامل میتوژنیک تیمار شده بودند، افزایش پیدا کرده است. همچنین یافته‌ها حاکی از آن است که تعداد نوروسفرهای

این مایع، در ۰۰۰۴۱ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا هرگونه بقایای سلول‌های مرده و سلول‌های خونی احتمالی موجود در آن ته نشین شود. سپس مایع شفاف رویی به لوله‌های استریل جدید منتقل شد. تجربه نشان داده است که از هر جنین به‌طور متوسط ۰۱ الی ۰۵ میکرولیتر مایع مغزی-نخاعی می‌توان گردآوری نمود. پس از اتمام کار جمع‌آوری، نمونه‌های جمع‌آوری شده به فریزر ۰۸- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند تا در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

کشت سلولی: رت‌های بارداری در روز حاملگی ۱۵/۵ با استفاده از تزریق درون صفاقی دوز بالای فنوباریتورات سدیم کشته شدند. سپس رحم‌ها در شرایط کاملاً استریل خارج شده و به پتری‌های حاوی PBS سرد منتقل شدند. در ادامه کورتکس‌های جدا شده از مغز جنین با استفاده از آنزیم تریپسین-EDTA (Invitrogen) به‌حالت سوسپانسیون سلولی در آمد. سوسپانسیون سلولی در ظرف ۲۴ خانه‌ای (Nunc) حاوی محیط کشت DMEM/ F12 و مکمل N2 (هر دو از Invitrogen) و یک درصد آنتی‌بیوتیک (Invitrogen) و همچنین فاکتورهای رشد FGF2 (20 ng/ml) و EGF (20 ng/ml) کشت داده شدند (هر دو از Invitrogen).

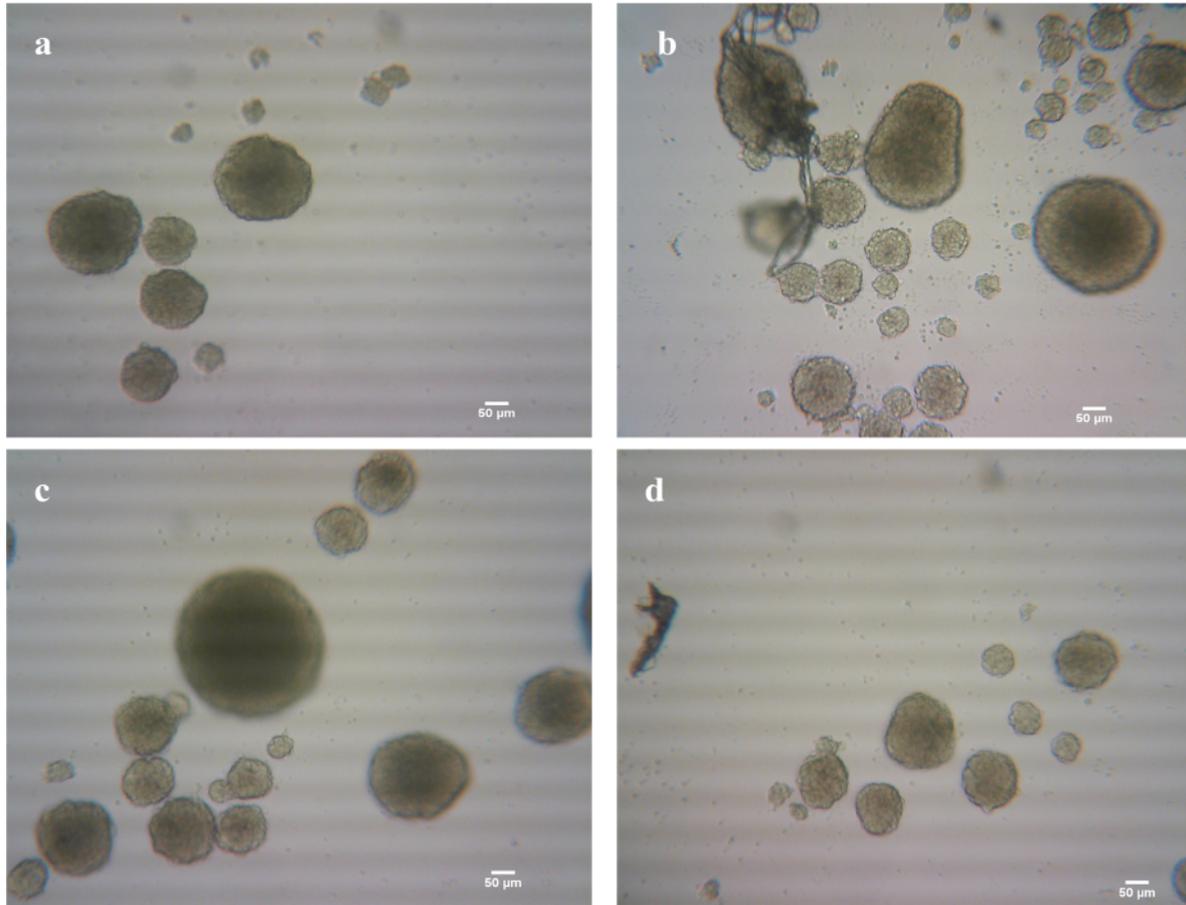
تعداد نوروسفرها: پس از گذشت ۴ روز از شروع کشت پروژنیاتورها در گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با مایع مغزی-نخاعی روزهای مختلف جنینی، از کشته‌ها با ابژکتیو $\times 10$ عکسبرداری بعمل آمد. سپس با استفاده از نرم افزار تحلیل تصاویر تحت عنوان J image تعداد نوروسفرها در تصاویر مختلف شمارش شد و در ادامه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

