مقاله پژوهشی

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و پنجم/شماره 86/پائیز 1386

ارزیابی نورون‌زایی سلول‌های بنیادی عصبی با استفاده از فلوسیتومتری و مقایسه‌ی آن با روش شمارش دستی

حسن آذری*، محمد قاسم گل محمدی**، دکتر ابراهیم اسفندیاری***، دکتر محمد مردانی****، دکتر برنت آلان رینولدز*****.

* دانشجوی دکترای علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مربی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
** مربی علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
*** استاد گروه علوم تشریحی-دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
**** دانشیار گروه علوم تشریحی-دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
***** استاد دانشگاه کوئینزلند استرالیا

تاریخ دریافت: 86/2/27
تاریخ پذیرش: 86/5/4

چکیده

مقدمه: شناخت عوامل مؤثر در افزایش نورون‌زایی سلول‌های بنیادی عصبی برای جایگزینی نورون‌های از دست رفته در بیماری‌های عصبی از اهمیت زیادی برخوردار است. کشت سلول‌های بنیادی عصبی روشی مطلوب در شناخت این عوامل به نظر می‌رسد ولی در آنالیز سلولی باید از روشی سریع‌تر و کارآمدتر از روش شمارش دستی بهره جست تا از طریق آن بتوان تعداد زیادی از عوامل را در کم‌ترین زمان و هزینه مورد بررسی قرار داد. هدف این مطالعه، استفاده از فلوسیتومتری به عنوان روشی جایگزین برای ارزیابی میزان نورون‌زایی سلول‌های بنیادی عصبی بود.

روش‌ها: سلول‌های بنیادی عصبی جدا شده از مغز جنین‌های 14 روزه موش، طی روش‌های یک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای تمایز داده شدند. پس از انجام هیستوشیمی برای مارکرهای نورونی و آستروسیتی، ابتدا روش شمارش دستی با روش فلوسیتومتری در تعیین درصد نورون‌ها و آستروسیت‌ها مقایسه شد و سپس دو روش مختلف تمایز سلول‌های بنیادی عصبی از نظر درصد نورون‌ها و آستروسیت‌های ایجاد شده، با استفاده از فلوسیتومتری با یکدیگر مقایسه گردیدند.

یافته‌ها: در ارزیابی میانگین درصد نورون‌ها و آستروسیت‌ها بین روش‌های شمارش دستی و فلوسیتومتری تفاوتی مشاهده نشد. بررسی فلوسیتومتری، تفاوت معنی‌داری را بین میانگین درصد نورون‌ها و آستروسیت‌های روش‌های یک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای تمایز سلول‌های بنیادی عصبی نشان داد ($p<0/001$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که فلوسیتومتری روش ساده و قابل اعتمادی است که می‌توان از آن به جای شمارش‌های دستی در ارزیابی میزان نورون‌زایی سلول‌های بنیادی عصبی استفاده کرد. این مسأله به ویژه در غربالگری تأثیر مواد و عوامل مختلف بر میزان نورون‌زایی از اهمیت به سزایی برخوردار است.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی عصبی، تمایز، فلوسیتومتری، نورون‌زایی

تعداد صفحات: 9
تعداد جدول ها: 1
تعداد نمودار ها: 3
تعداد منابع: 23

آدرس نویسندهٔ مسئول: دکتر حسن آذری، گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان.
E-mail: azarihasan@sums.ac.ir

