Short Communication

The Influence of Cerebrospinal Fluid Accompanied by Retinoic Acid on Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Neuron-like Cells In Vitro

Ghazaleh Goudarzi[1], Hatef Ghasemi Hamidabadi[2], Alireza Abdanipour[3], Homa Mohseni Kouchesfehani[4], Amir Esmaeilnejad Moghaddam[5*]

1- M.Sc., Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Anatomy & Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2- Assistant Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Anatomy & Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3- Assistant Professor, Department of Anatomy & Cell Biology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
4- Associated Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
5- Associated Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Anatomy & Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 4847191971, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Anatomy & Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran*
Email: mog1339@gmail.com

Received: 26/Apr/2015, Accepted: 05/Jan/2016

Abstract

Objective: Cerebrospinal fluid (CSF) has a broad range of molecules and neurotrophic factors essential for neurogenesis. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are multipotent stem cells that can differentiate into the cells with neural-like phenotype under the induction of appropriate growth factors. According to the significant role of retinoic acid (RA) in neurogenesis, this study aims to differentiate BMSCs into neuron-like cells using CSF, RA, and the combination of CSF and RA.

Methods: Rat BMSCs were isolated and characterized. The CSF was prepared from the cisterna magna of 19-day-old Wistar rat embryos. The BMSCs were induced by either 5% CSF (CSF group), 10^{-6} µM RA (RA group), or CSF plus RA (CSR group) for 12 days. Morphology of differentiated cells was examined by inverted microscope and axonal outgrowth measured using Image J software. In addition, the expression of neural-specific markers (Nestin and MAP-2) was examined by immunocytochemistry.

Results: We observed specific-neuronal morphology in the differentiated cells. The maximum axon length was seen in the CSR group on the 12th day of induction. Immunocytochemistry results showed that the neural progenitor marker (Nestin) was expressed in all treated groups. However, MAP-2, as a mature neural marker, was only expressed in the CSR group.

Conclusion: The findings suggest that CSF accompanied RA lead to differentiation of cells with neuronal and glial phenotypes from BMSCs in vitro.

Keywords: BMSCs, Cerebrospinal fluid, Retinoic acid, Neuron-Like Cells, Differentiation

Pathobiology Research, Vol. 18 (2015-2016), No.4, Pages: 79-91

مقاله کوتاه

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های شبه عصبی تحت تأثیر اسید رتینوییک و مایع مغزی–نخاعی رت

غزاله گودرزی[1]، هاتف قاسمی حمیدآبادی[2]، علیرضا عبدانی پور[3]، هما محسنی کوچصفهانی[4]، امیر اسماعیل نژاد مقدم[5*]

۱-کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲-استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳- استادیار، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۴- دانشیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۵- دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، ساری، کدپستی: ۴۸۴۷۱۹۱۹۷۱، داشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی
Email: mog1339@gmail.com

دریافت مقاله: ۹۴/۰۳/۰۷ پذیرش مقاله: ۹۴/۱۰/۱۶

چکیده

هدف: مایع مغزی-نخاعی دارای طیف گسترده‌ای از مولکول‌ها و عوامل نوروتروفیک است که برای نورون‌زایی ضروری است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، سلول‌های چند توانی هستند که قابلیت تمایز به سلول‌های با فنوتیپ شبه عصبی را تحت القای عوامل رشد مناسب دارند. با توجه به نقش انکارناپذیر اسید رتینوییک در نورون‌زایی، هدف از این مطالعه القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های شبه عصبی در حضور مایع مغزی-نخاعی، رتینوییک اسید و ترکیب توام مایع مغزی-نخاعی و رتینوییک اسید است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی جداسازی و شناسایی شدند. مایع مغزی-نخاعی از قنات بزرگ جنین‌های رت نژاد ویستار ۱۹ روزه تهیه شد. سپس سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به‌مدت ۱۲ روز تحت القا ۵ درصد مایع مغزی-نخاعی (گروه مایع مغزی-نخاعی)، ٦-۱۰ میکرومول اسید رتینوییک (گروه اسید رتینوییک) و ترکیب توام مایع مغزی-نخاعی و رتینوییک اسید (گروه مغزی-نخاعی/ رتینوییک اسید) قرار گرفتند. ویژگی‌های ریخت‌شناسی سلول‌های تمایز یافته به‌وسیله میکروسکوپ معکوس ارزیابی شد و رشد آکسون با استفاده از نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شد. با استفاده از ایمونوسیتوشیمی بیان نشانگرهای خاص عصبی (نستین و MAP-2) ارزیابی شد.

نتایج: ویژگی‌های ریخت‌شناسی خاص نورونی در سلول‌های تمایز یافته مشاهده شد. حداکثر طول آکسون در روز دوازدهم القا در گروه مغزی-نخاعی/ رتینوییک اسید دیده شد. نتایج ارزیابی ایمونوسیتوشیمی بیان نشانگر پیش‌ساز عصبی (نستین) را در تمام گروه‌های تحت القا نشان داد. در حالی‌که بیان نشانگر MAP-2 که به‌عنوان نشانگر سلول عصبی بالغ شناخته می‌شود در گروه تحت القای توام مایع مغزی-نخاعی و اسید رتینوییک دیده شد.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که مایع مغزی-نخاعی به همراه اسید رتینوییک منجر به تمایز سلول‌هایی با فنوتیپ عصبی و گلیالی در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌شود.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، مایع مغزی-نخاعی، اسید رتینوییک، سلول‌های شبه نورونی، تمایز

