مجلـه دانشگـاه علـوم پـــزشکـی اردبیـل

دوره یازدهم، شماره سوم، پاییز1390، صفحات 246 الی 258

جداسازی سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز عصبی از مغز موش بالغ با روش ایجاد نوروسفر

دکتر محمد قاسم گل محمدی[1]، دکتر محسن سقا [2]، دکتر حسن آذری[3]، دکتر نوروز نجف زاده[4]

[1] استادیار گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

[2] نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

E-mail: m.sagha@arums.ac.ir

[3] استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران [4] استادیار گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی دسته‌ای از سلول‌های تمایز نیافته می‌باشند که قابلیت تمایز به انواع سلول‌های تخصص یافته را دارند. کشف این سلول‌ها در سیستم عصبی مرکزی پستانداران که تا مدتها پیش تصور می‌شد فاقد هرگونه قدرت ترمیم و بازسازی می‌باشد، امیدهای تازه‌ای را برای درمان بیماری‌های دژنراتیو سیستم عصبی مرکزی نظیر سکته مغزی، بیماری پارکینسون، آلزایمر و ضایعات نخاعی ایجاد نموده است. بدلیل اهمیت موضوع، تصمیم گرفته شد نحوه جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی از مغز موش بالغ با استفاده از روش ایجاد نوروسفر و تمایز آنها به سلول‌های بالغ سیستم عصبی توضیح داده شود.

روش کار: ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن‌های طرفی مغز موش بالغ تشریح و جداسازی شده و پس از ایجاد سوسپانسیون تک سلولی بر اساس روش ایجاد نوروسفر کشت داده شد. پس از هفت روز نوروسفرهای اولیه حاصله شمارش شده و میانگین تعداد آنها بدست آمد. تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به سلول‌های بالغ سیستم عصبی با قرار دادن سلول‌های بدست آمده از نوروسفرها در محیط کشت تمایزی انجام شد و بمنظور تشخیص این سلول‌ها از تکنیک ایمونوسیتوشیمی و نشانگرهای اختصاصی آنها استفاده شد.

یافته ها: سوسپانسیون سلولی بدست آمده از بافت تحت بطنی نیمه سری بطن‌های طرفی مغز موش بالغ 7 تا 10 روز پس از انکوبه شدن در محیط کشت نوروسفر، کلونی‌های چند ظرفیتی بنام نوروسفر ایجاد نمود. میانگین تعداد نوروسفرهای بدست آمده از این ناحیه 62±505 تخمین زده شد. خاصیت چند ظرفیتی نوروسفرهای بدست آمده با قرار گرفتن سلول‌های حاصله از نوروسفرها در محیط کشت تمایزی با ایجاد سلول‌های اصلی سیستم عصبی مرکزی یعنی نورون، آستروسیت و الیگودندروسیت نشان داده شد.

نتیجه گیری: به دلیل کمبود مارکرهای خاص برای شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی روش ایجاد نوروسفر در محیط آزمایشگاهی روشی مطمئن و انتخابی برای جداسازی، مطالعه و درک بیولوژی سلول‌های بنیادی عصبی رویانی و بالغ می‌باشد.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی عصبی؛ ناحیه تحت بطنی؛ روش ایجاد نوروسفر؛ موش سوری

دریافت: 90/1/16 **پذیرش:** 90/3/1

لطفا به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Golmohammadi MG, Sagha M, Azari H, Najafzadeh N. Isolation of Neural Stem and Progenitor Cells from the Adult Mouse Brain Using the Neurosphere Assay. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(3): 246-258. (Full text in persain)

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]

مقدمه

قبلا اعتقاد بر این بود که سلول‌های بنیادی فقط در بافت‌هایی مانند پوست، اپیتلیوم روده و خون که بیشتر از سایر بافت‌ها در معرض آسیب و مرگ سلولی می‌باشند، دیده می‌شوند و از آنجائیکه تصور می‌شد سیستم عصبی مرکزی (CNS[1]) مرگ نورونی قابل توجهی نداشته و توانایی بازسازی نیز ندارد، وجود سلول‌های بنیادی در این دستگاه غیر محتمل و غیر ضروری به نظر می‌رسید [1].

تا اینکه در سال 1992 وجود سلول‌های بنیادی در سیستم عصبی مرکزی پستانداران بالغ با قابلیت تولید نورون‌های جدید نشان داده شد [2].

بر خلاف باور قدیمی مبنی بر حالت سکون در سیستم عصبی مرکزی و عدم تولید سلول‌های عصبی در این سیستم، امروزه کاملاً مشخص شده است که حداقل در دو ناحیه از مغز پستانداران بالغ یعنی پیاز بویایی[2] و تشکیلات هیپوکامپی، نورون‌زایی اتفاق می‌افتد [7-3].

تولید مستمر و مداوم سلول‌های جدید در سیستم عصبی مرکزی حاکی از وجود سلول‌های بنیادی عصبی، یعنی سلول‌هایی که قابلیت تکثیر، نوسازی و ایجاد سلول‌های تمایز یافته را دارند، می‌باشد [۹،۸].

یکی از موانع مهم در تشخیص و مطالعه سلول‌های بنیادی عدم وجود نشانگرهای اختصاصی یا ویژگی‌های ظاهری مشخص برای این سلول‌ها می‌باشد. لذا برای شناسایی این سلول‌ها از ویژگی‌های عملکردی این سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی استفاده می‌شود.

در سال 1992، رینولدز و وایس با ابداع روشی بنام روش ایجاد نوروسفر (NSA[3]) با استفاده از محیط کشت فاقد سرم، وجود سلول‌های بنیادی عصبی را هم در مغز موش بالغ و هم در مغز رویان موش نشان دادند [2].

در چنین شرایطی، سلول‌های تمایز یافته سیستم عصبی مرکزی قادر به رشد و بقاءِ نبوده و در طی چند روز اول 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 جداسازی و کشت مجدد سلول‌های یک نوروسفر، نوروسفرهای ثانویه بیشتری را ایجاد نمود و چنانچه این سلول‌ها در محیط کشت تمایزی قرار گیرند به انواع سلول‌های اصلی سیستم عصبی مرکزی یعنی نورون، آستروسیت و الیگودندروسیت تبدیل می‌شوند. بدین ترتیب رینولدز و وایس نشان دادند سلول‌هایی که جدا نموده‌اند ویژگی‌های اصلی سلول‌های بنیادی یعنی تکثیر، نوسازی و تمایز به سلول‌های بالغ و عملکردی را دارا می‌باشند [۱۰،۸].