مقدمه

با کشف سلول‌های بنیادی عصبی (Neural stem cells) در دستگاه اعصاب مرکزی (2-1)، از سال 1992 تاکنون پژوهش‌های وسیعی در جهت شناخت هر چه بیشتر این سلول‌ها، یافتن چگونگی ارتباط بین سلولی و مکانیسم‌های تمایز و تکثیر این سلول‌ها صورت پذیرفته است. بخش زیادی از این پژوهش‌ها در رابطه با چگونگی تحریک، تکثیر و تمایز درجای (In Situ) این سلول‌ها جهت ترمیم و جایگزینی سلول‌های مورد نیاز در ضایعات بخش‌های مختلف دستگاه عصبی انجام پذیرفت (6-3). گرچه برای یافتن عوامل مناسب جهت تحریک، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی می‌توان از مدل‌های حیوانی بیماری‌ها (8-7)، حیوانات ترانسژنیک (11-9) و یا تزریق داخل مغزی-بطنی (12-۳) بهره جست، ولی با توجه به گوناگونی فاکتورهای اثرگذار و لزوم بررسی اثرات آنها با غلظت‌های مختلف برای دستیابی به غلظت‌های مؤثر، بهره‌گیری از مدل‌های آزمایشگاهی (in vitro) روند نورون‌زایی از اهمیت زیادی برخوردار است. ضمن آن که استفاده از روش‌های معمول شمارش سلول‌ها با استفاده از تکنیک‌های میکروسکوپی جهت غربالگری تعداد زیادی از عوامل ناشناخته در یک زمان محدود، علاوه بر غیر عملی بودن، مقرون به صرفه هم نمی‌باشد. در ایمونولوژی، فن‌آوری فلوسیتومتری به طور وسیعی برای تعیین مراحل تکثیر، تمایز و فعالیت سلول‌های ایمنی و همچنین تشخیص بیماری‌ها به کار گرفته شده است (15-13). در نوروبیولوژی، از این فن‌آوری بیشتر در جداکردن و خالص‌سازی سلول‌های بنیادی عصبی (17-16) و یا خالص‌سازی سلول‌های عصبی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی (20-18) استفاده شده است. در رابطه با امکان استفاده از این فن‌آوری در جهت تسهیل روند شمارش سلولی و امکان جایگزین کردن روش شمارش دستی با روش فلوسیتومتری، تانگوی و همکارانش (21) نشان دادند که روش فلوسیتومتری در ارزیابی و تعیین درصد سلول‌های عصبی حاصل از کشت‌های اولیه (Primary culture) بافت عصبی، روش قابل اعتمادی می‌باشد.

هدف از این مطالعه، بررسی امکان استفاده از فن‌آوری فلوسیتومتری به عنوان جایگزین روش شمارش دستی در تعیین میزان نورون‌زایی سلول‌های بنیادی عصبی به دنبال تمایز این سلول‌ها و همچنین فراهم سازی یک روش مناسب برای غربالگری عوامل مؤثر در افزایش نورون‌زایی این سلول‌ها بود.

روش‌ها

پژوهش حاضر بخشی از یک طرح تحقیقاتی مشترک میان دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و دانشگاه کوئینزلند استرالیا در سال‌های 1386-1383 است که بخش آزمایشگاهی آن در استرالیا و تحلیل داده‌های آن در ایران انجام شده است.

جدا سازی و کشت سلول‌های بنیادی عصبی

سلول‌های بنیادی عصبی بر اساس روش نوروسفر (Neurosphere Assay) از برجستگی‌های گانگلیونی (Ganglionic eminences) جنین‌های موش 14 روزه از نژاد C57/Bl6 گرفته شد و طی یک تا دو پاساژ تکثیر یافت (22). محیط کشت برای تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی شامل DMEM/F-12(1:1) (Gibco)، 5 میلی‌مول بافر هیپیز (Sigma)، 0/6 درصد گلوکز (Sigma)، 3 میلی‌مول بی‌کربنات سدیم (Sigma)، 2 میلی‌مول ال-گلوتامین (Stem Cell Technologies)، 25 میکروگرم در میلی‌لیتر انسولین (Sigma)،

100 میکروگرم در میلی‌لیتر ترانسفرین (Serologicals)، 20 نانومول پروژسترون (Sigma)، 60 میکرومول پوترسین (Sigma) و 30 نانومول سلنایت سدیم (Sigma) بود. به محیط فوق فاکتور رشد EGF (BD) با غلظت 20 نانوگرم در میلی‌لیتر اضافه گردید.

تمایز سلول‌های بنیادی عصبی

نوروسفرهای حاصل از تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی با استفاده از Trypsin-EDTA (Invitrogen) 0/05 درصد به صورت تک سلولی در آمد و به دو صورت زیر تمایز داده شد:

روش یک مرحله‌ای: در این روش سلول‌ها با تراکم 3×10^5 سلول در میلی‌لیتر در محیط فاقد فاکتورهای میتوژنیک به همراه 5 درصد FCS (Fetal calf serum) به مدت 4 روز با انکوباسیون در °37 سانتی‌گراد و Co_2 5 درصد، تمایز داده شدند.