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴، صفحات: ۷۹-۹۱

مقدمه

ضایعات طناب نخاعی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پیشرونده سیستم عصبی مرکزی است که باعث ناتوانی عملکردی، به‌خصوص در افراد جوان می‌شود. آسیب‌های نخاعی با تأثیر بر فعالیت فیزیکی بیماران، کیفیت زندگی اجتماعی آن‌ها را نیز تهدید می‌کند؛ بنابراین پیدا کردن یک روش درمانی سریع و مؤثر بسیار ضروری است. از آن‌جایی که سیستم عصبی مرکزی دارای ظرفیت بازسازی محدود است، یکی از مؤثرترین روش‌ها برای جایگزینی سلول‌های از دست رفته، سلول درمانی است. هدف از پیوند سلول بعد از ضایعه نخاعی جایگزین کردن سلول‌های مرده یا آسیب دیده و ایجاد یک محیط مناسب است که به بهترین شکل موجب بازسازی آکسون شود. اخیراً به‌منظور سلول درمانی در انواع بیماری‌های تخریب کننده سیستم عصبی (Neurodegenerative) از منابع سلول‌های بنیادی مختلفی استفاده شده است [۱-۳]. مغز استخوان یکی از منابع غنی از سلول‌های بنیادی است که توانایی تمایز به سایر رده‌های سلولی را داراست. از جمله این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (Bone marrow mesenchymal stem cells: BMSCs) است، این سلول‌ها دارای ویژگی‌هایی هستند که آن‌ها را برای پیوند مناسب کرده است. از جمله آن‌که می‌توان به راحتی آن‌ها را از مغز استخوان استخراج کرد و کشت داد؛ به‌علاوه دارای قدرت تکثیر بالایی هستند. سلول‌های مذکور دارای ایمنی‌زایی (Immunogenicity) پایینی نیز هستند؛ بنابراین سیستم ایمنی را تحریک نمی‌کنند و در نتیجه برای پیوند اتولوگ بسیار سودمندند. این سلول‌ها دارای خاصیت پراستعدادی هستند و در شرایط طبیعی، تمایل آن‌ها برای تمایز به سلول‌های با منشأ مزودرمی مانند استئوبلاست (Osteoblast)، کندروبلاست (Chondroblast) و آدیپوسیت (Adipoblast) بیشتر از سایر رده‌های سلولی است و می‌توانند طیف وسیعی از بافت‌های هم‌بندی مانند غضروف، استخوان و چربی را تشکیل دهند [٤]. با این حال گزارش‌هایی مبنی بر تمایز BMSCها به سایر رده‌های سلولی از جمله سلول‌های با منشأ اکتودرمی نظیر نورون‌ها در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد [٥]. همچنین گزارش‌ها نشان دهنده آن است که تزریق آن به محل ضایعه منجر به ترمیم نسبی ضایعه می‌شود [٦]. در ارتباط با روند این ترمیم فرضیه‌های متفاوتی وجود دارد اما به‌طور کلی ریزمحیط موجود در بافت عصبی در تکثیر و تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان تأثیر فراوانی دارد [٧].

به‌علاوه؛ محققین اعلام داشته‌اند که BMSCهای پیوند شده از طریق بیان عوامل رشد مانند نوروتروفین‌ها (Neurotrophins) محیط مناسبی را برای رشد آکسون فراهم می‌آورند و روند ترمیم ضایعات عصبی را بهبود می‌بخشند [٨]. بنابراین یکی از راه‌کارهای مهم برای تغییر فنوتیپ سلول‌های مزانشیمی به سلول شبه عصبی، مشابه‌سازی محیط بدن یعنی استفاده از عوامل رشد، سیتوکین‌ها و ویتامین‌هایی است که محیط پیرامون سلول‌های عصبی را در بر می‌گیرد. یکی از مواد مورد استفاده برای تمایز، مایع مغزی-نخاعی جنینی (Embryonic Cerebrospinal Fluid: E-CSF) است. مایع مغزی-نخاعی (Cerebrospinal Fluid: CSF) که توسط شبکه کوروییدی (Choroid) با ساختار اپی‌تلیالی و عروق فراوان تولید می‌شود، دارای نقش کلیدی در تمایز سلول‌های عصبی در دوران جنینی است [٩]. تاکنون طیف وسیعی از عوامل مختلف در مایع مغزی-نخاعی شناسایی شده‌است که تمایز نورون‌ها طی دوران جنینی را به حضور این عوامل نسبت می‌دهند [١٠-١٤]. اخیراً از CSF در رده‌های خاص سلولی استفاده شده است. به‌عنوان مثال آثار آزمایشگاهی CSF برالقای تمایز سلول‌های PC12 بررسی شده و گزارش‌ها نشانگر آن است که CSF به‌دلیل داشتن خاصیت نوروتروفیک (Neurotrophic) می‌تواند سبب تمایز سلول‌های PC12 به سلول عصبی شود و مشاهده شده که بعد از کشت این سلول با CSF نشانگرهای عصبی نظیر MAP2 (Microtubule-Associated Protein 2) و β توبولین III (Class III beta-Tubulin) در سلول‌های تمایز یافته بیان شدند [٩]. از دیگر عوامل القای تمایز در سلول‌های بنیادی به سلول شبه عصبی، اسید رتینوییک (Retinoic acid: RA) است.

رتینول (Retinol) یا β کاروتن (ویتامین A) یکی از مهم‌ترین ریخت‌زاها در مراحل اولیه تکامل سیستم عصبی مرکزی است و سبب الگویابی عصبی و در نهایت نورون‌زایی (Neurogenesis) می‌شود [۱۵]. به‌علاوه؛ باعث افزایش طول آکسون شده و در نتیجه می‌تواند به‌عنوان یک مولکول درمانی برای القا بازسازی آکسون و عصب استفاده شود [۱۶]. در این زمینه سقا و همکارانش در تحقیقات خود سلول‌های بنیادی جنینی را تحت تأثیر RA قرار داده و به این نتیجه رسیدند که RA میزان نورون‌زایی را افزایش داده است [۱۵]. با توجه به این‌که تا به حال عوامل القایی مختلفی برای تمایز سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به سلول شبه نورون استفاده شده اما به‌نظر می‌رسد که هیچ‌کدام نتوانسته‌است شرایط ایده‌آل را برای تمایز سلول‌های مذکور فراهم کند و ترمیم ضایعات نخاعی تاکنون به دلایل مختلف با شکست نسبی همراه بوده است؛ اما جایگزینی سلول‌های از بین رفته، ترمیم فیبرهای عصبی و بازسازی نورون‌ها، بعد از ضایعه نخاعی انجام شدنی است، ولی باید شرایط و بستر مناسبی برای سلول‌های پیوندی ایجاد شود [۱۷، ۱۸] و با توجه به این‌که عوامل موجود در CSF با فراهم آوردن شرایطی مشابه بدن موجود زنده برای القا تمایز عصبی مناسب است، بنابراین در این مطالعه به‌منظور ایجاد مدلی مناسب در راستای مطالعات تمایزی در محیط آزمایشگاهی از ترکیب CSF و RA برای القای تمایز BMSCها به سلول‌های شبه عصبی استفاده شده است و به‌علاوه تأثیر هر یک جداگانه ارزیابی و مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه تجربی بوده است. در تحقیق حاضر برای استخراج BMSCها، از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۶-۸ هفته‌ای) استفاده شد. موش‌های صحرایی در مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، تحت شرایط طبیعی شامل چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی، دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد، آب و غذای کافی نگهداری شدند. همه آزمایش‌ها و عمل‌های انجام شده بر اساس قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی مازندران، انجام شد.