روش ایجادنوروسفر روشی ارزشمند و مهم برای ایجاد منبع دائمی و تجدید پذیر از سلول‌های پیش‌ساز و تمایز نیافته عصبی بمنظور استفاده این سلول‌ها در مطالعات علمی و اهداف درمانی می‌باشد [۱۲،۱۱].

کشف این سلول‌ها در سیستم عصبی مرکزی پستانداران که تا مدت‌ها پیش تصور می‌شد فاقد هرگونه قدرت ترمیم و باز سازی می‌باشد امیدهای تازه‌ای را برای درمان بیماری‌های دژنراتیو سیستم عصبی مرکزی نظیر سکته مغزی، بیماری پارکینسون، آلزایمر، ضایعات نخاعی و غیره ایجاد نموده است [13-20].

لذا در این مطالعه نحوه جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی از مغز موش بالغ با استفاده از روش ایجاد نوروسفر و تمایز آنها به سلول‌های بالغ سیستم عصبی با ذکر جزئیات مورد بررسی قرار گرفته است.

[1] Central Nervous System(CNS)
[2] Olfactory Bulb
[3] Neurosphere Assay (NSA)

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]

روش کار

تجهیزات و مواد لازم جهت تشریح بافتی و کشت سلولی عبارتند از: میکروسکوپ تشریح، قیچی بزرگ، قیچی نوک تیز کوچک، پنس بزرگ، پنس کوچک، پنس کوچک نوک خمیده، اسپاتولا، اسکالپل، بید استریلیزر- ظروف کشت: فلاسک‌های مخصوص کشت T25, T75- ظروف کشت 6 و 24 خانه‌ای - لوله: لوله‌های فالکون 15 و 50 میلی‌لیتری استریل- پتری دیش: 100میلیمتری و فیلترهای بافتی 70 میکرونی. محتویات محیط کشت NS در جدول 1 و فاکتورهای رشد و سایر مواد در جدول 2 آورده شده است.

جدول 1. محتویات محیط کشت نوروسفر NS

نام مواد	شرکت سازنده	مقدار	شماره کاتالوگ
DMEM	Gibco	یک بسته	50-124-PA
F12	Gibco	یک بسته	21700-026
Pen/Strep)	Gibco	20 میلی لیتر 10,000 u/ml	15140-122
NaHCO3	Sigma	2.25 گرم	S5761
Glucose	Sigma	12 گرم	G7021
Hepes یک مولار	Sigma	10 میلی لیتر	H4034
آب مقطر		1/8 لیتر	-

جدول2 .فاکتورهای رشد و سایر مواد

نام مواد	شرکت سازنده	مقدار	شماره کاتالوگ
EGF	R&D	یک بسته	2028-EG
bFGF	R&D	یک بسته	3139-FB
Heparin	Sigma	%0/2	H4784
Trypsin-EDTA	GIBCO	%0/05	25300-062
Trypsin Inhibitor	Sigma	-	T6522
poly–L–ornithine /laminin	BD Bioscience	-	-
Human fibronectin	BD Bioscience	-	-

آماده سازی محیط HEM[1] (برای 8/75 لیتر)

محتویات یک پاکت 10 لیتری MEM[2] (Gibco Cat#41500-018) به 3 لیتر آب مقطر در یک فلاسک 5 لیتری افزوده می‌شود. 160 میلی‌لیتر هیپز یک مولار و 175 میلی‌لیتر پنی‌سیلین-استرپتومایسین (با رقت 1:50) در فلاسک مجزایی که 3 لیتر آب مقطر دارد با هم ترکیب می‌شوند. ترکیبات فوق در یک بالن 9 لیتری به همدیگر اضافه شده و حجم نهایی با افزودن آب مقطر به 8/75 لیتر رسانده می شود و در نهایت با استفاده از NaOH 10 مولار pH آن در 7/2 تنظیم می‌شود. پس از فیلتراسیون و تقسیم در بطری‌های 100 میلی‌لیتری در 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند.

محیط کشت پایه شامل اجزای زیر می‌باشد:

1- 88 میلی لیتر محیط کشت نوروسفر (NS[3])

2- 10 میلی لیتر فاکتور تکثیر

(Stem Cell Technologies Cat#05701)

3- 2 میلی‌لیتر سرم آلبومین گاوی

(BSA Sigma Cat#A3311 10%[4])

آماده‌سازی محیط کشت کامل سلول بنیادی عصبی (NSC[5])، اجزای زیر مورد نیاز است:

1- 100 میلی لیتر محیط کشت پایه

2- 200 میکرولیتر EGF[6] (10µg/ml)

3- 100 میکرولیتر bFGF[7] (10µg/ml)

4- 100 میکرولیتر هپارین (679u/ml)

تشریح بافت ناحیه زیربطنی مغز موش بالغ

موش‌های نر 6 تا 8 هفته ای نژاد CBA با تزریق داخل صفاقی پنتاباربیتال (120 mg/kg) بیهوش شده و با ایجاد کشش و در رفتگی گردنی کشته می‌شوند.

[1] Hanks' Eagle Medium
[2] Minimal Essential Medium
[3] Neurospher
[4] Bovine Serum Albumin
[5] Neural Stem Cell
[6] Epidermal Growth Factor
[7] Basic Fibroblast Growth Factor

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]

با استفاده از قیچی بزرگ یا اسکالپل سر از ناحیه بالای ستون فقرات گردنی جدا می‌شود. با استفاده از اسکالپل یک برش طولی (ساژیتال) در پوست بالای سر ایجاد شده و با کنار زدن پوست در دو طرف برش، استخوان‌های جمجمه در معرض دید قرار می‌گیرند. قبل از برش، پوست ناحیه با الکل70 درجه بخوبی شستشو داده می‌شود. با گرفتن لبه‌های پوستی بریده شده بین دو انگشت، سر ثابت شده و بوسیله قیچی کوچک یک برش کرونال در استخوان‌های اوربیتال موجود بین کاسه‌های چشم ایجاد می‌شود. با استفاده از یک قیچی ظریف نوک تیز از ناحیه فورامن مگنوم تا برش کرونال قبلی (در بین دو کره چشم) یک برش طولی (ساژیتال) در طول درز ساژیتال ایجاد می شود. باید دقت نمود که در جریان این برش از یک قیچی کاملا ظریف نوک تیز استفاده نموده و در طی برش تا حد امکان زاویه بین دو تیغه قیچی را در کمترین حالت حفظ کنیم تا به مغز آسیب وارد نشود. با استفاده از یک پنس نوک خمیده لبه های استخوانی بریده شده در هر طرف به سمت بالا و خارج کشیده می شوند تا مغز در معرض دید قرار گیرد و سپس با استفاده از یک اسپاتول نوک خمیده مغز جدا شده و در داخل لوله‌های فالکون 15 یا 50 میلی‌لیتری که محتوی مقداری محیط HEM می‌باشند قرار داده می شود. با انتقال مغز به پتری دیش 100 میلیمتری که دارای HEM یا PBS می‌باشد عمل شستشوی آن دوباره انجام می شود.

