

**بررسی تأثیر مایع مغزی نخاعی جنینی رت نژاد H-Tx بر تکثیر و تمایز سلول‌های پروژنیاتور کورتکس مغز رت نژاد ویستار**محمد نبیونی<sup>۱\*</sup>، زهرا صفایی نژاد<sup>۲</sup> Ph.D. Student

۱- زیست‌شناسی سلولی تکوینی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی تهران، ایران

۲- دانشجوی دکتری سلولی تکوینی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: nabiyuni@khu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۹

**چکیده**

**هدف:** هدف از مطالعه حاضر این است که نشان داده شود که انسداد جریان CSF در رت هیدروسفال نژاد تگزاس (H-Tx) و در نتیجه تغییر در محتوی پروتئینی آن می‌تواند موجب تکوین غیر طبیعی کورتکس گردد.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های کورتکس از جنین‌های رت نژاد ویستار ۱۸ و ۲۱ روزه استخراج و به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت نوروبازال کشت شدند. سلول‌ها در دو گروه تجربی قرار گرفتند و با غلظت‌های مختلف CSF حرارت دیده و حرارت ندیده که از جنین‌های ۲۰ و ۲۱ روزه جمع‌آوری شده بودند کشت شدند. پس از طی ۴۸ ساعت، سلول‌ها از نظر مورفولوژیکی و میزان تکثیر بررسی شدند.

**نتایج:** CSF هیدروسفال جنینی مهارکننده تکثیر پروژنیاتورهای کورتکس نرمال استخراج شده از جنین رت بود. این اثر CSF با حرارت از بین رفت.

**نتیجه‌گیری:** CSF محتوی فاکتورهای مهمی است که قادر به تحریک تکثیر و تمایز سلولی است و احتمالاً برخی از این فاکتورها پروتئین می‌باشند و به نظر می‌رسد که اختلال در جریان CSF و تغییر در ترکیب آن می‌تواند موجب ایجاد نقایصی در کورتکس مغز در مبتلایان به هیدروسفال گردد.

**واژگان کلیدی:** رت، هیدروسفال، سلول‌های پروژنیاتور عصبی، مایع مغزی-نخاعی

## مقدمه

در جوندگان و پریمات‌ها از جمله انسان تکوین کورتکس مغز که شامل مراحل تکثیر سلولی، مهاجرت و تمایز سلول‌های نورونی است در اواخر دوران جنینی و اوایل دوران پس از تولد به وقوع می‌پیوندد. مطالعات نشان می‌دهند که در مدل رت، فرآیندهای تکوینی تکثیر، مهاجرت و تمایز نورونی در روزهای ۱۶ تا ۱۹ دوران جنینی به وقوع می‌پیوندد اما در زمان پس از تولد میزان تمایز سلولی و سیناپس‌زایی افزایش می‌یابد (۱). بررسی‌های متعددی که در طی دهه اخیر صورت گرفته‌اند نقش غیر قابل انکار مایع مغزی نخاعی را در طی این مراحل اثبات می‌نمایند (۲ و ۳). مایع مغزی نخاعی (CSF) مایعی است شفاف و بی‌رنگ، که دارای محتوای پروتئینی و سلولی پایینی می‌باشد. CSF به‌طور مداوم توسط شبکه‌های کوروئید بطن‌های جانبی، سوم و چهارم تولید می‌شود. این مایع از نظر مواد تشکیل دهنده شباهت زیادی به پلاسما دارد و اختلاف اصلی بین این دو، در محتوای پروتئینی آن‌ها است. سد خونی-مایع مغزی نخاعی جابجایی اغلب پروتئین‌ها را محدود می‌کند (۴). بر اساس نتایج حاصل از مطالعاتی که طی دهه اخیر بر روی CSF انجام شده است این مایع علاوه بر دارا بودن ویژگی ضربه‌گیری و وظایف مکانیکی، دارای وظایف مهم دیگری در دوران جنینی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به نقش محتویات پروتئینی و به‌ویژه تاثیر فاکتورهای رشد آن در حمایت و سازماندهی رشد و نمو طبیعی مغز اشاره نمود (۵). هیدروسفالی نوعی بیماری است که در نتیجه عدم توازن میان ترشح و بازجذب مایع مغزی نخاعی ایجاد می‌گردد (۶). تا به امروز تحقیقاتی که بر روی این بیماری انجام گرفته است بیشتر بر اثرات مکانیکی تجمع CSF در تمامیت ساختار و عملکرد مغز تاکید داشته‌اند و نقش CSF به‌عنوان یک ترکیب فعال در روند تکوین نرمال کورتکس مغز کمتر مورد توجه قرار گرفته است (۷-۱۱). هدف از مطالعه حاضر بررسی ارتباط بین انسداد جریان CSF و وقوع یافته در هیدروسفالی و تکوین غیر طبیعی کورتکس مغز و بررسی نقش احتمالی پروتئین‌ها در این روند است بدین منظور، CSF از رت‌های نژاد H-Tx (رت نژاد تگزاس) استخراج گردید. رت H-Tx حیوان مدل هیدروسفالی مادرزادی می‌باشد (۱۲). مغز این حیوانات در مقایسه با رت‌های ویستار دارای مقادیر اضافه از تجمع آب می‌باشد (۱۳). در این تحقیق رت نژاد H-Tx به‌دلیل وقوع طبیعی هیدروسفالی و همچنین شباهت زیاد آن به نوع هیدروسفالی مادرزادی انسانی مورد استفاده قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**نگهداری و آماده نمودن حیوانات آزمایشگاهی:** در این مطالعه تجربی، به‌منظور تهیه نمونه‌های CSF جنینی از کلونی رت نژاد H-Tx (اهدایی دکتر جلیل احمد میان از دانشگاه منچستر) و به‌منظور تهیه پروژنیوتورهای کورتکس مغز از کلونی رت مدل ویستار (تهیه شده از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی تهران) استفاده گردید. حیوانات آزمایشگاهی با شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و تغذیه و آب کافی نگهداری و پرورش داده شدند و انجام آزمایشات بر اساس مصوبات کمیته اخلاق زیستی گروه علوم جانوری در دانشکده علوم زیستی صورت پذیرفت.