روش دو مرحله‌ای: در این روش سلول‌ها طی دو مرحله تمایز داده شدند. در مرحله‌ی اول سلول‌ها با تراکمی مشابه روش نخست در یک محیط کشت تکثیری به همراه 5 درصد FCS و فاکتورهای رشد EGF و b-FGF (Roche) به ترتیب با غلظت‌های 20 و 10 نانوگرم در میلی‌لیتر به مدت 4 روز کشت داده شدند (در این مدت سلول‌ها با تکثیر یافتن حدود 90 درصد از سطح کشت را اشغال می‌کنند). در مرحله‌ی دوم، سلول‌ها در محیط کشت فاقد فاکتورهای میتوژنیک به همراه 5 درصد FCS به مدت 4 روز با انکوباسیون در °37 سانتی‌گراد و Co_2 5 درصد، تمایز داده شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها

پس از برداشتن محیط کشت، سلول‌ها با بافر فسفات فاقد کلسیم و منیزیم یک بار شستشو داده شدند. در این مرحله بخشی از کشت (نیمی از پلیت 96 خانه‌ای) با پارافرمالدئید 4% سرد به مدت 20 دقیقه فیکس شده، پس از سه بار شستشو با بافر فسفات و رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس برای مارکرهای نورونی و آستروسیتی (GFAP, β-III tubulin)، با میکروسکوپ فلورسانس الیمپوس (Olympus) مورد بررسی قرار گرفت. بخش دیگری از کشت (نیم دیگری از پلیت 96 خانه‌ای) با استفاده از Trypsin_EDTA 0/05 درصد در دمای °37 سانتی‌گراد به مدت 4 دقیقه به سلول‌های منفرد تبدیل شد. با اضافه نمودن مهارکننده‌ی تریپسین (Trypsin inhibitor) و خنثی کردن تریپسین، سلول‌ها با استفاده از پیپت‌های 8 کاناله به خانه‌های پلیت‌های 96 خانه‌ای ته گرد (Nunc) منتقل شده، با 700 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد. با کشیدن مایع سطحی و اضافه کردن 150 میکرولیتر پارافرمالدئید 4% سرد به هر خانه، سلول‌ها به مدت 20 دقیقه فیکس شدند. سلول‌ها پس از 3 بار شستشو با بافر فسفات و با انجام ایمونوفلورسانس برای مارکرهای نورونی و آستروسیتی، با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر LSR II (BD, USA) مورد بررسی قرار گرفت.

ایمونوفلورسانس

برای انجام ایمونوفلورسانس، سلول‌ها ابتدا به مدت یک ساعت در دمای اتاق در معرض آنتی بادی‌های اولیه (جدول شماره‌ی 1) که با نسبت‌های مختلف در محلول 0/01 درصد PBS-Triton X محتوی 10 درصد NGS (normal goat serum) آماده شده بود، قرار گرفت. نمونه‌ها پس از 3 بار شستشو با بافر فسفات، به مدت 45 دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک در معرض آنتی بادی‌های ثانویه و DAPI (جدول شماره‌ی 1) که با نسبت‌های مختلف در محلول 0/01 درصد PBS-Triton X محتوی 10 درصد NGS آماده

جدول 1. آنتی‌بادی‌ها و نسبت‌های مورد استفاده

هدف از استفاده	نسبت مورد استفاده بر حسب l/mlμ	کارخانه‌ی سازنده	نام ماده
شناسایی آستروسیت‌ها	1/500	Dako Cytomation	Polyclonal Rab anti-GFAP
شناسایی نورون‌ها	1/2000	Promega	Mouse anti- B-III tubulin
میکروسکوپ فلورسانس	1/700	Molecular probe	Goat anti mouse Alexa 568
فلوسیتومتری	1/700	Molecular probe	Goat anti mouse Alexa 633
میکروسکوپ فلورسانس و فلوسیتومتری	1/700	Molecular probe	Goat anti Rab Alexa 488
شناسایی هسته‌ی سلول	1/1000	Molecular probe	DAPI