به منظور تشریح و جداسازی ناحیه تحت بطنی یا ساب‌ونتریکولار مغز پیشین، پتری دیش محتوی مغز را در زیر میکروسکوپ تشریح انتقال داده شده و مغز بر روی سطح شکمی خود قرار می‌گیرد. با استفاده از یک پنس ظریف نوک خمیده که در پشت و طرفین مخچه قرار می‌گیرد مغز را از ناحیه دمی یا خلفی ثابت نموده و با استفاده از اسکالپل با یک برش کرونال بلافاصله در پشت پیازهای بویایی، این قسمت‌های مغز از نیمکره‌های مغزی جدا می شوند. بعد از برداشتن پیازهای بویایی، مغز بر روی سطح پشتی خود قرار داده می شود طوری که سطح شکمی آن رو به بالا باشد. با استفاده از یک پنس نوک خمیده بخش قاعده‌ای یا دمی مغز ثابت شده و با استفاده از اسکالپل در سطح کیاسمای بینایی یک برش کرونال عمودی ایجاد می شود (شکل A-1). بخش دمی مغز (بخشی که در پشت خط برش قرار دارد) کنار گذاشته شده و بخش سری برای کشت و جداسازی ناحیه تحت بطنی استفاده می شود. با بالا بردن بزرگنمایی میکروسکوپ نیمه قدامی مغز به حالت ایستاده و بر روی قطب فرونتال مغز (از محل بریده شدن پیازهای بویایی) قرار می‌گیرد، به طوریکه مقاطع عرضی بطن‌های جانبی رو به بالا قرار گیرند. با استفاده از یک پنس یا قیچی نوک خمیده ظریف ابتدا بخش تیغه میانی یا سپتوم بین دو بطن برداشته شده و دور انداخته می‌شود (شکل B-1) و سپس با دقت و بدون برداشتن بافت جسم مخطط و جسم پینه‌ای، لایه نازکی از دیواره خارجی بطن‌های طرفی برداشته شده (شکل C-1) و در یک پتری-دیش استریل 35 میلی‌لیتری قرار می‌گیرد. بافت جدا شده زیربطنی به داخل هود مخصوص کشت بافت و سلول منتقل و مراحل ذیل کاملا در شرایط استریل انجام می‌گیرد.

روش جداسازی سلولها[1]

با استفاده از تیغ اسکالپل بافت جدا شده در داخل پتری دیش بمدت 1 تا 2 دقیقه کوبیده می شود تا به قطعات کاملا ریزی تبدیل شود (دقت شود که تیغ اسکالپل بافت پلاستیکی پتری دیش را آسیب نرساند چرا که بافت پلاستیکی بریده شده باعث مسمومیت سلول‌ها می‌شود). توسط پیپت و سر سمپلر فیلتردار 1000میکرولیتری و با استفاده از 3 میلی‌لیتر محصول هضم‌کننده بافتی یا تریپسین (که در یک لوله فالکون

[1] Dissociation Protocol

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]

15 میلی‌لیتری از قبل در حمام آب گرم یا وان تا 37 درجه گرم شده است) تمامی بافت مغزی کوبیده شده را به یک لوله 15 میلی‌متری منتقل نموده و بمدت 7 دقیقه در حمام آب گرم 37 درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم (بسته به تعداد و مقدار بافت مغزی و اندازه ذرات ممکن است زمان زیادی از انکوباسیون نیاز باشد). پس از پایان زمان انکوباسیون آنزیمی، با باز گرداندن لوله حاوی بافت و محلول آنزیمی به زیر هود، حجم یکسانی از محلول مهارکننده تریپسین به آن اضافه می شود. پس از افزودن محلول مهار کننده تریپسین بمنظور ایجاد رسوب سلولی مخلوط فوق بمدت 7 دقیقه با سرعت 700 دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. مایع رویی موجود در بالای رسوب سلولی را برداشته و دور می‌ریزیم و با افزودن مقدار مناسبی از محیط NSA حجم نهایی را به 1 میلی‌لیتر می‌رسانیم. سپس با استفاده از پیپت گیلسون و سر سمپلر 1000 میکرولیتری (که از قبل مرطوب شده است) با عمل پی‌پتینگ بصورت مکانیکی سلول‌های رسوب سلولی موجود در ته لوله را از همدیگر جدا نموده و یک سوسپانسیون تک سلولی صاف و شیری رنگ ایجاد می‌کنیم. با افزودن 14 میلی‌لیتر از محلول NS حجم سوسپانسیون سلولی فوق را به 15 میلی لیتر رسانده و از یک فیلتر 70 میکرومتری عبور می‌دهیم تا تکه‌های سلولی و قطعات بزرگ تجزیه نشده برداشته شوند. محلول سلولی صاف شده را با سرعت 700 دور در دقیقه و بمدت 7 دقیقه سانتریفیوژ نموده و سپس تمامی بخش شناور بالایی را برداشته و دور می‌ریزیم. با استفاده از 1800 میکرولیتر محیط NSA رسوب را بحالت سوسپانسون تک سلولی یکنواخت در آورده و عمل شمارش سلولی را انجام می‌دهیم. بمنظور شمارش سلولی 10 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی فوق را با 90 میکرولیتر تریپان‌بلو در لوله‌های کوچک اپندورف مخلوط می‌کنیم و پس از انتقال 10 میکرولیتر از محلول فوق بر روی لام نئوبار عمل شمارش سلولی را انجام می‌دهیم.

عمل کشت سلول‌ها با غلظت 3500 سلول در سانتی‌متر مربع در محیط NSA+EGF+FGF+Heparin انجام می‌شود (در صورت عدم نیاز به شمارش سلولی جهت کشت اولیه، سلول‌های حاصل از یک مغز در یک فلاسک 25 سانتی‌متر مربعی T25 بهمراه 5 میلی‌لیتر از محیط فوق کشت داده می‌شوند)، که در انکوباتور CO_2 (5%) و 37 درجه سانتی‌گراد مرطوب قرار داده می‌شوند.

سلول‌های موجود در محیط کشت تکثیر نموده و پس از 7 تا 10 روز کولونی‌های کروی شکلی بنام نوروسفر ایجاد می‌کنند که آماده کشت مجدد یا پاساژ می‌باشند. (شکل 2، تعداد حداقل 300 نوروسفر از یک مغز بالغ قابل قبول می‌باشد).