تست MTT: رشد و بقای سلولی با استفاده از روش بیوشیمیایی MTT سنجیده شد. در این روش، کاهیدگی MTT (Sigma) به کریستال‌های فومارازان (در نتیجه تاثیر آنزیم‌های دهیدروناز میتوکندری‌های سلول‌های زنده) صورت می‌گیرد و بدین ترتیب به‌عنوان یک شاخص بقای سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کریستال‌های فومارازان ایجاد شده سپس در ایزوپروپانول اسیدی حل و میزان جذب نوری این محلول با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

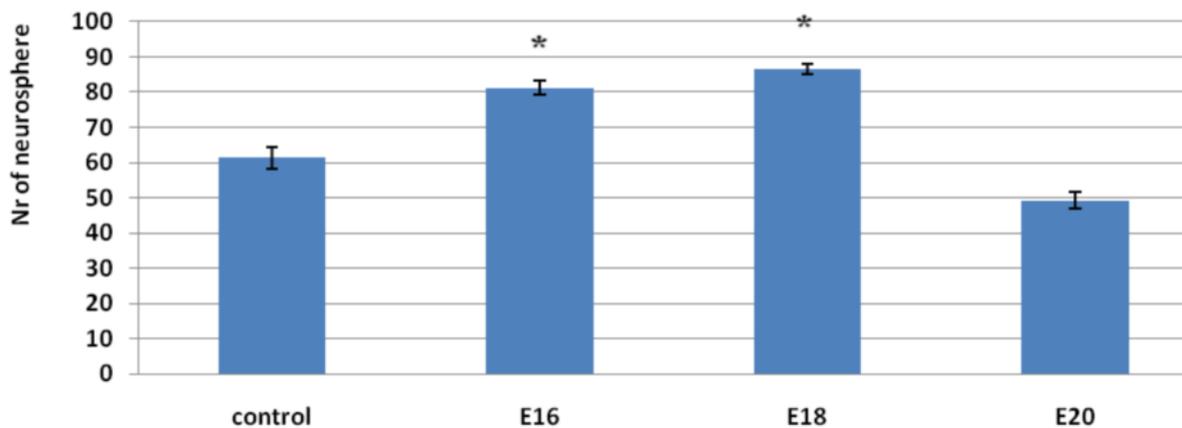
ایمونوسیتوشیمی: جهت بررسی بیان مارکر سلول‌های بنیادی عصبی (Vimentin) نوروسفرهای گروه‌های کنترل و تیمار شده

نوروسفرها رابطه مستقیمی با توانایی تکثیر سلول‌های تشکیل دهنده آن داشت و همچنین نشانگر حفظ حالت بنیادی این سلول‌ها بود.