جداسازی و کشت BMSCهای موش صحرایی

استخراج BMSCها بر مبنای روش فشاری (Flushing) از استخوان‌های ران و ساق پا (درشت نی) موش‌های صحرایی انجام شد. بدین ترتیب که با استفاده از سرنگ انسولین که حاوی DMEM/F12 (Dulbeco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) (Gibco-Life Technologies، کانادا)، FBS ۱۰ درصد (Fetal Bovine Serum) (Gibco-Life Technologies، کانادا)، ۱۰۰ واحد/ میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Gibco، آمریکا) و ۱۰۰ واحد/ میلی‌لیتر استرپتومایسین (Gibco، آمریکا) بود (محیط کشت پایه مغز استخوان) از هر دو انتهای استخوان آسپیره شد و تمام محتویات سرنگ به درون یک فلاسک کشت سلول ۲۵ سی سی منتقل و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد دی اکسید کربن و شرایط رطوبت ۹۵ درصد برای مدت یک شبانه روز کشت داده شدند. پس از آن تعویض محیط هر ۲ تا ۳ روز تا تخلیه کامل سلول‌های خونی و خون‌ساز ادامه یافت. سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان اغلب دوکی شکل و چسبیده به کف فلاسک باقی ماندند. پس از پرشدن کف فلاسک (۷۰-۸۰ درصد)، سلول‌ها با استفاده از تریپسین (Trypsin) ۰/۲۵ درصد (Gibco، آمریکا) جدا و پاساژ داده شدند. با استناد به مطالعات قبلی و کشت سلول‌ها تا پاساژ ۳-۵، جمعیت تقریباً خالصی از BMSCها چسبیده به کف فلاسک تهیه شدند. علاوه بر این؛ در پژوهش حاضر برای تأیید ویژگی مزانشیمی سلول‌های حاصل از فنوتیپ ظاهری نیز استفاده شد [۱۹].

جمع‌آوری و نگهداری CSF از جنین ۱۹ روزه رت

CSF از جنین‌های رت (Embryonic ،E 19) تهیه شد.

بدین صورت که در شرایط استریل، CSF از ناحیه قنات مغزی بزرگ جمع‌آوری و به میکروتیوب استریل منتقل شد. به‌منظور جلوگیری از آسپیره نمودن و خونریزی از پیپت پاستور برای جمع‌آوری CSF استفاده شد. پس از سانتریفوژ نمودن با سرعت ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه، مایع رویی به‌منظور ادامه روند پژوهش در دمای ۸۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۹، ۲۰].

القای تمایز عصبی

نحوه القای تمایز BMSCها بدین صورت بود که ابتدا ۲×۱۰^{۵} سلول به هر یک از چاهک‌های پلیت ٦ خانه ای اضافه و به‌مدت یک شبانه روز کشت داده شد تا از چسبندگی سلول اطمینان حاصل شود. سپس سلول‌ها به‌مدت ۱۲ روز تحت تأثیر CSF و RA (R2625-100MG، Sigma-Aldrich، آمریکا) به شرح زیر قرار گرفتند. گروه اول که به محیط کشت پایه این گروه ۵ درصد E-CSF اضافه شد (گروه CSF)، گروه دوم که به محیط کشت پایه این گروه RA ($۱۰^{-٦}$ میکرومول) اضافه شد (گروه RA)، گروه سوم که به محیط کشت پایه به نسبت مساوی CSF و RA تواماً اضافه شد (گروه CSR) و گروه کنترل که به این گروه فقط محیط کشت پایه اضافه شد. لازم به ذکر است محیط کشت پایه استفاده شده برای القای تمایز دارای ۵ درصد سرم بود که برای تمامی گروه‌های تیمار در نظر گرفته شد. تعویض محیط هر دو روز یک بار در طول زمان تمایز صورت گرفت. بدین ترتیب که در هر بار تعویض حدود ۵۰ درصد از محیط رویی هر چاهک دور ریخته شد و محیط کشت تازه و مشابه (Refresh) جایگزین شد.

ارزیابی‌های ریخت‌شناختی

ویژگی‌های ریخت شناسی سلول‌های تمایز یافته در گروه‌های مختلف، توسط میکروسکوپ معکوس (Eclipse، Nikon TS100) به‌صورت روزانه مشاهده و بررسی شد. علاوه بر این؛ بزرگ‌ترین استطاله عصبی به‌عنوان آکسون در نظر گرفته شد و طول این زواید در روزهای ششم و دوازدهم تمایز در گروه‌های مختلف توسط نرم‌افزار Image J 1.41 اندازه‌گیری و محاسبه شد.

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی

بررسی بیان نشانگرهای عصبی نستین (Nestin) و MAP-2 در سلول‌های حاصل از تمایز به روش ایمونوسیتوشیمی (Immunocytochemistry) انجام گرفت. سلول‌ها پس از سه بار شستشو با PBS (Phosphate-buffered Saline) توسط پارافرمالدیید ٤ درصد (Paraformaldehyde) (Sigma-Aldrich، آمریکا) تثبیت شد و پس از ۱۵ دقیقه سلول‌های تثبیت شده توسط PBS سه مرتبه شستشو داده شدند.

در مرحله بعد به‌منظور نفوذپذیری سلول‌ها و مهار آنتی‌ژن‌های غیر اختصاصی که احتمال اتصال آنتی‌بادی ثانویه به آن‌ها وجود داشت، به‌ترتیب به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با Triton X-100 (Sigma-Aldrich، آمریکا) و به‌مدت ٤۵ دقیقه با BSA (Bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich، آمریکا) انکوبه شدند. پس از آن سلول‌ها به‌مدت یک ساعت با آنتی‌بادی‌های اولیه نستین (ab6142، mouse monoclonal IgG) (Abcam system، آمریکا) و MAP-2 (ab32454، rabbit polyclonal IgG) (Abcam system، آمریکا) انکوبه شدند و در نهایت سلول‌ها پس از سه مرتبه شستشو با PBS به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با PE (Phycoerythrin) نگهداری شدند. سرانجام با اضافه کردن DAPI (4',6-diamidino-2 phenylindole) (Sigma-Aldrich، آمریکا) به سلول‌ها برای رنگ‌آمیزی هسته، توسط میکروسکوپ فلورسنت (Nikon، Eclipse- TE600، ژاپن) بررسی و عکس‌برداری صورت گرفت [۹].