پاساژ کشت‌های نورو سفر

کشت‌های اولیه نوروسفر 7 تا 10 روز بعد آماده کشت مجدد یا پاساژ می‌شوند، در حالیکه این مدت برای پاساژهای دوم به بعد 5 تا 7 روز می‌باشد، با اینحال بهتر است محیط‌های کشت مورد بررسی قرار گیرند تا اطمینان حاصل شود که نوروسفرها خیلی بزرگ نشده باشند. معمولا اندازه‌های متفاوتی از نوروسفرها را می‌توان دید ولی زمان مناسب برای پاساژ دادن زمانی است که بیشتر نوروسفرها دارای قطری در حدود 150 میکرومتر باشند. در صورتیکه نوروسفرها بیش از حد بزرگ شوند جداسازی سلول‌های آنها مشکل بوده و در نهایت در محیط کشت شروع به تمایز می‌نمایند.

مراحل مختلف پاساژ نوروسفر

نوروسفرها در زیر میکروسکوپ مشاهده می‌شوند و در صورتیکه اندازه آنها در حدود 150 میکرومتر باشد، پاساژ آنها را انجام می‌دهیم (5 تا 7 روز بعد از کشت). تمامی محیط کشت را بهمراه نوروسفرها برداشته و به یک لوله فالکون 15 میلی‌لیتری منتقل می نمائیم. در صورتیکه بعضی از نوروسفرها به کف

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]

فلاسک یا دیش چسبیده باشند با شستشوی محیط کشت آنها را جدا نموده و به لوله مذکور منتقل می‌نمائیم و سپس بمدت 5 دقیقه با سرعت 700 دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌نمائیم. محلول رویی را دور ریخته و با 1 میلی‌لیتر محلول Trypsine+EDTA سلولها را مجددا به حالت سوسپانسیون در می‌آوریم و بمدت 2 دقیقه در دمای اتاق باقی می‌گذاریم . بعد از 2 دقیقه یک میلی‌لیتر محلول مهارکننده تریپسین (معادل حجم Trypsine+EDTA) را به لوله فوق اضافه نموده و بمدت 5 دقیقه با سرعت 700 دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌نمائیم. محلول رویی را دور ریخته و با افزودن 950 میکرولیتر از محیط NSA حجم کلی را به 1 میلی‌لیتر می‌رسانیم . با استفاده از یک سمپلر 1 میلی‌لیتری و سر سمپلر 1000 میکرو لیتری مرطوب عمل جداسازی مکانیکی رسوب سلولی ایجاد شده را انجام می‌دهیم. بدین منظور نوک سمپلر را در ته لوله بطور مایل طوری قرار میدهیم تا میزان 50% جریان و حرکت سلول‌ها را محدود نماید. به تعداد 5 تا 7 بار عمل پی پتینگ را انجام می‌دهیم تا حدی که ظاهر صاف و شیری رنگی در سوسپانسیون سلولی ایجاد شود. در یک لوله میکرو سانتریفیوژ (اپندورف) 10 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را با 90 میکرولیتر تریپان بلو مخلوط نموده و با انتقال 10 میکرو لیتر از این سلول به هموسیتو متر عمل شمارش سلولی را انجام می‌دهیم. در نهایت در محیط کشت کامل NSC سلول‌ها را با غلظت $7/5\times10^5$ سلول در میلی‌لیتر کشت می‌دهیم.

نحوه تمایز سلولهای بنیادی عصبی به سلول‌های بالغ موجود در سیستم عصبی

تا زمانیکه در محیط کشت سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز عصبی فاکتورهای رشد یعنی EGF و bFGF موجود می‌باشند، این سلول‌ها تکثیر نموده و نوروسفر ایجاد می‌کنند و اگر در زمان لازم و با روش مناسب اقدام شود می‌توان آنها را به دفعات نا محدودی پاساژ داد. در حالیکه با حذف فاکتورهای رشد و افزودن مقدار کمی سرم این سلول‌ها به سلول‌های بالغ سیستم عصبی یعنی نورون، آستروسیت و الیگودندروسیت تمایز می‌یابند (شکل 3). عموما به منظور تمایز سلول‌های بنیادی عصبی دو روش بکار برده می‌شود: 1- تمایز بصورت نوروسفر در غلظت پائین (این روش برای نشان دادن خصوصیت چند ظرفیتی نوروسفرها کاربرد دارد) و 2- تمایز بصورت سلول‌های از هم جدا شده و منفرد در تراکم بالا (بمنظور نشان دادن در صد انواع سلول‌های ایجاد شده) که تکنیک‌های لازم برای هر دو روش در اینجا توضیح داده می‌شوند.

تمایز نوروسفر

برای تمایز نوروسفربهتر است از لامل‌های پوشیده از پلی- ال- اورنیتین (poly – L – ornithine) استفاده نمود. همچنین می‌توان از ظروف کشت 96 خانه‌ای نیز استفاده کرد. بدین منظور با افزودن حجم کافی از پلی- ال- اورنیتین (15mg/ml) بمدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد می‌توان لاملها یا خانه‌های ظروف کشت 96 خانه‌ای را بطور کامل پوشش داد. پس از دو ساعت پلی- ال- اورنیتین را خارج نموده و با استفاده از PBS استریل، لامل‌ها یا خانه‌های ظروف کشت 96 خانه‌ای سه بار و هر بار بمدت 10 دقیقه شستشو داده می‌شوند. دقت شود که در طی شستشو لامل‌ها و ظروف کشت خشک نشوند و بلافاصله بعد از برداشتن PBS نوروسفرها و محیط تمایز دهنده را اضافه نمود. مراحل انجام کار بروش ذیل می‌باشد:

زمانیکه اندازه نوروسفرها به 150 میکرومتر می‌رسد (معمولا 7 تا 8 روز پس از کشت) به یک لوله فالکون مناسب (از نظر اندازه) انتقال داده و بمدت 5 دقیقه با سرعت 400 دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌نماییم. محلول رویی را دور ریخته و سپس به آرامی نوروسفرها را با حجم مناسبی از محلول 1% (Gibco) FCS استریل در محیط کشت پایه بحالت معلق و

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]

سوسپانسیون در می‌آوریم. توجه: می‌توان از حجم برابری از محلول تمایزدهنده NDS[1] تجاری نیز استفاده نمود.