**جمع‌آوری CSF:** مورد استفاده در این بررسی از جنین‌های رت H-Tx طی روزهای خاص حاملگی (روزهای ۲۰ و ۲۱) استخراج شدند. جهت استخراج CSF، رت‌های مادر توسط استنشاق گاز CO<sub>2</sub> کاملاً بی‌هوش شدند و جنین‌های آن‌ها همراه با رحم از بدن خارج شد. پس از شستشو در سرم، جنین‌ها به پلیت‌های استریل منتقل شدند. به‌منظور جمع‌آوری CSF ابتدا نوک پیپت پاستور توسط حرارت مستقیم نازک گردید. با استفاده از پیپت پاستور نازک شده CSF از ناحیه بطن‌های جانبی جنین رت H-Tx جمع‌آوری گردید. تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده به‌داخل میکروتیوب‌های استریل منتقل شدند و در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در پایان مایع رویی به‌داخل میکروتیوب‌های استریل منتقل شد و میکروتیوب‌ها بلافاصله در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند. در رت H-Tx بطن‌های جانبی به‌میزان زیادی بزرگ شده‌اند و این امر جمع‌آوری CSF از این ناحیه را در این موجودات تسهیل می‌کند (۱۴ و ۱۵).

**کشت پروژنیوتورهای کورتکس مغز:** کورتکس نیمکره‌های مغز جنین‌های سالم ۱۸ و ۲۰ روزه رت‌های ویستار جدا شدند و در بافر نمکی فسفات (PBS) سرد قرار گرفتند. پس از هضم مکانیکی، به‌منظور هضم آنزیمی، بافت به مدت ۲۰ دقیقه در Trypsin-EDTA (Sigma, UK) ۲۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به‌دنبال آنکوآسیون، تریپسین-EDTA توسط محیط کشت نوروبال (Gibco, UK) غنی شده با B27 (Gibco, UK) غیرفعال شد. این محیط کشت یک محیط فاقد سرم را جهت بقا و تکثیر پروژنیوتورهای نورونی فراهم می‌کند. در ادامه سوسپانسیون سلولی سانتریفیوژ شد و پس از

$P < 0.05$  معنی دار تلقی گردید و هر آزمایش حداقل ۳ مرتبه تکرار شد و داده‌ها به صورت میانگین همراه با انحراف معیار نشان داده شدند.