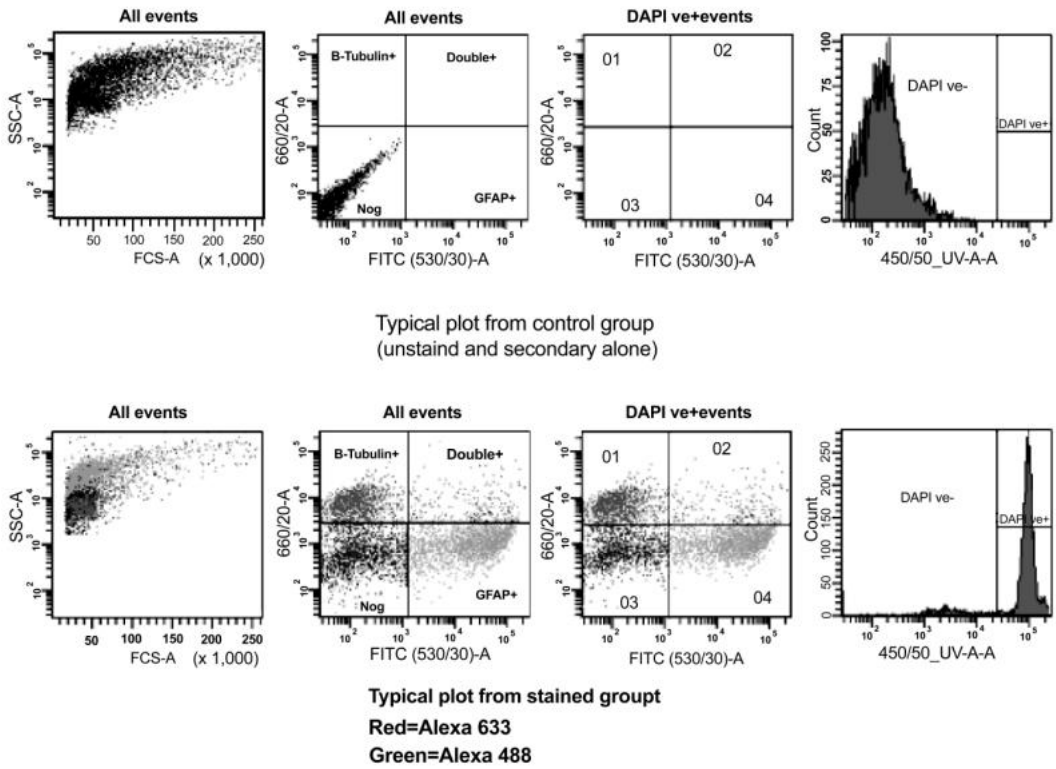
شده بود، قرار داده شد. سلول‌ها پس از 3 بار شستشوی مجدد با بافر فسفات با میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفتند. برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت فلوسیتومتری، ایمونوفلورسانس با روشی مشابه انجام پذیرفت، با این تفاوت که برای شستشوی نمونه‌ها و جلوگیری از دست رفتن سلول‌ها، از سانتریفوژ با 700 rpm استفاده گردید و در نهایت با معلق‌سازی سلول‌ها در 150 میکرولیتر بافر فسفات، نمونه‌ها مورد بررسی فلوسیتومتری قرار گرفت.

بررسی میکروسکوپی

پس از انجام ایمونوفلورسانس، نمونه‌ها با استفاده از یک میکروسکوپ فلورسانس الیمپوس مجهز به دوربین دیجیتال (Canon EOS digital camera) مورد بررسی قرار گرفتند. برای ارزیابی دستی درصد نورون‌ها و آستروسیت‌های حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به روش دو مرحله‌ای، چهار کشت مستقل بررسی و در هر کشت چهار خانه‌ای، یک پلیت 96 خانه‌ای شمارش شد. برای این منظور، تعداد 15 تصویر (با سه فیلتر مختلف به ترتیب برای آستروسیت‌ها، نورون‌ها و هسته‌ی سلول‌ها) به طور تصادفی از هر خانه‌ی پلیت‌های 96 خانه‌ای تهیه گردید و پس از مونتاژ تصاویر با نرم‌افزار فتوشاپ و شمارش سلول‌ها، درصد آنها در هر کشت محاسبه شد. در نهایت میانگین کل درصد نورون‌ها و آستروسیت‌ها در چهار کشت مستقل محاسبه و با نتایج فلوسیتومتری روش تمایز دو مرحله‌ای مقایسه گردید.