رنگ‌آمیزی اختصاصی

به‌منظور مشخص کردن اجسام نیسل (Nissl bodies) موجود در سلول‌های شبه عصبی از رنگ‌آمیزی اختصاصی

کریزیل فست ویوله (Cresyl Echt Violet Stain) (Merck، آلمان) در روز دوازدهم القا استفاده شد. بـه‌طـوری کـه ابتـدا سلول‌ها به‌وسیله پارافرمالدیید ٤ درصد به‌مـدت ۲۰ دقیقـه در دمای اتاق تثبیت شدند و پس از سـه بـار شستشـو بـا PBS، سلول‌های گروه‌های مختلف به‌وسیله رنگ کریزیل فست ویوله ۰/۵ درصد به‌مدت ۲-۳ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و سلول‌هـای واکنش مثبت به‌عنوان سلول‌های شبه عصبی در نظر گرفته شدند.

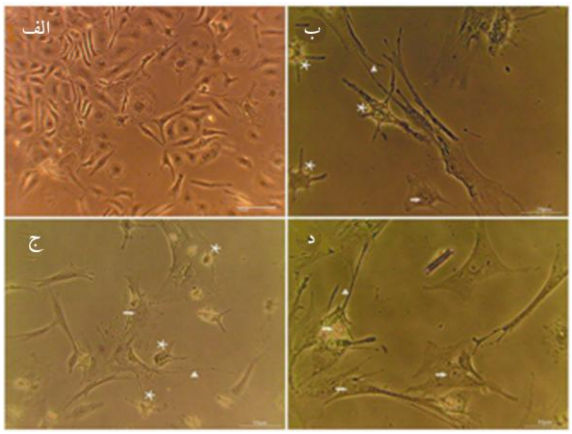
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها بـر مبنـای مقایسـه میـانگین متغیرهای کمی و کیفی بین گروه‌هـا از آزمـون آمـاری آنـالیز واریـانس یـک طرفـه (One-way Analysis of Variance: ANOVA) و کـی اسـکوار (Chi squre) اسـتفاده شـد. محاسبات آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ١٦ انجام گرفت و سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ و P<۰/۰۱ در نظر گرفته شد.

نتایج

به‌طور طبیعی BMSCها پس از ٤ الـی ۵ روز بـه ۸۰-۹۰ درصـد تـراکم رسـیدند. سلول‌ها قبل از القای فنوتیـپ شبه فیبروبلاستی و دوکـی شـکل را نشان دادند و این فنوتیپ در تیمارهای متوالی و موقعیت‌های غیرالقایی حفظ شد (شـکل۱ الف). به‌طوری‌که پس از القا، سـلول‌هـا شـروع بـه تغییـرات ریخت‌شناختی خاص نورونی نمودند و سلول‌های بـا جسـم سلولی دو قطبی و چند قطبی، هسته نسبتاً بزرگ یوکروماتینی با هستک واضح و سیتوپلاسم غنی از گرانول مشاهده شد (شکل ۱ ب، ج، د). نکته قابل توجه این‌که در برخی از موارد سلول ها تاحدی زواید سیتوپلاسمی خود را گسترش دادند و با سلول های مجاور خود سیناپس برقرار کردنـد. عـلاوه بـر ایـن؛ در انتهای زواید سلولی نواحی دگمه مانند برجسته‌ای یافت شد که احتمالاً نشانه ارتباط عملکردی بین نورون‌های یاد شده است. این ساختارها تنها در گروه CSR و از روز دهم به بعد مشاهده شدند (شکل۱ د).

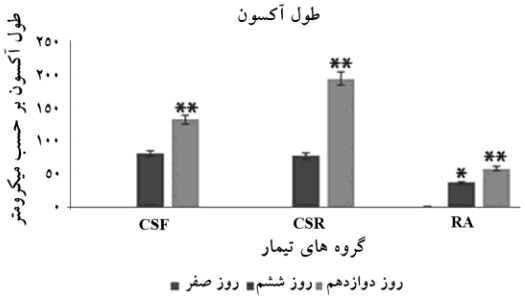
همچنین در برخی از گروه‌ها سلول‌های با فنوتیپ مشـابه گلیوسـیتی (Gliocyte) بـه‌ویـژه الیگودندروسـیت‌هـا (Oligodendrocytes) مشاهده شد که این پدیـده بیشـتر در گروه‌های تحت تیمار CSF (گروه‌های CSF و CSR) رخ داد. به‌نظر می‌رسد که ترکیبات و عوامل رشد موجود در CSF قادر بـه القـای تمـایز سـلول‌هـای نـورونی و گلیـالی (Glial) از BMSCها باشد (شکل۱ ب، ج).