### نتایج

نتایج حاصل از بررسی میزان تکثیر سلول‌های پروژنیاتور کورتکس مغز، در حضور مایع استخراج شده از جنین‌های رت H-Tx نشان داد که CSF جمع آوری شده از جنین‌های رت هیدروسفال H-Tx در روز ۲۱ دارای اثر مهارى بر روند تکثیر پروژنیاتورهای کورتکس مغز رت‌های ویستار روزهای ۱۸ و ۲۰ می‌باشد این اثر مهارى ممکن است به علت حضور پروتئین‌ها و پپتیدها باشد زیرا در گروهی که با CSF حرارت دیده تیمار شده بود این اثر مهارى مشاهده نشد. به علاوه نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که اثر مهارى CSF در روند تکثیر سلول‌های کورتکس مغز وابسته به دوز می‌باشد به گونه‌ای که CSF، ۲۵ درصد از اثر مهارى بیشتری در مقایسه با CSF، ۱۰ درصد برخوردار بود (شکل ۱. A, B). در شرایط *in vivo* سلول‌ها در تماس با CSF همان سن می‌باشند. جهت ایجاد چنین شرایطی سلول‌های ۲۰ روزه رت نژاد ویستار با CSF استخراج شده از رت H-Tx ۲۰ روزه تیمار شدند. در این مورد نیز نتایج مشابه با دو گروه قبلی حاصل گردید (شکل ۱C). از طرف دیگر نتایج این بررسی نشان داد که سلول‌های استخراج شده از جنین‌های ۱۸ روزه رت در محیط کشت نوروبازال سرعت تکثیری بالاتری در مقایسه با سلول‌های استخراج شده از جنین‌های ۲۰ روزه رت دارند. این نتایج نشان می‌دهد که توانایی تکثیر سلولی با افزایش سن کاهش می‌یابد (شکل ۲). در روند بررسی اثر مهارى CSF روزهای ۲۰ و ۲۱ جنینی بر روی سلول‌های استخراج شده از جنین‌های ۱۸ و ۲۰ روزه رت، تعداد سلول‌ها در نمونه ۱۸ روزه در مقایسه با ۲۰ روزه بیشتر بود که این نیز مربوط به توانایی تکثیر بیشتر سلول‌ها در این سن می‌باشد. بررسی میکروسکوپی سلول‌های ۱۸ روزه رت در محیط نوروبازال پس از طی ۲۴ ساعت ظهور زوائد نورورونی که نشان دهنده آغاز تمایز سلولی است را نشان داد (شکل ۳). به علاوه نتایج حاصل از بررسی مورفولوژیکی سلول‌ها نتایج قبلی ما را تایید کردند. همان گونه که در شکل ۴ نشان داده شده است CSF استخراج شده از رت هیدروسفال ۲۱ روزه منجر به مهار تکثیر سلول‌های E18 ویستار پس از ۴۸ ساعت گردیده است.

سانتریفیوژ به پلت سلولی محیط نوروبازال تازه اضافه شد. سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه کووت شده با پلی دی لایزین ( $0.05/0.05$  میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به تعداد  $10^4 \text{ cell/ml} \times 10$  در محیط کشت نوروبازال حاوی B27 ۲ درصد،  $100 \text{ Unit/ml}$  آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (Gibco, UK) و ۲mM گلوتامین (Sigma, UK) کشت شدند و درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و  $\text{CO}_2$ ، ۵ درصد انکوبه شدند (۱۴ و ۱۵).

### نحوه بررسی تاثیر CSF جنینی بر پروژنیاتورهای کورتکس

مغز: به منظور بررسی اثر مایع مغزی نخاعی روزهای ۲۰ و ۲۱ بر پروژنیاتورهای کورتکس مغز، سلول‌ها در سه گروه کنترل، گروه تیمار شده با CSF و گروه تیمار شده با CSF حرارت دیده قرار گرفتند. گروه کنترل به عنوان گروهی که هیچ غلظتی از مایع را دریافت نکرد گروه دوم، گروهی بود که با نسبت‌های CSF v/v ۲۵ و ۱۰ که از حیوانات با سنین مختلف جمع آوری شده بود (روزهای ۱۸ و ۲۰) تیمار گشتند. گروه سوم گروهی که با دو غلظت CSF حرارت دیده جمع آوری شده از جنین‌های ۲۰ و ۲۱ تیمار شدند. گروه سوم جهت بررسی نقش احتمالی پروتئین‌ها و پپتیدهای موجود در این مایع طراحی گردید زیرا حرارت باعث دناتور شدن پروتئین‌ها و در نتیجه ممانعت نمودن از فعالیت طبیعی آن‌ها می‌گردد.