موجود در گروه‌های تیمار شده با مایع مغزی-نخاعی جنینی روز ۲۰ام جنینی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۱ و نمودار ۱). مشاهدات نشان داده است که تعداد



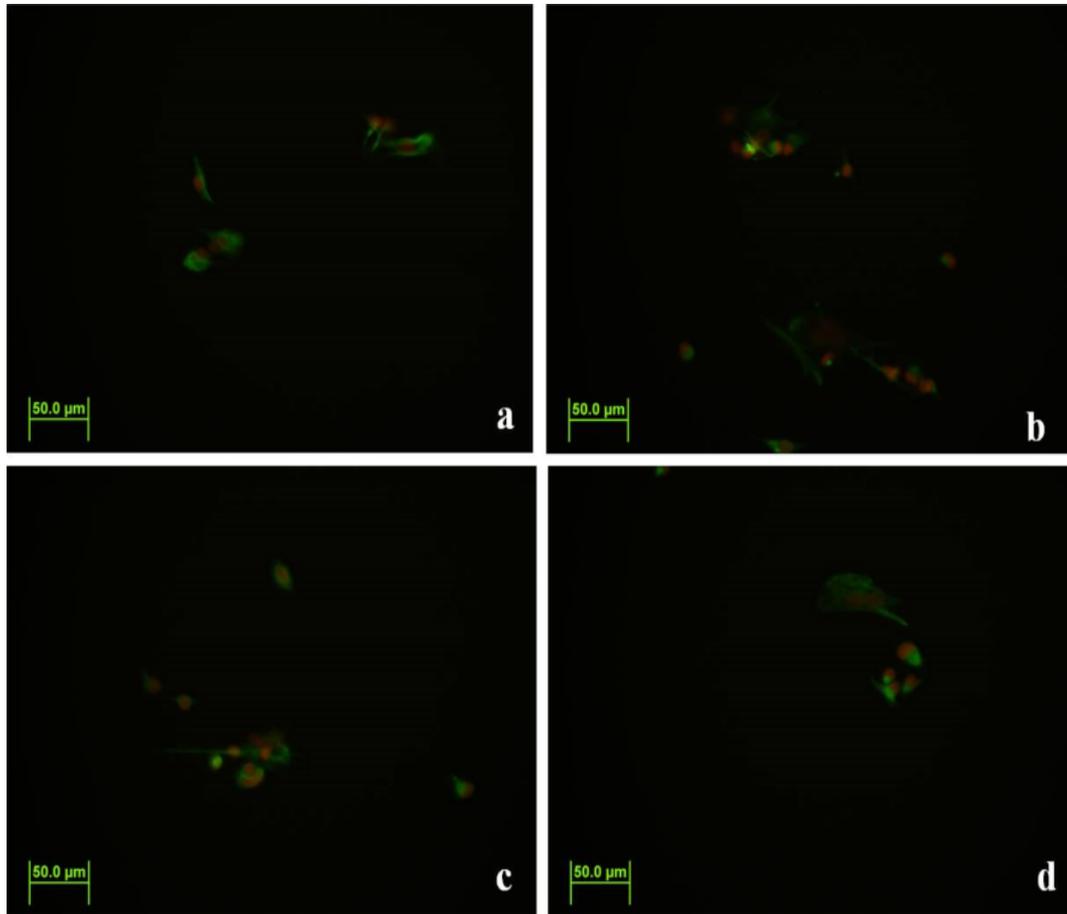
شکل ۱: تاثیر مایع مغزی-نخاعی روزهای مختلف جنینی بر تعداد نوروسفرها (a) نوروسفرهای کشت داده در گروه کنترل که به مدت ۴ روز فقط در حضور عوامل رشد (شامل EGF و FGF-2) رشد داده شده‌اند. (b و c) به ترتیب نوروسفرهای کشت داده شده در حضور مایع مغزی-نخاعی روزهای ۱۶، ۱۸، و ۲۰ جنینی.