بررسی فلوسیتومتری

برای آنالیز سلول‌ها با دستگاه فلوسیتومتری، ابتدا Gateها بر اساس گروه‌های کنترل [سلول‌های منفرد فیکس شده بدون رنگ‌آمیزی (Cells alone) و سلول‌های منفردی که تنها در معرض آنتی بادی‌های ثانویه قرار گرفته بودند (Secondary alone)] تنظیم گردید و سپس سلول‌های رنگ‌آمیزی شده مورد بررسی قرار گرفتند. با تنظیم یک Gate جداگانه بر اساس UV (ultra violet)، تنها سلول‌هایی که دارای هسته (DAPI مثبت) بودند، آنالیز شدند. این بررسی نیز بر روی چهار کشت مستقل انجام گردید و در هر کشت، محتویات چهار خانه مورد آنالیز قرار گرفت. در نهایت، میانگین کل درصد نورون‌ها و آستروسیت‌ها در چهار کشت مستقل محاسبه و با نتایج روش شمارش دستی مقایسه گردید. مقایسه‌ی فلوسیتومتری روش‌های مختلف تمایز سلول‌های بنیادی عصبی با



شکل 1. نمونه‌ای از Plot فلوسیتومتری

Q1 مبین نورون‌ها، Q2 نشان‌دهنده‌ی Double positive cells، Q3 نشان‌دهنده‌ی سلول‌های رنگ نشده و Q4 نشانگر آستروسیت‌ها می‌باشد.

آنالیز کشت‌های جداگانه (چهار کشت مستقل از هر روش و در هر کشت چهار خانه‌ای، یک پلیت 96 خانه‌ای) صورت پذیرفت (شکل شماره‌ی 1).

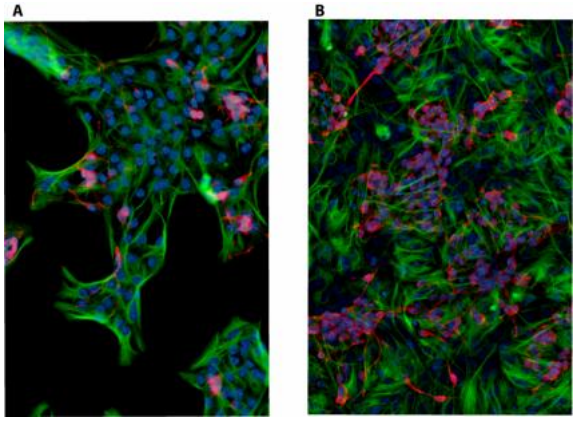
تحلیل آماری

برای تحلیل داده‌ها از نرم افزار Prism 4.01, GraghPad Inc. USA و روش آماری Independent *t*-test استفاده گردید. سطح معنی‌دار آماری $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

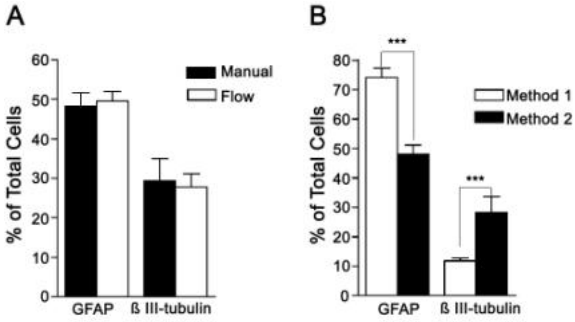
در ارائه‌ی نتایج این مطالعه، هر یک از آزمایشات بر روی چهار کشت مستقل انجام شده و نتایج در داخل پرانتز به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

با آنالیز سلول‌های حاصل از تمایز دو مرحله‌ای سلول‌های بنیادی عصبی مشخص گردید که بین میانگین درصد نورون‌ها در روش شمارش دستی (29/3±5/6) و میانگین درصد نورون‌ها در روش فلوسیتومتری (27/7±3/3) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (نمودار شماره‌ی A-1). همچنین بین میانگین درصد آستروسیت‌ها در روش شمارش دستی (48/3±3/4) و میانگین درصد این سلول‌ها با روش فلوسیتومتری (49/5±2/4) نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار شماره‌ی A-1).

مشاهده‌ی کشت‌های حاصل از دو روش مختلف تمایز سلول‌های بنیادی عصبی با میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که در روش تمایز یک مرحله‌ای، نورون‌ها به صورت منفرد و با دانسیته‌ی سلولی پایین توزیع شدند (شکل A-2)، در حالی که در روش تمایز دو مرحله‌ای، نورون‌ها به صورت دستجات نورونی و با دانسیته سلولی بالا قرار گرفتند (شکل B-2).