### ارزیابی میزان تکثیر سلولی با استفاده از روش ATP-*assay*

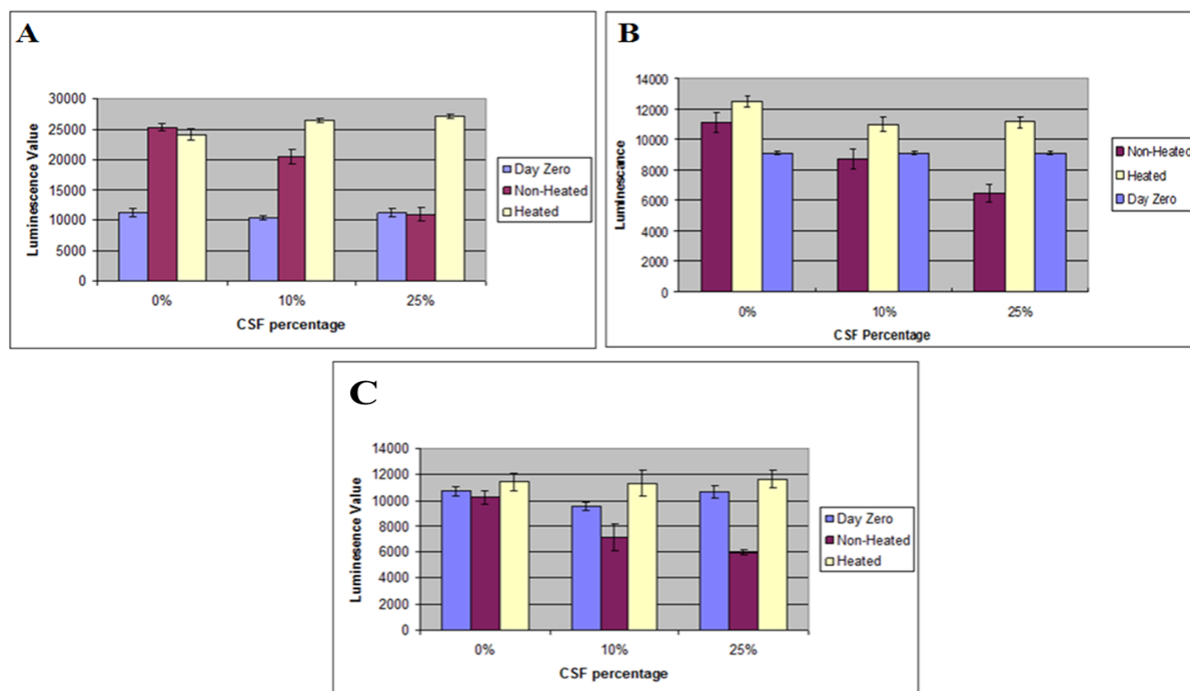
میزان تکثیر سلولی با استفاده از کیت fluorescence based Lumitech Vialight High Sensitivity Cell Proliferation and Cytotoxicity Kit (ViaLight™ HS, Bio Whittaker Company) و بر اساس دستورالعمل آن مورد ارزیابی قرار گرفت. این روش بر پایه اندازه‌گیری میزان ATP استوار است (۱۴).

### ارزیابی مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس:

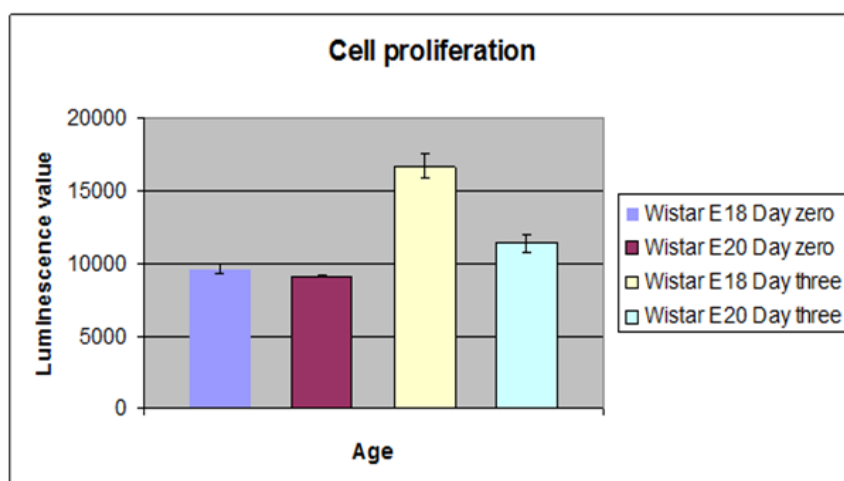
جهت انجام بررسی مورفولوژیکی، سلول‌هایی که تحت تاثیر CSF قرار گرفتند و سلول‌هایی که در محیط نوروبازال فاقد CSF قرار داشتند به دقت توسط میکروسکوپ فاز متضاد با بزرگنمایی  $200\times$  مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۵).