سوسپانسیون نوروسفرها را به یک دیش 60 میلی‌متری (یا ظرف دیگر) منتقل می‌کنیم طوریکه بتوانیم براحتی نور و سفرها را برداریم. با استفاده از پی پت پلاستیکی یا پی پت گیلسون به هر کدام از خانه‌های پلیت‌های 24 یا 96 خانه‌ای آغشته به پلی- ال- اورنتین تقریبا تعداد 10 نور وسفر منتقل می‌کنیم. 5 تا 6 روز بعد نور و سفرها بصورت منفرد و جداگانه به بستر موجود در خانه‌های کشتی چسبیده و به حالت پهن در می‌آیند طوریکه بصورت یک لایه پهن سلولی دیده می‌شوند. بمنظور انجام ایمونوهیستوشیمی از محلول 4% پارافرمالدئید (در PBS 0/1% و pH= 7/2) برای ثابت نمودن سلول‌ها بمدت 10 تا 15 دقیقه استفاده می شود.

تمایز سلول‌های منفرد[2]

زمانیکه نوروسفرهای اولیه یا پاساژ داده شده به اندازه 150 میکرون می‌رسند معمولا 7 تا 8 روز پس از کشت (شکل C-2) تمامی محتویات فلاسک و از جمله نوروسفرها را به یک لوله فالکون مناسب از نظر اندازه انتقال داده و بمدت 5 دقیقه با سرعت 700 دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌نمائیم. تمامی محلول روئی را دور ریخته و سلول‌ها را با استفاده از 1 میلی لیتر محلول Trypsine-EDTA مجددا به حالت معلق در آورده و در دمای اتاق بمدت 2 دقیقه باقی می‌گذاریم. 1 میلی لیتر محلول مهارکننده تریپسین به سوسپانسیون اضافه شده و سپس بمدت 5 دقیقه و با سرعت 700 دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم. محلول روئی بطور کامل برداشته شده و با افزودن 1 میلی‌لیتر محلول یک درصد FCS[3] در محیط بازال مجددا سلول‌ها را بحالت معلق در می‌آوریم. با استفاده از پیپت گیلسون (یا سایر انواع) عمل پیپتاژ (در حدود 5 تا 7 بار) را انجام می‌دهیم تا حدی که رنگ سوسپانسیون سلولی شیری شده و هیچ نوروسفری دیده نشود. در یک لوله میکرو سانتریفیوژ 10 میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی را با 90 میکرو لیتر تریپان بلو مخلوط نموده و سپس با انتقال 10 میکرو لیتر از آن به لام نئوبار عمل شمارش سلولی را انجام می‌دهیم. به هر کدام از خانه‌های ظروف کشت 24 خانه‌ای که دارای لامل‌های شیشه‌ای آغشته به پلی ال اورنیتین می‌باشند تعداد 5×10^5 سلول را بهمراه 1 میلی‌لیتر از محیط تمایزدهنده کامل سلول‌های بنیادی عصبی انتقال می‌دهیم. پس از 4 تا 6 روز سلول‌های بر گرفته از نوروسفرها بطور کافی تمایز خواهند یافت. بمنظور انجام ایمونوهیستوشیمی با افزودن محلول 4% پارافرمالدئید (در PBS 0/1%، pH= 7/2) بمدت 10 دقیقه در دمای اتاق عمل ثابت کردن سلول‌ها انجام می‌شود.

ایمونو سیتو شیمی

بعد از ثابت نمودن در محلول 4% پارافرمالدئید، سلول‌ها سه بار و هر بار 10 دقیقه در محلول PBS شستشو داده می‌شوند و به مدت یک شبانه روز در حضور آنتی‌بادی‌های اولیه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شوند (جدول 3).

جدول 3. آنتی بادی‌های اولیه

نام آنتی بادی	شرکت سازنده	غلظت	شماره کاتالوگ
Mouse anti-ß –Tubulin	Promega	1:2000	G 7121
Rat anti-MBP	Chemicon	1:200	MAB386
Rabbit anti-GFAP	Dakocytomation	1:500	Z 0334

تمامی آنتی بادی‌های اولیه توسط محلول 1X PBS + %5 Normal Serum + %0/3 Triton X رقیق می‌شوند. بعد از قرار گرفتن در معرض آنتی

[1] Neurocult Differentiation Supplement (cat= 10. 05703, Stem Cell Technologies)
[2] Differentiation of Dissociated Cells
[3] Fetal Calf Serum

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]

بادی‌های اولیه مجددا سلول‌ها توسط محلول PBS شستشو داده می‌شوند (سه بار و هر بار 10 دقیقه) و سپس به مدت 45 دقیقه در معرض آنتی‌بادی‌های ثانویه فلورسنت با مشخصات زیر قرار می‌گیرند (جدول 4).

جدول 4. آنتی بادی‌های ثانویه

نام آنتی بادی	شرکت سازنده	غلظت
Goat anti-mouse Alexa Fluor 568 (Red)	Molecular Probe	1: 1000
Donkey anti-Rat AF 488(Green)	Molecular Probe	1: 1000
Goat anti-Rabbit AF 350(Blue)	Molecular Probe	1: 100

بعد از قرار گرفتن در معرض آنتی‌بادی‌های ثانویه مجددا سلول‌ها توسط محلول PBS شستشو داده می‌شوند (سه بار و هر بار 10 دقیقه) و بمدت 5 تا 10 دقیقه در معرض DAPI(1mg/ml, 1: 1000, Sigma) قرار می‌گیرند و در نهایت توسط محلول PBS شستشو داده شده (سه بار و هر بار 10 دقیقه) و توسط میکروسکوپ فلور سنت مطالعه می‌شوند.