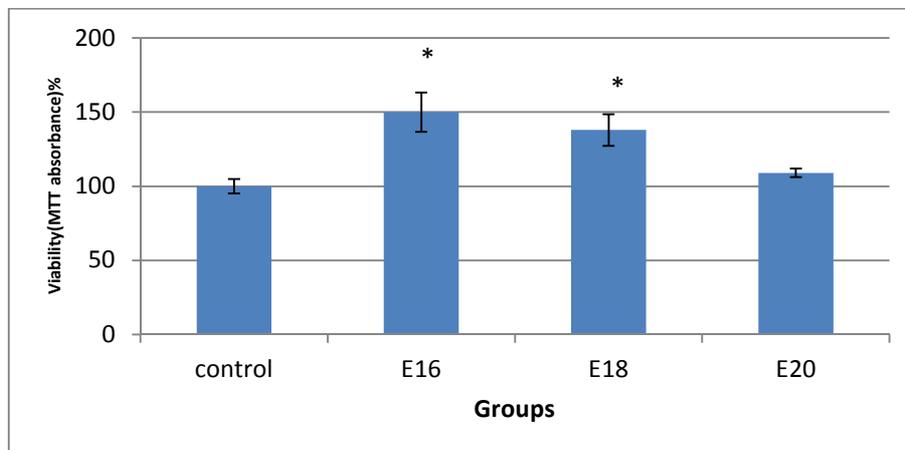
نمودار ۱: تاثیر مایع مغزی-نخاعی جنینی بر تعداد نوروسفرها را تحت شرایط ذکر شده نمایش می‌دهد (E16، E18، E20 شرایط کشت تحت تاثیر مایع مغزی-نخاعی جنینی روزهای ۱۶، ۱۸، و ۲۰ جنینی و control شرایط کشت فقط در حضور عوامل رشد را نشان می‌دهد).

به‌عنوان یک مارکر فنوتیپی شاخص برای بنیادی بودن سلول‌های پروژنیاتور و عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج نشان داد که سلول‌های تیمار شده با مایع مغزی-نخاعی جنینی روزهای مختلف جنینی توانایی بیان این مارکر را دارا می‌باشند (شکل ۲).

یافته‌های ایمنوسیتوشیمی نشان داد که مایع مغزی-نخاعی جنینی روزهای مختلف جنینی در حفظ حالت بنیادی پروژنیاتورهای عصبی موثر است. مارکر سلول‌های بنیادی عصبی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت ویمنتین بود که



شکل ۲: تاثیر مایع مغزی-نخاعی جنینی بر بیان پروتئین ویمنتین (به‌عنوان مارکر سلول‌های بنیادی عصبی). (a) سلول‌های مشتق از نوروسفرهای گروه کنترل که فقط تحت تاثیر عوامل رشد (شامل EGF و FGF-2) قرار گرفته‌اند. b, c, d به ترتیب سلول‌های مشتق از نوروسفرهای متاثر از مایع مغزی-نخاعی روزهای ۱۶، ۱۸، و ۲۰ جنینی را نمایش می‌دهد. ویمنتین با رنگ سبز و هسته‌ها به رنگ قرمز که توسط پروپیدیوم یدید (PI) رنگ‌آمیزی شده‌اند دیده می‌شوند.



نمودار ۲: قدرت رشد و بقای پروژنیاتورهای عصبی سنجش شده با تست MTT. E16، E18 و E20 شرایط کشت تحت تاثیر مایع مغزی-نخاعی جنینی روزهای ۱۸، ۱۶، و ۲۰ جنینی و control شرایط کشت فقط در حضور عوامل رشد را نشان می‌دهد.

نتایج بررسی بقای سلولی که بوسیله تست MTT مورد بررسی قرار گرفت نیز نشان داد که میزان بقای سلولی سلول‌های پروژنیاتور عصبی تیمار شده با مایع مغزی-نخاعی جنینی ۱۶ و ۱۸ به‌طور معنی‌داری نسبت به سلول‌های گروه کنترل افزایش پیدا کرده است (نمودار ۲).