### آنالیز آماری: جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار

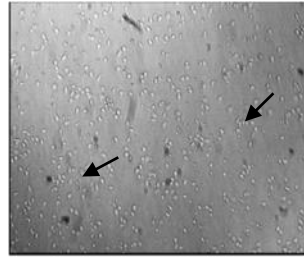
SPSS16 One-way ANOVA آماری پارامتریک استفاده شد. نمودارها از طریق نرم افزار Excel رسم شدند.



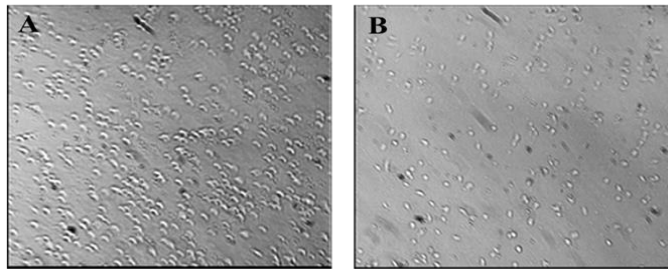
شکل ۱: مقایسه اثر CSF جنینی استخراج شده از رت ۲۱ روزه H-Tx بر میزان بقا و تکثیر پروژنیوتورهای کورتکس مغز استخراج شده از جنین‌های رت ویستار ۱۸، ۲۰ و ۲۱ روزه، (A) و CSF جنینی استخراج شده از رت H-Tx ۲۰ روزه بر پروژنیوتورهای کورتکس مغز جنین ۲۰ روزه، (B) و CSF جنینی استخراج شده از جنین‌های رت ویستار ۱۸ و ۲۰ روزه در مقایسه با گروه کنترل و تکثیری. CSF در هر دو سن و در هر دو غلظت ۱۰ و ۲۵ درصد دارای اثر مهار بر روی سلول‌های ویستار ۱۸ و ۲۰ روزه در مقایسه با گروه کنترل و گروه تیمار شده با CSF گرما دیده بود ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۲: مقایسه میزان تکثیر سلول‌های پروژنیوتور نرمال رت ویستار در سنین مختلف در دوران جنینی. نتایج نشان می‌دهند که سلول‌های پروژنیوتور کورتکس نرمال دارای قدرت تکثیری وابسته به سن می‌باشند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود تفاوت معنی‌داری بین تعداد سلول‌های روزهای ۱۸ و ۲۰ پس از طی ۷۲ ساعت از زمان انکوباسیون در محیط کشت نوروبازال وجود دارد ( $P \leq 0.05$  و  $n=9$ ). سلول‌های ۱۸ روزه دارای قدرت تکثیری بالاتری در مقایسه با سلول‌های ۲۰ روزه می‌باشند.



شکل ۳: فوتومیکروگراف از سلول‌های ۱۸ روزه پس از طی ۲۴ ساعت از انکوباسیون در محیط نوروبازال. فلش‌ها نشان‌دهنده شروع شکل‌گیری استپاله‌ها هستند. (بزرگنمایی ۲۰۰X)



شکل ۴: فوتومیکروگراف از سلول‌های ویستار روز ۱۸ روزه پس از گذشت ۴۸ ساعت از انکوباسیون در محیط نوروبازال، (A) و در CSF هیدروسفال ۲۵ درصد، (B). همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود تراکم سلولی در نمونه‌ای که با CSF هیدروسفال انکوبه شده است در مقایسه با نمونه‌ای که در محیط کشت تنهاست به‌طور چشم‌گیری کاهش یافته است (بزرگنمایی ۲۰۰X).

## بحث

کورتکس مغز روند طبیعی خود را دارد این گونه فرض شد که احتمالاً انسداد جریان CSF و در نتیجه تحت تاثیر قرار گرفتن محتویات آن، در بروز هیدروسفالی موثر است و بر پایه این فرضیه این آزمایش طراحی گردید. نتایج حاصل از این بررسی اثر مستقیم مایع مغزی نخاعی جنینی را در تکوین کورتکس نشان می‌دهد. مایع مغزی نخاعی جنین هیدروسفال ۲۰ و ۲۱ روزه دارای اثر مهاری بر روی سلول‌های پروژنیاتور کورتکس مغز در یک الگوی وابسته به دوز بود این‌گونه استنباط شد که این اثر در ارتباط با پپتیدها و پروتئین‌های موجود در مایع مغزی نخاعی است زیرا این اثر با حرارت دادن CSF از بین رفت. احتمالاً انسداد مسیر CSF در دوران جنینی موجب تجمع موادی می‌گردد که عمل کرد مهاری دارند و یا ترکیباتی وجود دارند که در صورت افزایش غلظت، مهاری می‌شوند. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که سلول‌های پروژنیاتور کورتکس مغز در مایع مغزی نخاعی نرمال و یا حرارت دیده بقا می‌یابند که این امر بیان‌گر این واقعیت است که CSF جنینی یک محیط مغزی را برای سلول‌ها به‌وجود می‌آورد و نیازی به اضافه نمودن فاکتورهای رشد و سایر ترکیبات نیست. محققان دیگر نیز به بررسی نقش CSF در تکوین سیستم عصبی پرداخته‌اند به‌طور مثال مشایخی و همکاران (۱۴) با استفاده از بررسی‌های هیستولوژیکی نشان دادند که در رت نژاد H-Tx اندازه بطن‌ها در