شکل 2. تمایز سلول‌های بنیادی عصبی. (قرمز) β III-tubulin، (سبز) GFAP و (آبی) DAPI (بزرگ‌نمایی: 100×)
A) روش یک مرحله‌ای
B) روش دو مرحله‌ای



نمودار 1.
A) مقایسه‌ی روش‌های فلوسیتومتری و دستی در ارزیابی میزان نورون‌ها (ß III-tubulin) و آستروسیت‌های (GFAP) ناشی از تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به روش دو مرحله‌ای تفاوتی معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.
B) مقایسه‌ی روش‌های یک مرحله‌ای (Method 1) و دو مرحله‌ای (Method 2) تمایز سلول‌های بنیادی عصبی، با استفاده از روش فلوسیتومتری، نشانگر تفاوت معنی‌دار (P<0/001) این دو روش در میزان ایجاد نورون و آستروسیت می‌باشد.

مقایسه‌ی میانگین درصد نورون‌های حاصل از روش تمایز یک مرحله‌ای (11/8±1/0) و دو مرحله‌ای (28/1±5/4) سلول‌های بنیادی عصبی با استفاده از فلوسیتومتری نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان نورون‌زایی این دو روش وجود دارد (p<0/001، نمودار شماره B-1). این تفاوت در مقایسه‌ی میانگین درصد آستروسیت‌های حاصل از روش تمایز یک مرحله‌ای (74/1±3/2) و دو مرحله‌ای (48/0±3/2) تمایز سلول‌های بنیادی عصبی نیز مشاهده گردید و به لحاظ آماری نیز معنی‌دار بود (p<0/001، نمودار شماره‌ی B-1).

بحث

این پژوهش برای اولین بار و با هدف بررسی امکان استفاده از روش فلوسیتومتری به عنوان روشی جایگزین در ارزیابی میزان نورون‌زایی سلول‌های بنیادی عصبی و همچنین فراهم‌سازی یک روش مناسب برای غربالگری عوامل مؤثر در افزایش نورون‌زایی این سلول‌ها صورت پذیرفت.

با مقایسه‌ی روش‌های شمارش دستی و فلوسیتومتری در تعیین میزان نورون‌ها و آستروسیت‌های حاصل از تمایز دو مرحله‌ای سلول‌های بنیادی عصبی مشخص گردید که تفاوت معنی‌داری میان این دو روش وجود ندارد. در مطالعه‌ای که در سال 2003 میلادی بر روی کشت‌های اولیه نورون‌های مخچه و آستروسیت‌های قشر مغز موش صحرایی صورت گرفت (21)، مشخص گردید که ارزیابی درصد نورون‌ها و آستروسیت‌ها با روش فلوسیتومتری تفاوت معنی‌داری با روش شمارش دستی ندارد. بنابراین از نتایج این دو مطالعه که در شرایط متفاوت و بر روی کشت‌های مختلف صورت پذیرفت، می‌توان استنتاج کرد که روش فلوسیتومتری در ارزیابی و تعیین درصد سلول‌های عصبی، روش دقیق و قابل اعتمادی می‌باشد.

در ارزیابی درصد سلول‌های مختلف در یک سوسپانسیون سلولی، مبنا قرار دادن یک مشخصه‌ی واحد جهت شناسایی سلول از غیر سلول یکی از نکات حایز

اهمیت می‌باشد. در تحقیق مورد اشاره از مؤلفه‌های FSC (Forward Scatter) و SSC (Side Scatter) که به ترتیب مبین اندازه و پیچیدگی درونی یک ذره می‌باشند، برای جداسازی دبری (debris) استفاده شده است (21). برای این منظور، در تحقیق حاضر از رنگ‌آمیزی DAPI (یک رنگ فلورسانت که با DNA سلول‌ها باند شده و با اشعه‌ی ماورای بنفش قابل رؤیت است) استفاده شد تا احتمال خطای ناشی از محاسبه‌ی ذرات فاقد DAPI (که ممکن است مبین بخشی از سلول مانند زواید سلولی باشند) به کم‌ترین میزان ممکن برسد. اگرچه استفاده از هر دو روش می‌تواند ذرات غیر سلولی را از جمعیت مورد بررسی جدا سازد، ولی به نظر می‌رسد که استفاده از رنگ‌آمیزی هسته روش مناسب‌تری برای تشخیص سلول از غیر سلول باشد و بسته به نوع فلوروکروم‌های استفاده شده، می‌توان از انواع مارکرهای هسته‌ای مانند DAPI و یا PI (Probidium Iodide) استفاده نمود.