بحث

نتایج ارائه شده در این مطالعه نشان داد که مایع مغزی-نخاعی جنینی توانایی تنظیم تکثیر و بقای پروژنیاتورهای عصبی را دارا می‌باشد. همچنین نتایج حاکی از آن است که مایع مغزی-نخاعی جنینی دارای الگوی تغییر وابسته به زمان می‌باشد و لذا مایع استخراج شده از روزهای مختلف جنینی، تاثیرات متفاوتی را بر رفتار پروژنیاتورهای عصبی به‌جا می‌گذارد.

این یافته‌ها، نتایج تحقیقات قبلی که به‌صورت *in vivo* و *in vitro* انجام گرفته است را تأیید می‌نماید. در واقع شواهد فراوانی در سال‌های اخیر به‌دست آمد که نشان‌دهنده نقش انکارناپذیر مایع مغزی-نخاعی در شرایط طبیعی همچنین حالت‌های مختلف پاتولوژیکی مغز، می‌باشد (۱۳ و ۱۴).

در این مطالعه از سلول‌هایی پروژنیاتور عصبی که به‌حالت نوروسفر کشت داده می‌شوند به‌عنوان مدلی برای بررسی تاثیرات مایع مغزی نخاعی جنینی بر آن‌ها استفاده شد. در این روش برخلاف سایر روش‌های گذشته، سلول‌های تشکیل‌دهنده نوروسفرها تقریباً جمعیت همگنی را از نظر سرنوشت سلولی تشکیل می‌دهند (۱۵). روش‌های قبلی اکثراً از روش‌هایی استفاده شده بود که در آن‌ها مجموعه ناهمگنی از سلول‌ها حضور داشتند. (۱۳ و ۱۶)

داده‌های این مطالعه نشان‌دهنده افزایش معنی‌داری در تعداد نوروسفرهای کشت‌های تیمار شده با مایع مغزی-نخاعی جنینی روزهای ۱۶ و ۱۸، در مقایسه با گروه کنترل بود. مطالعات نشان داده که تعداد نوروسفرها رابطه مستقیمی با توانایی بنیادی بودن سلول‌های عصبی و قدرت تکثیر آن‌ها دارد (۱۷). لذا این نتایج قویاً پیشنهاد می‌کند که مایع مغزی-نخاعی نقش مهمی در تنظیم توانایی تکثیر و self-renewal پروژنیاتورهای عصبی دارا می‌باشد.

همچنین داده‌های ایمونوسیتوشیمیایی نشان داد که در گروه‌های تیمار شده با مایع مغزی-نخاعی جنینی تفاوت معنی‌داری با گروه‌های کنترل از لحاظ بیان ویمنتین (بعنوان مارکر سلول‌های

بنیادی عصبی) دیده نمی‌شود (۱۸). یکی از ویژگی‌های محتوایی CSF مغز در حال تکوین، غلظت بالای پروتئین‌ها در آن می‌باشد (۱۹). در ابتدا برخی محققان حضور غلظت بالای پروتئین CSF جنینی را شاهی برای نارس بودن سد مغزی می‌دانستند (۲۰). در مغز در حال تکوین مکانیسمی در سلول‌های اپی‌تلیالی شبکه کوروئیدی وجود دارد که گذر پروتئین‌ها از پلازما به CSF را میسر می‌سازد که به دو روش صورت می‌گیرد. اولی به‌روش انتشار غیر فعال و دیگری روش اختصاصی که در مورد پروتئین‌های مختلف و در گونه‌های مختلف به شکل‌های مختلف انجام می‌گیرد (مانند آلبومین). این نوع پروتئین‌ها به صورت تکوینی تنظیم می‌شوند و با نهایی شدن تکوین به سرعت افت می‌کنند (۲۱).