هیدروسفالی مادرزادی نوعی بیماری مادام‌العمر می‌باشد که تا به امروز راه‌کار مناسبی که موجب درمان قطعی آن گردد ارائه نشده است. تحقیقاتی که تا به امروز بر روی این ناهنجاری صورت گرفته است بیشتر بر اثرات مکانیکی تجمع CSF در این نوع بیماری تاکید داشته‌اند و در نتیجه جراحی و یا شانت‌گذاری با هدف ممانعت نمودن از افزایش فشار داخل جمجمه‌ای و منحرف کردن مسیر مایع مغزی نخاعی، روش‌های درمانی متداول هیدروسفالی محسوب می‌گردند (۱۶). رت H-Tx به‌عنوان حیوان مدل هیدروسفالی مادرزادی است در این مدل انسداد در مسیر مایع مغزی نخاعی در روز ۱۸ دوران جنینی یعنی زمانی که در تکوین کورتکس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است به‌وقوع می‌پیوندد (۱۷). پیش از انسداد جریان CSF در قنات سیلویوس، نوروزنژ و مهاجرت از اپی‌تلیوم زایا مانند رت نرمال صورت می‌گیرد اما به‌دنبال انسداد جریان CSF تکثیر سلولی کاهش می‌یابد و نوروزنژ اپی‌تلیوم زایا غیرطبیعی می‌شود (۱۴ و ۱۸). مدل رت هیدروسفالی دارای ویژگی‌های مشترکی با انسان مبتلا به هیدروسفالی مادرزادی می‌باشد و در نتیجه مدل مناسبی برای فهم بسیاری از فرآیندهای پاتوفیزیولوژیکی است که در این بیماری به‌وقوع می‌پیوندد. با توجه به این‌که در این مدل تا پیش از وقوع انسداد در مسیر جریان CSF تکوین

برحسب این که تحت تاثیر CSF کدامیک از روزهای جنینی قرار گیرند رفتار متمایزی از خود نشان می دهند. به نحوی که این سلولها تحت تاثیر CSF جنینی ۱۷ و ۱۹ روزه مارکرهای تمایز نورونی (MAP-2 و beta III tubulin) را بیان می نمایند، درحالی که تحت تاثیر CSF جنینی روزهای ۱۸ و ۲۰ بیان مارکرهای تمایزی در حداقل می باشد. این سلولها تحت تاثیر CSF جنینی ۱۸ روزه بیشترین میزان تکثیر سلولی را نشان می دهند، که این بدان معنی است که تکثیر سلولهای PC12 تحت تاثیر فاکتورهای رشد متفاوتی جدا از فاکتورهای درگیر در تمایز نورونی می باشد. به علاوه تیمهای تحقیقاتی متعددی گزارش نموده اند که فاکتورهای مختلفی مانند فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGFs)، فاکتورهای رشد شبه انسولین (IGFs)، رتینوئیک اسید (RA)، BMPs و Wnt در مایع مغزی نخاعی جنینی حضور دارند که قادر به تحریک تکثیر پروژنیوتورهای مغز می باشند (۲۳).

### نتیجه گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان می دهد CSF جنینی محتوی فاکتورهای مهمی است که قادر به تحریک تمایز و تکثیر سلولی است و احتمالاً برخی از این فاکتورها پروتئین می باشند. این مطالعه به خوبی اثبات کننده این نکته است که در مبتلایان به هیدرسفالی نه تنها افزایش میزان CSF روند تکوین نرمال مغز را تحت تاثیر قرار می دهد بلکه تغییر در محتویات پروتئینی این مایع نیز در پیش برد این بیماری موثر است.