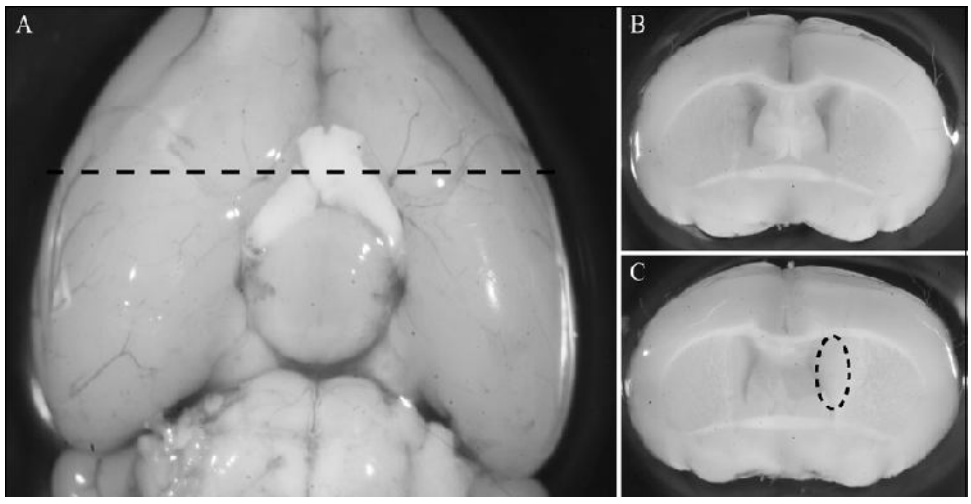
یافته ها

در محیط کشت فاقد سرم، سلول‌های تمایز یافته سیستم عصبی مرکزی قادر به رشد و بقاء نبوده و در طی دو سه روز اول از بین می‌روند در حالیکه سلول‌های پیش‌ساز عصبی از جمله سلول‌های بنیادی عصبی حتی در تراکم بسیار پائین سلولی نیز وارد فاز تکثیری شده و بعد از 5 تا 7 روز کلونی‌های چند ظرفیتی یا نوروسفرها را ایجاد می‌کنندکه می‌توان با جداسازی و کشت مجدد سلول‌های یک نوروسفر، نوروسفرهای ثانویه بیشتری را ایجاد نمود. نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که میانگین مجموع نوروسفرهای ایجاد شده از ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطن‌های طرفی62/2 ± 505/8 می‌باشد (جدول 5).

جدول5. تعداد نوروسفرهای حاصله از کشت ناحیه تحت بطنی نیمه سری بطنهای طرفی

شماره موش	تعداد نوروسفر
1	523
2	567
3	421
4	463
5	555
میانگین ± انحراف معیار	505/8 ± 62/2

باید توجه نمود که درکشت اولیه ناحیه تحت بطنی با روش نوروسفر بعد از 5 تا 7 روز تشخیص نوروسفرهای واقعی از سایر تکه‌های سلولی موجود در محیط کشت بسیار مهم می‌باشد. همانطوریکه در شکل 2 ملاحظه می‌شود نوروسفرهای بالغ کلونی‌های سلولی شفاف به ابعاد 150 تا 200 میکرون



شکل 1. A) نمای شکمی مغز موش بالغ که محل برش کرونال 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 سلولهای بنیادی عصبی با روش NSA استفاده می شود با خط چین مشخص شده است.

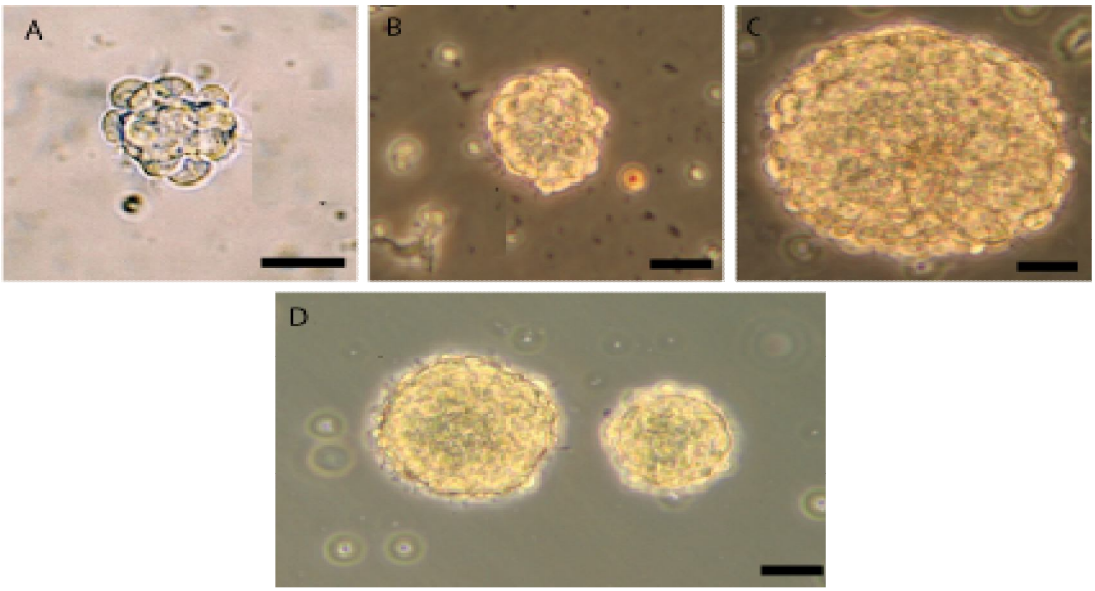
[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]

می‌باشند که حاشیه محیطی مشخصی دارند. از طرف دیگر، رشد و تکثیر بیش از حد نوروسفرها باعث مرگ سلول‌های قسمت مرکزی و سیاه شدن نوروسفرها می شود.

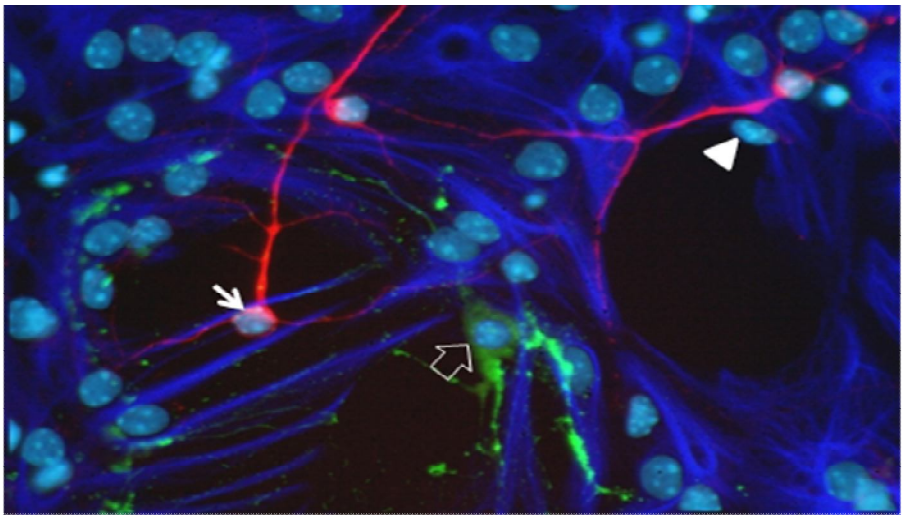
قرار دادن نوروسفرها یا سلول‌های حاصل از آنها در محیط کشت تمایزی نیز سبب تمایز آنها به انواع سلول‌های اصلی CNS یعنی نورون، آستروسیت و الیگودندروسیت گردید (شکل 3).