تانگوی و همکاران (21) با به کارگیری آنتی‌بادی‌های ثانویه کانژوگه شده با FITC (Fluorescein isothiocyanate)، درصد سلول‌ها (نورون‌ها و آستروسیت‌ها) را در نمونه‌های جداگانه تعیین نمودند. این مسأله هم کندی روند آنالیز سلولی و هم عدم تفکیک سلول‌های Double positive در یک سوسپانسیون سلولی را موجب می‌شود. تفکیک سلول‌های Double positive در ارزیابی درصد سلول‌های ناشی از تمایز سلول‌های بنیادی عصبی، به ویژه در مراحل ابتدایی تمایز، بسیار حائز اهمیت است؛ زیرا که در این مرحله از تمایز، سلول‌های پیش‌ساز می‌توانند به طور همزمان مارکرهای آستروسیتی و نورونی را بیان کنند (23). در این راستا، در پژوهش حاضر به طور همزمان از آنتی بادی‌های ثانویه‌ی کانژوگه شده با فلوروکروم‌های مختلف (Alexa 633 و Alexa 488) استفاده شد تا موجب تفکیک سلول‌هایی شود که برای هر دو مارکر (در این جا بیان همزمان GFAP و β III-tubulin) مثبت باشند.

با بررسی میکروسکوپی کشت‌های حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی عصبی مشخص گردید که در روش تمایز یک مرحله‌ای، نورون‌ها به صورت منفرد و با تراکم سلولی پائین، بر روی بستری از آستروسیت‌ها قرار گرفتند ولی در روش تمایز دو مرحله‌ای، دستجات نورونی با تراکم بالا مشاهده شدند. دلیل این تفاوت را شاید بتوان به نقش تروفیکی فاکتورهای رشد (EGF, b-FGF) در مرحله‌ی تکثیری تمایز دو مرحله‌ای مرتبط دانست که موجب حفظ پیش سازهای نورونی می‌شوند. مقایسه‌ی میزان نورون‌زایی دو روش مختلف تمایز سلول‌های بنیادی عصبی با استفاده از فلوسیتومتری نشان داد که فلوسیتومتری از حساسیت لازم در نشان دادن تفاوت میان درصد نورون‌ها و نیز درصد آستروسیت‌های حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به روش‌های مختلف نیز برخوردار می‌باشد. با توجه به بیشتر بودن میانگین درصد نورون‌ها در روش دو مرحله‌ای و نیز با توجه به مشابهت این روش با روند نورون‌زایی مغز بالغ (23)، می‌توان از این روش برای بررسی‌های غربالگری عوامل مؤثر در روند نورون زایی استفاده کرد.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که فلوسیتومتری روشی ساده، سریع و دقیق است که می‌توان از آن به عنوان روشی جایگزین برای شمارش‌های دستی در ارزیابی میزان نورون‌زایی سلول‌های بنیادی عصبی استفاده کرد. این جایگزینی به

ویژه برای غربالگری مواد و فاکتورهای متفاوت با غلظت‌های مختلف اهمیت پیدا می‌کند، زیرا با این روش می‌توان بیشترین تعداد نمونه را در کوتاه‌ترین زمان و با کم‌ترین هزینه مورد بررسی قرار داد.