### تشکر و قدردانی

این کار در قالب طرح مشترک بین نویسندگان مقاله و آقای دکتر احمد جلیل میان انجام پذیرفت لذا نویسندگان از دکتر احمد جلیل میان به دلیل در اختیار گزاردن نمونه های هیدروسفال و مایع مغزی نخاعی مورد استفاده در این تحقیق سپاسگزاری نموده و قدردان حمایت های ریاست محترم دانشکده علوم زیستی جهت تامین بودجه از محل کمیته بیوتکنولوژی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی می باشند.

### منابع

1. Berger-Sweeney J, Hohmann CP. Behavioral consequences of abnormal cortical development : insights into developmental disabilities. Behavioural brain research 1997; 86: 121-142.

مقایسه با رت نژاد ویستار و رت H-Tx نرمال بزرگتر است در صورتی که ضخامت کورتکس مغز در رت های H-Tx به صورت چشم گیری در مقایسه با رت نژاد ویستار و رت H-Tx نرمال کاهش می یابد. آن ها همچنین نشان دادند که ضخامت اپی تلیوم زایا در گروه مبتلا در روز ۱۹ و ۲۰ دوران جنینی و ۱ الی ۲ روز پس از تولد کاهش می یابد. آن ها برای اثبات تاثیر CSF بر این روند، استخراج شده از رت های ۲۰ روزه نژاد ویستار و رت های ۲۰ روزه نژاد H-Tx را بر روی پروژنیوتورهای کورتکس مغز استخراج شده از جنین رت نژاد ویستار اثر دادند و اثبات نمودند که CSF دارای اثر مهاری در روند تکثیر این سلولها می باشد. نتایج حاصل از بررسی Gato و همکارانش (۱۹) که بر روی قطعات نوروایپیلیوم مزنسفال مغز جوجه که به روش ارگانوتیپیک کشت شدند صورت گرفت نشان داد که تکثیر، تمایز و مهاجرت سلولی نرمال در نورون های لایه اپی تلیالی لایه ژرمینال صورت نمی گیرد مگر این که CSF جنینی به محیط کشت اضافه گردد. Martin و همکارانش (۲۰) نشان دادند که CSF جنینی دارای نقش تغذیه ای بر رفتار سلول های پیش ساز نوروایپیلیالی (Neuroepithelial precursor cells =NPC) در جنین های رت می باشد. آن ها اثبات نمودند که رفتار NPC در طی دوران جنینی و همچنین دوران بلوغ ارتباط مستقیمی با محتویات حفرات مغزی به طور مثال CSF دارد. مطالعه دیگری در این زمینه توسط Lehtinen و همکاران (۲۱) انجام شد. آن ها نشان دادند که CSF از طریق توزیع سیگنالها در سیستم عصب مرکزی یک نیچ تکثیری را برای سلول های پروژنیوتور نورونی فراهم می کند. بررسی های این گروه تحقیقاتی اثبات نمود که CSF تنظیم کننده تکثیر سلول های پروژنیوتور کورتکس مغز در یک رفتار وابسته به Igf2 می باشد. آن ها پیشنهاد کردند که با توجه به افزایش غلظت Igf2 موجود در مایع مغزی نخاعی در مبتلایان به malignant glioblastoma، پروتئین های موجود در CSF ممکن است منجر به ایجاد تومور در سیستم عصب مرکزی گردند. یاری و همکاران (۲۲) نیز با استفاده از روش کشت کلونی های نوروسفر (neurosphere) نشان دادند که مایع مغزی نخاعی روزهای ۱۶ و ۱۸ جنینی قادر به القا تکثیر در پروژنیوتورهای مغزی می باشد در صورتی که تمایز این سلولها را به سمت سرنوشت گلیالی کاهش می دهند (۲۲). نبیونی و همکاران (۱۵) به منظور مدل سازی تمایز نورونی در محیط *in vitro* از CSF جنینی روزهای ۱۷ و ۲۰ روزه استفاده نمودند. نتایج حاصل از بررسی آن ها نشان داد که سلول های PC12