پیوندهای محکم بین سلولی که در سلول‌های نوروایپلیالی وجود دارد باعث ایجاد سد مغزی می‌گردد و مانع از انتشار پروتئین‌های درون مایع مغزی-نخاعی به‌داخل فضای بین سلولی بافت مغز می‌گردد که تنظیم این امر نیز حالت وابسته به زمان می‌باشد (۲۲). این نوع پیوند با پیشرفت تکوین مغز و نزدیک شدن به زمان تولد ناپدید می‌شود و به موازات آن غلظت پروتئین داخل CSF نیز افت می‌کند. شواهد حاکی از آن است که بیشترین غلظت محتوای پروتئینی CSF مقارن با بیشترین مقدار نورون زایی (تکثیر) و تشکیل صفحه قشری (cortical plate) در مغز جلویی می‌باشد (۲۱).

نتایج حاصل از تست MTT نیز نشان داد که پروژنیاتورهای عصبی تیمار شده با مایع مغزی نخاعی قدرت تکثیر و بقای بیشتری را نسبت به گروه کنترل دارا می‌باشند.

با توجه به عمل‌کردی که مایع مغزی-نخاعی جنینی در حفظ حالت بنیادی پروژنیاتورهای عصبی دارا می‌باشد، لذا نیاز به تحقیقات دامنه‌دارتری احساس می‌شود که میزان دقیق فاکتورهای موثر بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی عصبی، حاضر در مایع مغزی نخاعی را مشخص سازند. با توجه به اینکه در بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی و همچنین ناهنجاری‌های جنینی که در تکوین سیستم عصبی مرکزی اختلال ایجاد می‌کنند، اختلالاتی در محتویات مایع مغزی نخاعی نیز ایجاد می‌شود. از این رو مطالعه بر روی عوامل موثر حاضر در مایع مغزی نخاعی و اثرات سینرژیک آن‌ها بر همدیگر می‌تواند به‌عنوان یک روش درمانی جایگزین پیشنهاد شود.

11. Zappaterra MD, Lisgo SN, Lindsay S, Gygi SP, et al. A Comparative Proteomic Analysis of Human and Rat Embryonic Cerebrospinal Fluid. *J. Proteome Res.* 2007; 6(9): 3537 – 3548.

12. O’Rahilly R, Muller F. *The Embryonic Human Brain: An Atlas of Developmental Stages.* New York: Wiley-Liss; 1994.

13. Gato A, Moro Ja, Alonso MI, Bueno D, et al. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat Rec Discov Mol Cell Evol Biol.* 2005; 284(1): 475-84.

14. Owen-Lynch PJ, Draper CE, Mashayekhi F, Bannister CM, et al. Defective cell cycle control underlies abnormal cortical development in the hydrocephalic Texas rat. *Brain.* 2003; 126(3): 623-31.

15. Reynolds B, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 1992; 255(5052): 1707-10.

16. Mashayekhi F, Salehi Z. The importance of cerebrospinal fluid on neural cell proliferation in developing chick cerebral cortex. *Eur J Neurol.* 2006; 13(3): 266-72.

17. Gritti A, Galli R, Vescovi A.L. Cultures of stem cells of the central nervous system. In: Federoff, S and Richardson, A (eds.) *Protocols for Neural Cell Culture.* Marcel Dekker, New York; 2001; 173–97.

18. Dahl D, Rueger DC, Bignami A, Weber K, et al. Vimentin, the 57,000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeleton component in immature glia. *Eur J Cell Biol.* 1981; 24:191–196.

19. Dziegielewska KM, Saunders NR. The development of the blood–brain barrier: proteins in fetal and neonatal CSF, their nature and origins. In: Meisami E, Timiras PS, editors. *Handbook of human growth and developmental biology.* Boca Raton: CRC. 1988; 1(A): 169–91.

20. Adinolfi M, Haddad SA. Levels of plasma proteins in human and rat fetal CSF and the development of the blood–CSF barrier. *Neuropadiatrie.* 1977; 8(4): 345–53.

21. Dziegielewska KM, Habgood MD, Møllgard K, Stagaard M, et al. Species-specific transfer of plasma albumin from blood into different cerebrospinal fluid compartments in the fetal sheep. *J Physiol.* 1991; 439: 215–37.

22. Møllgard K, Balslev Y, Lauritzen B, Saunders NR. Cell junctions and membrane specializations in the ventricular zone (germinal matrix) of the developing sheep brain: a CSF–brain barrier. *J Neurocytol.* 1987; 16: 433–44.