منابع

1. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. J Neurosci 1992; 12(11):4565-74.
2. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science 1992; 255(5052):1707-10.
3. Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der KD. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. J Neurosci 1996; 16(8):2649-58.
4. Magavi SS, Macklis JD. Manipulation of neural precursors in situ: induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. Neuropsychopharmacology 2001; 25(6):816-35.
5. Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. J Neurosci 2001; 21(17):6718-31.
6. Magavi SS, Macklis JD. Induction of neuronal type-specific neurogenesis in the cerebral cortex of adult mice: manipulation of neural precursors in situ. Brain Res Dev Brain Res 2002; 134(1-2):57-76.
7. Parent JM, Valentin VV, Lowenstein DH. Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. J Neurosci 2002; 22(8):3174-88.
8. Lee ST, Chu K, Park JE, Lee K, Kang L, Kim SU et al. Intravenous administration of human neural stem cells induces functional recovery in Huntington's disease rat model. Neurosci Res 2005; 52(3):243-9.
9. Yoshida H, Hayashi S, Shultz LD, Yamamura K, Nishikawa S, Nishikawa S et al. Neural and skin cell-specific expression pattern conferred by steel factor regulatory sequence in transgenic mice. Dev Dyn 1996; 207(2):222-32.
10. Othman MM, Klueber KM, Roisen FJ. Identification and culture of olfactory neural progenitors from GFP mice. Biotech Histochem 2003; 78(2):57-70.
11. Liu Z, Martin LJ. The adult neural stem and progenitor cell niche is altered in amyotrophic lateral sclerosis mouse brain. J Comp Neurol 2006; 497(3):468-88.
12. Schanzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H et al. Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. Brain Pathol 2004; 14(3):237-48.
13. Buhring HJ, Kuci S, Conze T, Rathke G, Bartolovic K, Grunebach F et al. CDCP1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin. Stem Cells 2004; 22(3):334-43.
14. Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. Neurobiol Aging 2005; 26(1):115-23.
15. Fang B, Liao L, Shi M, Yang S, Zhao RC. Multipotency of Flk1CD34 progenitors derived from human fetal bone marrow. J Lab Clin Med 2004; 143(4):230-40.
16. Schwartz PH, Bryant PJ, Fuja TJ, Su H, O'Dowd DK, Klassen H. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. J Neurosci Res 2003; 74(6):838-51.
17. Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. Nature 2001; 412(6848):736-9.
18. Chung S, Shin BS, Hedlund E, Pruszak J, Ferree A, Kang UJ et al. Genetic selection of sox1GFP-expressing neural precursors removes residual tumorigenic pluripotent stem cells and attenuates tumor formation after transplantation. J Neurochem 2006; 97(5):1467-80.
19. Barraud P, Thompson L, Kirik D, Bjorklund A, Parmar M. Isolation and characterization of neural precursor cells from the Sox1-GFP reporter mouse. Eur J Neurosci 2005; 22(7):1555-69.
20. Fukuda H, Takahashi J, Watanabe K, Hayashi H, Morizane A, Koyanagi M et al. Fluorescence-activated cell sorting-based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation. Stem Cells 2006; 24(3):763-71.
21. Sergent-Tanguy S, Chagneau C, Neveu I, Naveilhan P. Fluorescent activated cell sorting (FACS): a rapid and reliable method to estimate the

Methods Mol Biol 2005; 290:265-80.
23. Scheffler B, Walton NM, Lin DD, Goetz AK, Enikolopov G, Roper SN et al. Phenotypic and functional characterization of adult brain neuropoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(26):9353-8.
number of neurons in a mixed population. J Neurosci Methods 2003; 129(1):73-9.
22. Louis SA, Reynolds BA. Generation and differentiation of neurospheres from murine embryonic day 14 central nervous system tissue.

Original Article

Journal of Isfahan Medical School
Vol 25, No 86, Fall 2007

Received: 17.5.2007
Accepted: 26.7.2007

Comparison of Neural Stem Cells Neurogenesis by Using Flow Cytometry versus Manual Counting Method

Hassan Azari MSc*, Mohammad Ghasem Golmohammadi MSc**, Ebrahim Esfandiari PhD***, Mohammad Mardani PhD****, Brent Allan Reynolds PhD*****.

* Student of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences; Instructor of Anatomy, Shiraz University of Medical Sciences
** Instructor of Anatomy, Ardebil University of Medical Sciences
*** Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences
**** Associated Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences
***** Professor of Queen's Land University, Australia

Abstract

Background: Finding factors that can increase neurogenesis are of great importance. To find these factors, it seems that neural stem cells culture is an ideal method. To analyze the effect of different factors in a limited period of time and with the least cost, finding an easier and more efficient method than normal manual counting method is needed. The aim of this study was using flow cytometry as an alternative method to evaluate neural stem cells neurogenesis.

Methods: Neural stem cells from E14 mouse brain have been differentiated in a one- step and a two -step methods. After performing immunohistochemistry for neuronal and astrocytic markers, manual and flow cytometry methods have been compared in determining the percentage of neurons and astrocytes. Then, the percentage of neurons and astrocytes generated in two different differentiation methods has been compared using flow cytometry.

Findings: Our findings showed that there wasn't any statistical difference between manual and flow cytometry methods in determining the percentage of neurons and astrocytes. Comparing differentiation methods by flow cytometry, showed that the percentage of both neurons and astrocytes were significantly different in theses two methods ($p<0.001$).

Conclusion: Flow cytometry is a simple and reliable method that can replace manual counting method to evaluate neurogenesis of the neural stem cells. This method would be very useful especially when a high content screening of different factors and compounds is needed.

Key words: **Neural stem cell, differentiation, flow cytometry, neurogenesis**

Page count: 9
Tables: 1
Figures: 3
References: 23

Address of Correspondence: Hassan Azari MSc, Student of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Iran.
E-mail: azarihasan@sums.ac.ir