2. Miyan JA, Nabiyouni M, Zendah M. Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2003; 81: 317–328.
3. Lowery LA, Sive H. Initial formation of zebrafish brain ventricles occurs independently of circulation and requires the *nageoko* and *snakehead/atplala.1* gene products. *Development* 2005; 132(9): 2057–2067.
4. Zheng W, Chodobski A. *The Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier*, Taylor and Francis group. 2006; 3(12):1-2.
5. Miyan JA, Nabiyouni M, Zendah M. Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003; 81:317-328.
6. Philippon J. ["Normal pressure" hydrocephalus]. *Psychol Neuropsychiatr Vieil.* 2005; 3(1): 53-61. (Full text in French)
7. Crews L, Wyss-Coray T, Masliah E. Insights into the pathogenesis of hydrocephalus from transgenic and experimental animal models. *Brain Pathol.* 2004; 14(3): 312-316.
8. Ding Y, McAllister JP, Yao B, Yan N, et al. Neuron tolerance during hydrocephalus. *Neuroscience.* 2001; 106: 659-667.
9. Kondziella D, Lu-demann W, Brinker T, Sletvold O, et al. Alterations in brain metabolism, CNS morphology and CSF dynamics in adult rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Brain Res.* 2002; 927(1): 35-41.
10. Vachha B, Adams R. Memory and selective learning in children with spina bifida-myelomeningocele and shunted hydrocephalus: A preliminary study. *Cerebrospinal Fluid Research.* 2005; 17: 2: 10.
11. Pattisapu JV. Etiology and clinical course of hydrocephalus. *Neurosurg Clin N Am.* 2001; 12(4): 651-659, vii.
12. Kohn DF, Chinookoswong N, Chou SM. A new model of congenital hydrocephalus in the rat. *Acta Neuropathol.* 1981; 54(3): 211-8.
13. Cai X, McGraw G, Pattisapu JV, Von Kalm L, et al. Hydrocephalus in the H-Tx rat: a monogenic disease. *Exp Neurol.* 2000; 163(1): 131-5.
14. 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: 1859-1874.
15. Nabiuni M, Rasouli J, Parivar K, Kochesfehiani HM, et al. In vitro effects of fetal rat cerebrospinal fluid on viability and neuronal differentiation of PC12 cells. *Fluids and Barriers of the CNS.* 2012; 9:8.
16. Patwardhan RV, Nanda A. Implanted ventricular shunts in the United States: the billion-dollar-a-year cost of hydrocephalus treatment *Neurosurgery.* 2005; 56(1): 139-44.
17. Pourghasem M, Mashayekhi F, Bannister CM, Miyan JA. Changes in the CSF Fluid Pathways in the Developing Rat Fetus with Early Onset Hydrocephalus. *Eur J Pediatr Surg.* 2001; 11(Suppl 1): S10-13.
18. Mashayekhi F, Bannister CM, Miyan JA. Failure of cell proliferation in the germinal epithelium of the HTx rat. *Eur J Pediatr Surg.* 2001; 11(1): S57-S59.
19. Gato A, Moro JA, Alonso MI, Bueno D, et al. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anatomical Record Part A-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology* 2005; 284(10): 475-484.
20. Martin C, Alonso MI, Santiago C, Moro JA, et al. Early embryonic brain development in rats requires the trophic influence of cerebrospinal fluid. *Int. J. Devl Neuroscience* 2009; 27(7): 733–740.
21. Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, et al. The Cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron.* 2011; 69: 893–905.
22. Yari S, Parivar K, Nabiuni M, Keramatipour M. Effect of embryonic cerebrospinal fluid on proliferation and differentiation of neuroprogenitor cells. *Cell J* 2013; 15(1): 29-36.
23. Zappaterra MW, Lehtinen MK. The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior and beyond. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012; 69(17): 2863-2878.

## Study of the Effect of Prenatal CSF from H-Tx Rat on Proliferation and Differentiation of the Wistar Rat's Cortical Progenitor Cells

Nabiuni M, Ph.D.<sup>1\*</sup>, Safaeinejad Z, Ph.D.Student<sup>2</sup>

1. Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Biology Science, Kharazmi University, Tehran, Iran

2. Ph.D.Student. Department of Animal Biology, Faculty of Biology Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

\* Email corresponding author: nabuni@khu.ac.ir

Received: 28 Jan. 2013

Accepted: 14 Jan. 2014

---

### Abstract

**Aim:** The aim of present study was to demonstrate that the obstruction of CSF flow in hydrocephalic Texas (HT-x) rat and the resulting changes in its protein components can cause abnormal cortical development.

**Material and Methods:** Cortical cells were taken from E18 and E21 Wistar fetuses and cultured for 24 hours in Neurobasal medium. Two groups of experiments were explored. These cells were treated with heated and non-heated CSF collected from E20 and E21 fetuses. The cells were cultured for a further 48 hours. At the end of this time, proliferation assays and morphological analysis were performed

**Results:** Prenatal affected CSF had an inhibitory effect on the proliferation of normal primary fetal cortical cells. Heating the CSF removed this effect.

**Conclusion:** CSF contains important factors that can stimulate both proliferation and cell differentiation and that some of these are likely to be proteins. Disruption of CSF flow can cause the cortical deficiencies in patients with hydrocephalous.

**Keywords:** Rat, Hydrocephalous, Neuroprogenitor cells, Cerebrospinal fluid