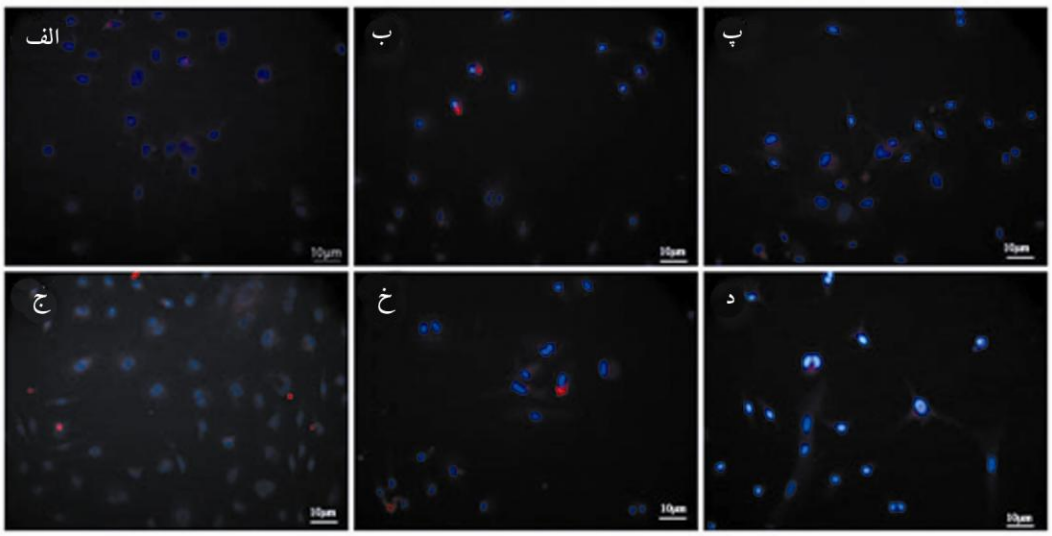
شکل ۱ تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست، الف) کشت BMSCها پس از تیمار سوم، سلول‌های مذکور به‌صورت شبه فیبروبلاستی و دوکی شکل مشاهده شـدند، ب) سلول‌های شبه نورونی تمایز یافته از BMSCهای تحت تیمار با CSF، ج) سلول‌های شبه نورونی تمایز یافته از BMSCهای تحت تیمار با CSR، د) سـلول‌هـای شـبه نورونی تمایز یافته از BMSCهای تحت تیمار با RA؛ علامت پیکان نشان دهنده هسته نسبتاً بزرگ یوکروماتین و هستک واضح است. سر پیکان نشان دهنده آکسون و علامت ستاره بیانگر ویژگی‌های ریخت‌شناسی سلول‌های گلیالی به‌ویژه الیگودندروسیت‌هاست. (مقیاس ۱۰ میکرومتر)

یکی از مهم‌ترین شاخص‌های فنوتیپ عصبی حضور زواید شبه آکسونی و دندریتی (نوریت‌ها) در سلول‌های تمایز یافته است که در گروه‌های تیمار از روز دوم قابل مشاهده و اندازه‌گیری بودند (شکل۱ ب، ج، د). زواید هم اندازه یا بزرگ‌تر از قطر جسم سلولی بر حسب میکرومتر اندازه‌گیری شدند. حداکثر طول آکسون در روز ششم در گروه تحت القای CSF مشاهده شد که نسبت به گروه تیمار CSR تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشت. اما در روز دوازدهم حداکثر طول آکسون در گروه CSR دیده شد که نسبت به سایر گروه‌های تیمار افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۲). تمام داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار ارایه شد.

به‌منظور شناسایی سلول‌های پیش‌ساز عصبی (Neuroprogenitor cells) و سلول‌های عصبی بالغ به‌ترتیب از نشانگرهای نستین و MAP-2 در روز دوازدهم القا استفاده شد. سلول‌های پیش‌ساز عصبی در تمام گروه‌های تحت القا مشاهده شدند. در حالی‌که بیان نشانگر MAP-2 که به‌عنوان نشانگر سلول عصبی بالغ شناخته می‌شود، در گروه تحت القای توام CSF و RA دیده شد (شکل ۳).



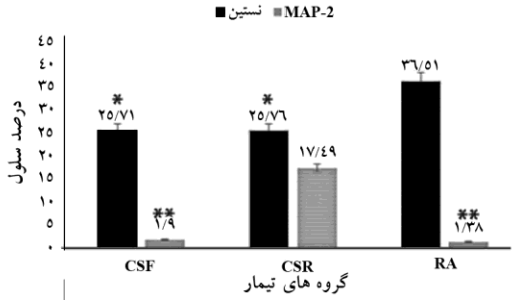
شکل ۲ مقایسه میزان رشد آکسون در گروه‌های تحت القای CSF، ترکیب توام CSF با RA (CSR) و RA (*P<۰/۰۱ و **P<۰/۰۵)



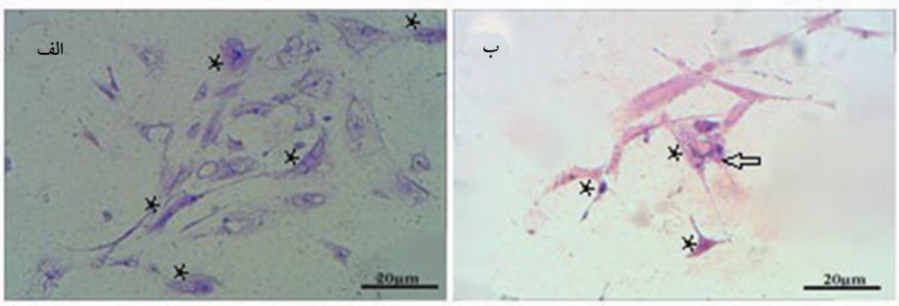
شکل ۳ ایمونوسیتوشیمی سلول‌های شبه نورونی تمایز یافته از BMSCها؛ الف) بیان نشانگر نستین در روز دوازدهم تحت القای CSF، ب) بیان نشانگر نستین در روز دوازدهم تحت تأثیر CSR، ج) بیان نشانگر نستین در روز دوازدهم تحت تأثیر RA، د) سلول‌های بنیادی عصبی مشتق شده از مغز نوزاد رت به‌عنوان کنترل مثبت نستین، و) بیان نشانگر MAP-2 در روز دوازدهم تحت تأثیر CSR و ه) نمونه کنترل مثبت نشانگر MAP-2 (مقیاس ۱۰ میکرومتر)

علاوه بر این؛ در ادامه ارزیابی‌ها، درصد سلول‌های بیان کننده نشانگرهای اختصاصی سلول‌های پیش‌ساز عصبی و سلول‌های عصبی بالغ در گروه‌های مختلف در روز دوازدهم بررسی شد. به‌طوری‌که شمارش سلولی توسط نرم‌افزار Image J صورت گرفت و نتیجه حاصل به‌صورت درصد در شکل ٤ ارایه شده است. میانگین درصد سلول‌های بیان کننده نشانگر نستین در گروه تحت تأثیر RA به‌طور قابل توجهی بیشتر از سایر گروه‌های تیمار مشاهده شد. اما درصد سلول‌های بیان کننده MAP-2 در گروه تحت القای توام CSF و RA به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌های تیمار دیده شد (شکل ٤).