بحث

در این مطالعه نحوه جداسازی سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز عصبی با روش ایجاد نوروسفر با تمامی جزئیات توضیح داده شد و تعداد متوسط نوروسفرهای بدست آمده از ناحیه تحت بطنی بطن‌های طرفی مغز موش بالغ مشخص گردید. همچنین نحوه تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به سلول‌های بالغ بافت عصبی یعنی نورون، آستروسیت



شکل 2. نمونه ای از چند نوروسفر در مراحل مختلف تکثیر و روزهای مختلف پس از کشت، A)سه روز پس از کشت، B) پنج روز پس از کشت، C و D) هفت روز پس از کشت (Scale bars = 20 µm)



شکل 3. تمایز نوروسفر به سلولهای بالغ بافت عصبی.نورونها به رنگ قرمز- پیکان(آنتی بادی بر علیه B-tubulin III) ،آستروسیتها به رنگ آبی تیره- نوک پیکان(آنتی بادی بر علیه Glial Fibrillary Acidic Protein-GFAP) ، الیگو دندروسیت به رنگ سبز- پیکان توخالی (آنتی بادی بر علیه Myelin Basic Protein-MBP)و هسته ها به رنگ آبی روشن (DAPI; 4',6 - Diamidine - 2 - Phenylindole) مشخص شده اند.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]

و الیگودندروسیت نیز تشریح گردید. روش ایجاد نوروسفر ابتدا در سال 1992 توسط رینولدز و وایس[1] بمنظور جداسازی نوروسفرها از جسم مخطط مغز موش بالغ استفاده شد [2] و از آنجائیکه با استفاده از این روش می‌توان خاصیت نوسازی، تکثیر و قابلیت تمایز چند ظرفیتی موجود در سلول‌های بنیادی عصبی را نشان داد، لذا این روش معمولا به عنوان روشی استاندارد و معروف برای تشخیص و جداسازی این سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد [9]. در این روش شرایطی فراهم می‌شود که سلول‌های بنیادی عصبی به طور مداوم تقسیم شده و کلونی‌های چند ظرفیتی تمایز نایافته‌ای بنام نوروسفر را ایجاد می‌کنند[21, 22].

روش ایجاد نوروسفر نه تنها برای جداسازی ومطالعه سلول‌های بنیادی از سیستم عصبی مرکزی کاربرد دارد، بلکه برای جداسازی سلول‌های بنیادی از سایر بافت‌ها مانند پستان [23] و قلب [24] نیز استفاده می‌شود و حتی برای تشخیص سلول‌های بنیادی سرطانی تومورهای کولون، پستان و مغز نیز بکار برده می‌شود [۲۶،۲۵]. برخی از محاسن این روش عبارت است از ساده بودن، تکرارپذیری و تولید تعداد نامحدودی سلول از قطعه کوچکی از بافت یا حتی تعداد کمی سلول در یک محیط فاقد سرم [11]. البته باید تاکید نمود که تعداد نوروسفرها در محیط کشت نماینده یک به یک سلول‌های بنیادی عصبی نمی‌باشد، چراکه هم سلول‌های بنیادی عصبی واقعی و هم سلول‌های پیش‌ساز عصبی هردو می‌توانند ایجاد نوروسفر نمایند[9]. برای نشان دادن تعداد واقعی سلول‌های بنیادی عصبی معمولا از روش تشکیل کولونی[2] استفاده می‌شود [27].

میانگین تعداد نوروسفرهای بدست آمده در این مطالعه 505 عدد بود که با میانگین تعداد نوروسفرهای بدست آمده در مطالعات دیگر مطابقت داشت (150 تا 900 نوروسفر با میانگین 50±500) [21, 28-31] . عوامل متعددی می‌توانند در نتایج بدست آمده از این روش تاثیرگذار باشند، بعنوان مثال برای ایجاد سوسپانسیون تک سلولی از بافت ناحیه تحت بطنی معمولا از دو روش مکانیکی و آنزیمی استفاده می‌شود. باید خاطر نشان کرد که در روش مکانیکی مهارت و تجربه بالای فرد مورد نیاز می باشد در غیر اینصورت تعداد زیادی از سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز عصبی دچار مرگ شده و تعداد نوروسفر بدست آمده کمتر از حد واقعی خواهد بود که این خود می‌تواند در نتایج تحقیقاتی که بر این اصل و روش استوار می‌باشند اختلال ایجاد نماید. هضم آنزیمی (Trypsin-EDTA) طولانی مدت نیز باعث مرگ سلولی شده و نتایج مشابهی را در پی خواهد داشت.

تنوع ترکیبات مورد استفاده در محیط کشت نیز از جمله مواردی است که می‌تواند باعث تفاوت در نتایج بدست آمده با NSA گردد [32]. بعنوان مثال رینولدز و همکاران [2] در مطالعات اولیه خود از محیط کشت فاقد سرم که محتوی 20 نانوگرم در میلی لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) بود استفاده نمودند، در حالیکه در مطالعات دیگر از محیط کشت حاوی سرم نیز استفاده شده است[30, 31] . عوامل میتوژن و هورمون‌ها نیز از جمله ترکیباتی هستند که با تنوع و غلظت‌های متفاوت در محیط های کشت مورد استفاده در NSA بکار برده می‌شوند [32] و بنابراین می‌توانند باعث تفاوت در تعداد نوروسفرهای بدست آمده از ناحیه تحت بطنی باشند.

اگرچه جداسازی سلول‌های پیش‌ساز عصبی با استفاده از این روش نسبتا ساده و راحت بنظر می‌رسد، اما دست‌یابی به نتایج ثابت، قابل اعتماد و تکرار پذیر در مطالعات مختلفی که بمنظور بررسی دقیق و مقایسه تغییرات ایجاد شده در جمعیت

[1] Reynolds & Weiss
[2] Neural Colony Forming Cell Assay

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]

سلول‌های نوروسفر ساز ناحیه تحت بطنی در نتیجه تاثیر عوامل ژنتیک و اپی ژنتیک مختلف انجام می‌شوند، نیازمند استفاده از یک پروتوکل دقیق و قابل اعتماد می‌باشد، لذا با توجه به اهمیت روش ایجاد نوروسفر در جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی و نقش و کاربرد این سلول‌ها در مطالعات مختلف و بویژه درمان ضایعات مختلف سیستم عصبی مرکزی در این مقاله تلاش نمودیم تا با تشریح تمامی جزئیات این روش، راه را برای محققین عزیز در نیل به نتایج قابل قبول و قابل اعتماد در این نوع مطالعات هموار نماییم.

تشکر و قدردانی

از زحمات اساتید عزیز پروفسور برنت رینولدز و رادنی لی ریتز در موسسه تحقیقاتی مغز کوئینزلند و مرکز تحقیقات جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تقدیر و تشکر بعمل می‌آید.