نتیجه گیری

مایع مغزی-نخاعی جنینی به‌طور وابسته به سن جنینی بر تکثیر و بقای سلولی نوروپروژنیوئورهای عصبی تاثیر می‌کند. همچنین مایع مغزی-نخاعی جنینی باعث حفظ حالت بنیادی نوروپروژنیوئورهای عصبی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی انجام گرفته است.

منابع

- Sadler, T.W. *Langman’s Medical Embryology*, 8th Ed; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, MD; 2000.
- Dziegielewska KM, Ek J, Habgood MD. Development of the Choroid Plexus. *Microsc Res Tech.* 2001; 52(1): 5-20.
- Miyan JA, Nabiyouni M, Zendah M. Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2003; 81 (4), 317-28.
- Segal MB. Extracellular and cerebrospinal fluid. *J Inherit Metabol Dis.* 1993; 16: 617-38.
- Palmert MR, Podlisny MB, Witker DS, Oltersdorf T, et al. The beta-amyloid protein precursor of Alzheimer disease has soluble derivatives found in human brain and cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci.* 1989; 86(16): 6338–6342.
- Hayashi Y, Kashiwagi K, Ohta J, Nakajima M, et al. Alzheimer Amyloid Protein Precursor Enhances Proliferation of Neural Stem Cells from Fetal Rat Brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 201(1): 936-943.
- Cid C, Alcazar A, Regidor I, Masjuan J, et al. Neuronal apoptosis induced by cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients correlates with hypointense lesions on T1 magnetic resonance imaging. *J Neurol Sci.* 2002; 193(2): 103-109.
- Cains S, Shepherd A, Nabiyouni M, Owen-Lynch PJ, et al. Addressing a folate imbalance in fetal cerebrospinal fluid can decrease the incidence of congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009; 68: 404-16.
- Mashayekhi F, Draper CE, Pourghasem M, Bannister CM, et al. Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas (H-Tx) rat: a role for cerebrospinal fluid. *Brain* 2002; 125: 1859-74.
- Parada C, Gato A, Aparicio M, Bueno D. Proteome analysis of chick embryonic cerebrospinal fluid. *Proteomics.* 2006; 6(1): 312-20.

Effect of Embryonic Cerebrospinal Fluid on Proliferation and Self-Renewal of Wistar Rat Neuroprogenitor Cells

Yari S .Ph.D ^{1*}, Parivar K .Ph.D ¹, Nabiuni M. Ph.D ¹, Keramatipour M. Ph.D ²

1. Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

2. Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Email corresponding author: yarisiamak@yahoo.com

Received: 9 Feb. 2013

Accepted: 30 Apr. 2013

Abstract

Aim: During recent years many studies have suggested some developmental roles for embryonic cerebrospinal fluid. Here we examined the effect of embryonic cerebrospinal fluid on proliferation and self-renewal of embryonic ventricular zone derived neurosphere.

Material and Methods: Cortex from 15.5 day old embryonic Wistar rat dissected out and enzymatically dissociated to form single cell suspension. Cell suspension seeded in DMEM/F12 medium supplemented with N2 and mitogenes (10ng.ml⁻¹ EGF and 20ng.ml⁻¹ bFGF). The CSF-treated culture from different embryonic ages (E16, E18, and E20) in 10/100 ratio (v/v) was considered as experimental groups. Neurospheres number was counted for proliferation assay and cell viability evaluated with MTT assay. The data were analyzed with One-way ANOVA with turkey's post hoc test.

Results: Embryonic cerebrospinal fluid (e-CSF) enhanced neurosphere number. Also, embryonic cerebrospinal fluid (e-CSF) enhanced cell viability and growth.

Conclusion: Embryonic cerebrospinal fluid (e-CSF) enhanced proliferation and viability of neural progenitor cells in age dependent manner. Moreover, this fluid play important role in establishment of neuroprogenitor cells self-renewal.

Keywords: Embryonic cerebrospinal fluid, Neurosphere, Proliferation