از سوی دیگر؛ نتایج رنگ‌آمیزی کریزیل ویوله ثابت کرد که در گروه‌های القا شده اکثر سلول‌های شبه عصبی واکنش مثبت نشان داده‌اند و اجسام کروی شکل مشابه با اجسام نیسل در درون سیتوپلاسم سلول‌های مذکور دیده شدند که تأییدی بر یافته‌های قبلی است (شکل ٥).



شکل ٤ نتایج ایمونوسیتوشیمی درصد بیان نستین (نشانگر اختصاصی سلول پیش‌ساز عصبی) و بیان MAP-2 (نشانگر اختصاصی سلول عصبی بالغ) در گروه‌های تحت تیمار CSF، RA و ترکیب توام CSF و RA در روز دوازدهم القا



شکل ٥ رنگ‌آمیزی کریزل ویوله؛ الف) سلول‌های شبه نورونی تمایز یافته از BMSCها در روز دوازدهم تحت تیمار با CSF، ب) سلول‌های شبه نورونی تمایز یافته از BMSCها در روز دوازدهم تحت تیمار با CSR، علامت پیکان نشانگر اجسام کروی شکل مشابه اجسام نیسل در درون سیتوپلاسم سلول‌های القایی است. علامت ستاره بیانگر سلول‌های واکنش مثبت است. (مقیاس ٢٠ میکرومتر)

بحث

یکی از مراحل اساسی در درمان بیماری‌های تخریب کننده سیستم عصبی، جایگزینی بافت آسیب دیده توسط نورون‌ها و سلول‌های گلیال است. تا به‌حال روش‌های درمانی متعددی در درمان این دسته از بیماری‌ها ذکر شده‌است. یکی از مؤثرترین راه‌کارها، پیوند سلول است. تاکنون از سلول‌های متنوعی نظیر سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی بزرگسالان، سلول‌های غلاف بویایی و سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده

(Induced Pluripotent stem cells: iPSCs) به‌عنوان منابع سلولی در درمان بیماری‌های تخریب کننده سیستم عصبی بهره گرفته شده است [۲، ۳]. از عوامل مهمی که باید در انتخاب منبع سلولی در نظر گرفته شود سلول‌هایی هستند که قابلیت تمایز به سلول‌های عصبی را در شرایط آزمایشگاهی دارند. BMSCها به واسطه خاصیت ایمنی‌زایی و ضد التهابی نقش قابل توجهی در مهندسی بافت و درمان‌های پزشکی دارند. از سویی این سلول‌ها با ترشح مولکول‌های زیستی در محل ضایعه می‌توانند در سیر روند بهبودی سلول‌های آسیب دیده نقش داشته باشند [۲۱]. در همین ارتباط چن (Chen) و همکاران در سال ۲۰۰٦ پیشنهاد کردند که پیوند BMSCهای تمایز یافته به محل ضایعه قابلیت ترمیمی بارزتری نسبت به پیوند سلول‌های تمایز نیافته ایجاد می‌کند.

با توجه به این‌که CSF در تماس مستقیم با کنام سلول‌های بنیادی سیستم اعصاب مرکزی است، به‌نظر می‌رسد که ترکیبات موجود در آن دارای عوامل رشد و نوروتروفیک، سایتوکاین‌ها، مولکول‌های اتصالی، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و سایر مواد مغذی لازم برای حفظ بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز به سلول عصبی بالغ باشد [۲۲]. بنابراین فرض محققان حاضر بر این بود که افزودن CSF به محیط کشت القایی، ریز محیط مغذی مناسبی برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به انواع سلول‌های عصبی و گلیالی مشابه آنچه که در دوران جنینی رخ می‌دهد فراهم آورد.

در مطالعه حاضر ابتدا خصوصیت غیرتمایزی BMSCها به لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناسی ارزیابی شد. سلول‌های شبه فیبروبلاستی به دست آمده از BMSCها با استفاده از تعویض پی در پی محیط کشت تکثیر داده شدند و قادر به ایجاد کلونی‌ها در محیط کشت بودند. در تیمارهای متوالی سلول‌های غیر مزانشیمی و خونی که فاقد خاصیت چسبندگی به کف فلاسک کشت هستند حذف شدند. در کل می‌توان گفت که فنوتیپ شبه فیبروبلاستی و دوکی شکل سلول‌ها، قابلیت چسبندگی زیاد، توان تکثیر بالا و خصوصیت کلون‌زایی گواه این مطلب است که سلول‌های مورد استفاده در این تحقیق جمعیت خالصی از BMSCها محسوب می‌شوند. نتایج حاضر مشابه یافته‌های قبلی است [۱۹، ۲۱].

در مرحله بعد به روند تمایز BMSCها به سلول‌های شبه عصبی در محیط‌های کشت القایی مختلف پرداخته شد. ارزیابی‌های ریخت‌شناختی به‌عمل آمده نشان داد که در هر سه گروه القایی تغییرات ریخت‌شناختی خاص نورونی به‌وجود آمد. بارزترین تغییرات ریخت‌شناختی در گروه‌های تحت تیمار CSF مشاهده شد. به‌طوری‌که سلول‌های با ریخت‌شناسی دوکی شکل مزانشیمی به سلول‌های با ریخت‌شناسی هرمی یا مخروطی شکل با زواید بلند تغییر یافتند که همگی بیان‌گر سلول‌های پیش‌ساز عصبی است. در گزارش‌های متعددی ذکر شده است که RA نقش قابل توجهی در روند تمایز سلول‌های عصبی دارد. در دوران جنینی این ماده توسط ژن Retinaldehyde Dehydrogenase ساخته می‌شود و بدین ترتیب در روند نورون‌زایی نقش دارد [۲۳]. بین (Bain) و همکاران از پروتکل $^{+}٤/٤^{-}$ استفاده نمودند به‌طوری‌که ابتدا اجسام شبه جنینی به مدت چهار روز در محیط فاقد LIF (Leukemia Inhibitory Factor) و به‌دنبال آن به مدت چهار روز در حضور غلظت پایین RA کشت داده شدند. سپس سلول‌های با ریخت‌شناسی عصبی ظاهر شدند [۲٤]. نتایج تحقیق حاضر مشابه گزارش سایر محققین در این زمینه است [۲۳-۲۵]. همچنین سلول‌های تمایز یافته در گروه ترکیبی توام CSF با RA ارتباطات شبه سیناپسی با یکدیگر برقرار کردند که نشانه‌ای بر عملکردی بودن سلول‌های تمایز یافته است. علاوه بر این؛ در گروه‌های تحت تیمار CSF سلول‌های با فنوتیپ گلیالی یافت شدند. به نظر می‌رسد که CSF سبب تکثیر و تمایز سلول‌های با فنوتیپ عصبی می‌شود. در همین ارتباط تحقیقات لتینن (Lehtinen) و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که CSF دارای عوامل القاگر تکثیری است که می‌تواند در تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی نقش داشته باشد [۲٦]. با توجه به این‌که CSF حاوی مواد مغذی