References

1- Deleyrolle LP, Ericksson G, Morrison BJ, Lopez JA, Burrage K, Burrage P, et al. Determination of somatic and cancer stem cell self-renewing symmetric division rate using sphere assays. PLoS One. 2011 Jan; 6(1): 15844.
2- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science. 1992 Mar; 255(5052): 1707-1710.
3- Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. Nat Rev Neurosci. 2000 Oct; 1(1): 67-73.
4- Luskin M. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. Neuron. 1993 Jul; 11(1): 173-189.
5- 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 Feb; 18(3):1020-1037.
6- Reznikov KY. Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus. Adv Anat Embryol Cell Biol. 1991; 122(1): 1-74.
7- 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 Feb; 427(6976):740-744.
8- Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. Development. 1990 Dec; 110(4):1001-1020.
9- Golmohammadi MG, Blackmore DG, Large B, Azari H, Esfandiary E, Paxinos G, et al. Comparative analysis of the frequency and distribution of stem and progenitor cells in the adult mouse brain. Stem Cells. 2008 Apr; 26(4): 979-987.
10- Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. Development. 1989 Aug; 106(4): 619-633.
11- Azari H, Rahman M, Sharififar S, Reynolds BA. Isolation and expansion of the adult mouse neural stem cells using the neurosphere assay. J Vis Exp. 2010 Nov; 20(45): 2393.
12- Blackmore DG, Golmohammadi MG, Large B, Waters MJ, Rietze RL. Exercise increases neural stem cell number in a growth hormone-dependent manner, augmenting the regenerative response in aged mice. Stem Cells. 2009 Aug; 27(8): 2044-2052.
13- Taupin P. Neurogenesis, NSCs, pathogenesis and therapies for Alzheimer's disease. Front Biosci. (Schol Ed) 2011 Jan; 3: 178-190.
14- Okano H, Sawamoto K. Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2008 Jun; 363(1500): 2111-2122.
15- Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Yamasaki M, Kanemura Y, Shizuko I, et al. Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. J Neurosci Res. 2004 Oct; 78(2): 215-223.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]

16- Deierborg T, Roybon L, Inacio AR, Pesic J, Brundin P. Brain injury activates microglia that induce neural stem cell proliferation ex vivo and promote differentiation of neurosphere-derived cells into neurons and oligodendrocytes. Neuroscience. 2010 Dec; 171(4): 1386-1396.
17- Elder GA, De Gasperi R, Gama Sosa MA. Research update: neurogenesis in adult brain and neuropsychiatric disorders. Mt Sinai J Med. 2006 Nov; 73(7): 931-940.
18- Yan J, Xu L, Welsh AM, Hatfield G, Hazel T, Johe K, Koliatsos VE. Extensive neuronal differentiation of human neural stem cell grafts in adult rat spinal cord. PLoS Med. 2007 Feb; 4(2): 39.
19- Redmond DE JR, Bjugstad KB, Teng YD, Ourednik V, Ourednik J, Wakeman DR, et al. Behavioral improvement in a primate Parkinson's model is associated with multiple homeostatic effects of human neural stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2007 Jul; 104(29):12175-12180.
20- Vazey EM, Chen K, Hughes SM, Connor B. Transplanted adult neural progenitor cells survive, differentiate and reduce motor function impairment in a rodent model of Huntington's disease. Exp Neurol. 2006 Jun; 199(2): 384-396.
21- Reynolds BA, Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. Nat Methods. 2005 May; 2(5):333-336.
22- 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 Dec; 36(6): 1021-1034.
23- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. Genes Dev. 2003 May; 17(10): 1253-1270.
24- Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. Circ Res. 2004 Oct; 95(9): 911-921.
25- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res. 2004 Oct; 64(19): 7011-7021.
26- Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. Glia. 2002 Sep; 39(3): 193-206.
27- Louis SA, Rietze RL, Deleyrolle L, Wagey RE, Thomas TE, Eaves AC, et al. Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. Stem Cells. 2008 Apr; 26(4): 988-996.
28- 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 Jan; 22(2): 437-445.
29- 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 Oct; 17(20): 7850-7859.
30- 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 Apr; 156(2): 333-344.
31- Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. Proc Natl Acad Sci USA. 1992 Sep; 89(18): 8591-8595.
32- Chaichana K, Zamora-Berridi G, Camara-Quintana J, Quinones-Hinojosa A. Neurosphere assays: growth factors and hormone differences in tumor and nontumor studies. Stem Cells. 2006 Dec; 24(12): 2851-2857.

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]

Isolation of Neural Stem and Progenitor Cells from the Adult Mouse Brain Using the Neurosphere Assay

Golmohammadi MG, PhD[1]; Sagha M, PhD[2]; Azari H, PhD[3]; Najafzadeh N, PhD[4]

[1] Assistant Prof. of Anatomical Sciences Dept. School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.
[2] Corresponding Author: Assistant Prof. of Anatomical Sciences Dept., School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran. E-mail: m.sagha@arums.ac.ir
[3] Assistant Prof. of Anatomical sciences Dept. School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[4] Assistant Prof. of Anatomical sciences Dept. School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

ABSTRACT

Background &Objectives: Stem cells are a class of undifferentiated cells that are able to differentiate into specialized cell types. The discovery of such cells in the adult mammalian central nervous system (CNS), an organ traditionally thought to have little or no regenerative capacity, opened the door to treatment of degenerative diseases of CNS like Stroke, Parkinson, Alzheimer and Spinal Cord Injury. Thus, here we described the isolation of neural stem cells from the adult mouse brain using the neurosphere assay (NSA) and differentiation of these cells to neural adult cells in details.

Methods: The rostral part of the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles in the adult mice was dissociated into single cell suspension and cultured using NSA. Primary neurospheres were counted seven days after plating and then the mean number of neurospheres was recorded. The differentiation of neural stem cells into adult neural cells was accomplished by plating the neurosphere-derived cells in differentiating media. Immunocytochemistry and specific markers were used for the identification of the adult neural stem cells.

Results: The cell suspension obtained from the rostral part of the SVZ of the lateral ventricles generated multipotential colonies, called neurospheres, 7 to 10 days post- incubation. The mean number of neurospheres generated from SVZ was 505±62. The multipotentiality of the neurospheres was shown by palting them in differentiating media and generating adult neural cells including neuron, astrocyte and oligodendrocyte.

Conclusion: Owing to their rarity and paucity of neural stem cell specific markers, the NSA is a common and selective method for isolating and understanding the biology of embryonic and adult neural stem cells.

Key words: Neural Stem Cell; Subventricular Zone; Neurosphere Assay; Mouse

[Downloaded from jarums.arums.ac.ir on 2025-04-05]