سلول‌های پیش‌ساز عصبی و نورون‌هاست [۲۷]؛ بنابراین به نظر می‌رسد که افزودن RA به CSF نه تنها سبب تمایز اولیه سلول‌های پیش‌ساز عصبی از BMSCها می‌شود بلکه در تکثیر سلول‌های پیش‌ساز عصبی نیز نقش دارد. علاوه بر این؛ قادر به تمایز نهایی سلول‌های پیش‌ساز عصبی به نورون بالغ نیز می‌شود.

نتایج اندازه‌گیری رشد آکسون در سلول‌های تمایز یافته نشان داد که بیشترین میزان طول آکسون در روز دوازدهم القا در گروه CSR دیده شد و تفاوت قابل ملاحظه‌ای با سایر گروه‌های القایی داشت. علت این امر را می‌توان به حضور توام RA با CSF نسبت داد که دارای اثر هم‌افزایی هستند.

یافته‌های ایمونوسایتوشیمی در تحقیق حاضر ثابت کرد که سلول‌های بیان کننده نشانگر نستین در تمام گروه‌های القایی مشاهده شده‌اند، هر چند که درصد سلول‌های بیان کننده نستین در گروه تحت تیمار RA به مراتب بیشتر از سایر گروه‌ها بود. این نتایج مشابه یافته‌های محققین پیشین است که اظهار داشتند که به‌کار بردن RA منجر به تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی می‌شود و به نشانگر ضد نستین واکنش مثبت نشان می‌دهند [۲۸، ۲۹].

در مطالعه حاضر شاید یکی از دلایل احتمالی افزایش سلول‌های بیان کننده نستین در گروه تحت تیمار RA نسبت به سایر گروه‌ها به این امر برگردد که RA سبب بیان دسته ای از ژن‌ها نظیر (Sonic hedgehog: shh) و عوامل نسخه‌برداری نظیر Pax6 و Pax7 مرتبط با نورون‌زایی می‌شود که نه تنها سبب تمایز اولیه سلول‌های پیش‌ساز عصبی از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان می‌شود، بلکه سبب تکثیر سلول‌های پیش‌ساز عصبی نیز می‌شود. باید توجه داشت که در شرایط درون بدنی (In vivo) مجموعه‌ای از پیام‌ها و مولکول‌ها مانند BMP (Bone Morphogenic Protein) و Wnt در القای تمایز عصبی بر هم‌کنش دارند [۱۶]. مطالعات گروه‌های دیگر نشان داد که قابلیت تمایزی سلول‌های پیش‌ساز عصبی القا شده در حضور RA محدود است و در ادامه مطالعات با پیوند سلول‌های یاد شده، درستی این ادعا را به اثبات رساندند [۲۸، ۲۹]. با توجه به این‌که RA به‌عنوان یک عامل تمایزی چند منظوره محسوب می‌شود و سبب تمایز انواع سلول‌ها به‌ویژه مشتقات مزودرمی می‌شود [۱۶، ۲۳]. بنابراین یکی از نکات قابل توجه در استفاده از RA به‌عنوان القاگر نورونی، حذف سایر سلول‌های ناخواسته حاصل از تمایز و خالص‌سازی سلول‌های عصبی است. به همین دلیل تاکنون تلاش‌های زیادی در راستای بهینه‌سازی تمایز هدفمند سلول‌های پیش‌ساز عصبی و به‌کار بردن آن‌ها در حوزه درمان صورت گرفته است.

تحقیقات دیگری در این زمینه نشان می‌دهد که افزودن برخی از عوامل رشد نظیر bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) به محیط کشت القایی سبب تکثیر سلول‌های پیش‌ساز عصبی و تمایز آن‌ها به سمت نورون و گلیوسیت‌ها می‌شود [۳۰]. از طرفی؛ یکی از مهم‌ترین مواردی که بایستی در شرایط آزمایشگاهی در القای تمایز عصبی مد نظر گرفته شود ایجاد محیطی است که شرایط تمایز نورواکتودرم (Neuroectoderm) را در دوره جنینی تقلید کند. به عبارتی ریز محیط اطراف سلول‌ها نقش مهمی در تمایز جهت‌دار سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های عصبی دارد. اما درصد کمتر سلول‌های پیش‌ساز عصبی در گروه‌های تحت تیمار با CSF و حضور سلول‌های بیان کننده نشانگر MAP-2 در گروه تحت القای توام CSF و RA را می‌توان به عوامل نوروتروفیک و سایر ترکیبات موجود در CSF نسبت داد که سبب کاهش بیان عوامل رونویسی می‌شود و باعث گذر از مرحله پیش نورونی می‌شود و بدین ترتیب امکان تمایز نورون بالغ را در محیط کشت القایی فراهم می‌آورد. این نتایج با مطالعات بهاروند و همکاران همخوانی دارد که اظهار داشتند افزودن ترکیب دهیدرواپی اندرواسترون (Dehydroepiandrosterone) به محیط کشت تمایزی حاوی RA سبب آکسون‌های طویل‌تر، اتصالات سیناپسی بیشتر و بیان برخی از نشانگرهای سلول‌های عصبی بالغ نظیر Tau-1، Tau-2 و MAP-2 می‌شود که تمامی آن‌ها بیانگر افزایش روند

نرون‌زایی است [۳۱]. همچنین این محققین پی بردند که با ادامه روند تمایز، تکثیر سلول‌های غیر عصبی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که در روز دهم تمایز، سلول‌های با بیان نشانگر گلیالی بالغ (Glial Fibrillar Acidic Protein: GFAP) در محیط کشت القایی پدیدار گشت [۳۱] که با نتایج تحقیق حاضر تطابق دارد. یکی از دلایل احتمالی تمایز نورون‌های بالغ و گلیالی در گروه CSR را می‌توان به محتویات CSF نسبت داد چرا که این ماده برای رشد و تکامل سلول‌های عصبی و نوروگلیال ضروری است. در برخی از ناهنجاری‌های مادرزادی نظیر هیدروسفالی (Hydrocephalus) میزان CSF و محتویات آن دستخوش تغییراتی می‌شود که در نهایت منجر به عدم رشد و نمو سلول‌های بافت عصبی می‌شود [۳۲].

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بر مبنای نتایج مطالعه حاضر یک اثر هم‌افزایی بین RA و CSF وجود دارد که می‌تواند سبب تمایز سلول‌های با فنوتیپ عصبی و گلیالی از BMSCها شود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد علوم تشریح مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به کد ۱۰۸۲ است که نویسندگان بدین‌وسیله از مسئولین محترم دانشگاه تشکر می‌نمایند.

منابع

[1] Donovan PJ, de Miguel MP. Turning germ cells into stem cells. Curr Opin Genet Dev 2003; 13(5): 463-71.

[2] Lu J, Ashwell K. Olfactory ensheathing cells: their potential use for repairing the injured spinal cord. Spine (Phila Pa 1976) 2002; 27(8): 887-92.

[3] Cao Q, Benton RL, Whittemore SR. Stem cell repair of central nervous system injury. J Neurosci Res 2002; 68(5): 501-10.

[4] Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. Muscle Nerve 1995; 18(12): 1417-26.

[5] Shimizu S, Kitada M, Ishikawa H, Itokazu Y, Wakao S, Dezawa M. Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. Biochem Biophys Res Commun 2007; 359(4): 915-20.

[6] Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. Neuroreport 2000; 11(13): 3001-5.

[7] Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. J Neurosci Res 2002; 69(6): 880-93.

[8] Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. Eur J Neurosci 2001; 14(11): 1771-6.

[9] Nabiuni M, Rasouli J, Parivar K, Kochesfehani HM, Irian S, Miyan JA. In vitro effects of fetal rat cerebrospinal fluid on viability and neuronal differentiation of PC12 cells. Fluids Barriers CNS 2012; 9(1): 8.

[10] Martín C, Bueno D, Alonso MI, Moro JA, Callejo S, Parada C, Martín P, Carnicero E,

Gato A. FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cells. Dev Biol 2006; 297(2): 402-16.

[11] Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, Maynard T, Gonzalez D, Kim S, Ye P, D'Ercole AJ, Wong ET, LaMantia AS, Walsh CA. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. Neuron 2011; 69(5): 893-905.

[12] Salehi Z, Mashayekhi F, Naji M, Pandamooz S. Insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid during the development of mouse embryos. J Clin Neurosci 2009; 16(7): 950-3.

[13] Huang X, Liu J, Ketova T, Fleming JT, Grover VK, Cooper MK, Litingtung Y, Chiang C. Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107(18): 8422-7.

[14] Parada C, Gato A, Bueno D. All-trans retinol and retinol-binding protein from embryonic cerebrospinal fluid exhibit dynamic behaviour during early central nervous system development. Neuroreport 2008; 19(9): 945-50.

[15] Sagha M, Esfandiari E, Razavi S, Tanhaee S, Nasr Esfahani M H, Baharvand H. Role of Retinoic Acid in Neural Patterning of Mouse Embryonic Stem Cells. Arak University of Medical Sciences Journal 2013; 16(4): 16-26.

[16] Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. Nat Rev Neurosci 2007; 8(10): 755-65.

[17] Suzuki M, Wright LS, Marwah P, Lardy HA, Svendsen CN. Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(9): 3202-7.

[18] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol 2000; 164(2): 247-56.

[19] Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. Neuroreport 2001; 12(3): 559-63.

[20] Gato A, Moro JA, Alonso MI, Bueno D, De La Mano A, Martín C. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2005; 284(1): 475-84.

[21] Otify DY, Youssef E, Nagy NB, Marei MK, Youssif MI. Transdifferentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neural cells via cerebrospinal fluid. Biomedicine and Biotechnology 2014; 2(4): 66-79.

[22] Chen Y, Teng FY, Tang BL. Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties. Cell Mol Life Sci 2006; 63(14): 1649-57.

[23] Hens J, Nuydens R, Geerts H, Senden NH,

Van de Ven WJ, Roebroek AJ, van de Velde HJ, Ramaekers FC, Broers JL. Neuronal differentiation is accompanied by NSP-C expression. Cell Tissue Res 1998; 292(2): 229-37.

[24] Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI. Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. Biochem Biophys Res Commun 1996; 223(3): 691-4.

[25] Murashov AK, Pak ES, Hendricks WA, Owensby JP, Sierpinski PL, Tatko LM, Fletcher PL. Directed differentiation of embryonic stem cells into dorsal interneurons. FASEB J 2005; 19(2): 252-4.

[26] Lehtinen MK, Bjornsson CS, Dymecki SM, Gilbertson RJ, Holtzman DM, Monuki ES. The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy. J Neurosci 2013; 33(45): 17553-9.

[27] Johanson CE, Duncan JA 3rd, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. Cerebrospinal Fluid Res 2008; 5: 10.

[28] Silvagno F, Guarnieri V, Capizzi A, Pescarmona GP. Synergistic effect of retinoic acid and dehydroepiandrosterone on differentiation of human neuroblastoma cells. FEBS Lett 2002; 532(1-2): 153-8.

[29] Yung SY, Gokhan S, Jurcsak J, Molero AE, Abrajano JJ, Mehler MF. Differential modulation of BMP signaling promotes the elaboration of cerebral cortical GABAergic neurons or oligodendrocytes from a common sonic hedgehog-responsive ventral forebrain progenitor species. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(25): 16273-8.

[30] Liu JP, Laufer E, Jessell TM. Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. Neuron 2001; 32(6): 997-1012.

[31] Azizi H, Zare Mehrjerdi N, Bahmani MKh, Baharvand H. Dehydroepiandroesteron accompanied retinoic acid enhances differentiation of p19 embryonal stem cells into neural cells. Cell Journal (Yakhteh) 2009; 11(2): 228-35.

[32] Mashayekhi F, Draper CE, Bannister CM, Pourghasem M, Owen-Lynch PJ, Miyan JA. Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas (H-Tx) rat: a role for CSF. Brain 2002; 125(Pt 8): 1859-74.