مقاله پژوهشی
(Original Article)

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره چهارم ـ شماره چهارم ـ زمستان ۸۹
صفحات ۳۷ الی ۴۷

اثر فاکتور رشد فیبروبلاست- ۸ و خارپشت صوتی بر بیان نشانگرهای دوپامینی در سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی

حسن نیک‌نژاد[۱]، حبیب‌الله پیروی[۲]، ابوالحسن احمدیانی[۳]، معصومه جرجانی[۳]

[۱]استادیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[۲]استاد جراحی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[۳]استاد فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در زمینه استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی برای درمان بیماری پارکینسون به‌عنوان یک درمان جایگزین صورت گرفته است. با توجه به این واقعیت که سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی دارای توانایی تمایز به بسیاری از سلول‌ها هستند، همچنین به‌علت عدم ایجاد کارسینوما و نداشتن مشکل اخلاقی مربوط به سلول‌های بنیادی جنینی، می‌توان از آنها به‌عنوان یک منبع جایگزین در سلول‌درمانی استفاده نمود. این مطالعه با هدف بررسی اثر فاکتور رشد فیبروبلاست- ۸ و خارپشت صوتی (Sonic Hedgehog) بر بیان نشانگرهای دوپامینی در سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه، تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به سلول‌های عصبی دوپامینرژیک به‌صورت برون‌تن به مدت ۲۱ روز با استفاده از فاکتورهای رشد Shh (Sonic Hedgehog) و فاکتور رشد فیبروبلاست-۸ (FGF8) بررسی گردید و مارکرهای β-tubulin III ، TH،DAT و DβH با روش ایمونوسیتوشیمی ارزیابی شدند. برای مقایسه و آنالیز بین گروه‌ها از آزمون تی تست، واریانس و پس آماری توکی استفاده گردید. تفاوت‌ها در دو سطح $p<0/01$ و $p<0/05$ ارزیابی شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد ترکیبی از فاکتورهای رشد Shh و FGF8 سطح بالاتری از TH را در مقایسه با گروه بدون آنها یا هر کدام از آنها به تنهایی بیان می‌کند. به‌علاوه، Shh بر میزان بیان DAT در مقایسه با DβH مؤثرتر از FGF8 می‌باشد.

نتیجه‌گیری: این نتایج بیانگر آن است که سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی توانایی تمایز به سلول‌های عصبی دوپامینی را دارند و این توانایی تحت تأثیر فاکتورهای رشد Shh و FGF8 قرار می‌گیرد.

کلید واژه‌ها: آمنیون؛ سلول‌های اپی‌تلیال؛ نورون‌ها؛ دوپامین؛ اف جی اف هشت؛ خارپشت صوتی.

نویسنده مسئول مکاتبات: مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران؛
تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۹۸۴۸ آدرس پست الکترونیکی: niknejad@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۸

مقدمه

بیماری پارکینسون با مشخصه از دست رفتن نورون‌های دوپامینرژیک و کاهش سنتز دوپامین در ناحیه مغز میانی (Substantia Nigra)، از جمله بیماری‌های نرودژنراتیو شایع می‌باشد که در بیش از ۱٪ از افراد بالای ۶۵ سال دیده می‌شود (۱). یکی از چشم‌اندازهای جدید در درمان این بیماری، بر پایه جایگزینی سلول (Cell Replacement Therapy) استوار گردیده و مطالعات زیادی در این زمینه در حال انجام می‌باشد. مهم‌ترین مسئله‌ای که در درمان بر پایه جایگزینی سلول وجود دارد، نوع سلول جایگزین و تعداد آن است. از جمله سلول‌های مورد استفاده در این روش درمانی، سلول‌های بنیادی جنینی هستند. با وجود همه مزایای سلول‌های بنیادی جنینی، محدودیت‌های عمده‌ای در استفاده از این

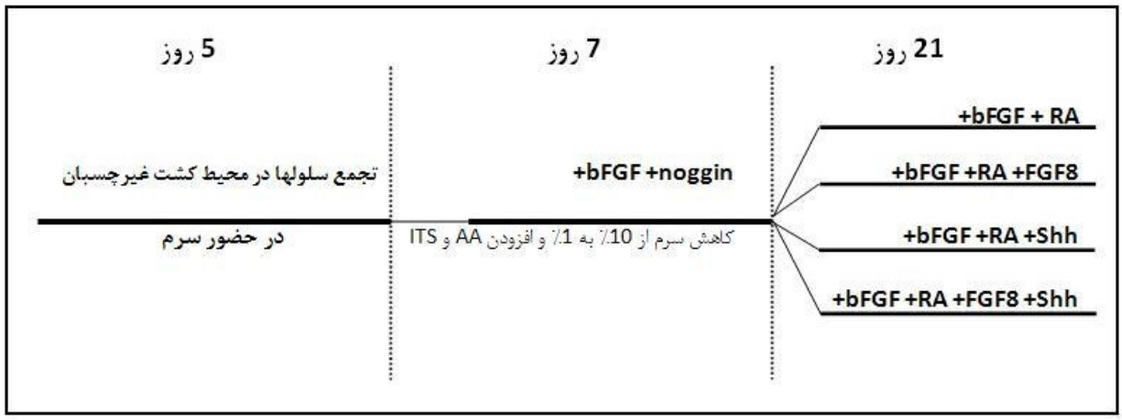
سلول‌ها وجود دارد. مهم‌ترین محدودیت در استفاده از این سلول‌ها جهت درمان بر پایه جایگزینی سلول، تعداد محدود سلول‌های بنیادی جنینی (۲)، نیاز به لایه‌ای از سلول‌های فیبروبلاستی جنینی موش (به‌عنوان Feeder Layer) برای کشت و تکثیر (۵-۳)، تومورزایی (۶) و مشکلات عدیده اخلاقی می‌باشد (۸،۷). به همین دلیل امروزه شناسایی و استفاده از سلول‌های جایگزین برای سلول‌های بنیادی جنینی، به‌عنوان یک ضرورت مهم پذیرفته شده است. سلول‌های جایگزین باید دارای توانایی سلول‌های بنیادی جنینی و در عین حال فاقد مشکلات و محدودیت‌های مربوط به آنها باشند. سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی خصوصیات ویژه‌ای دارند که آنها را به‌عنوان یک منبع عظیم سلول‌های بنیادی در درمان بر پایه جایگزینی سلول قرار می‌دهد. سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی نشانگرهای سطحی و فاکتورهای پرتوان سلول‌های بنیادی را بیان می‌کنند (۱۰،۹). تحقیقات بیشتر بر روی این سلول‌ها نشان داده است که این سلول‌ها توانایی تمایز به هر سه رده اکتودرم، اندودرم و مزودرم را دارند (۱۱،۹). سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی خصوصیت کلونی‌زایی دارند و کلونی‌های ایجاد شده توسط این سلول‌ها، قابل قیاس با کلونی‌های مشابه ایجاد شده توسط سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشد (۱۱). در مطالعات متعددی نشان داده شده است با وجود اینکه سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی پرتوان هستند، اما در پیوند به موش‌های دچار نقص ایمنی مختلط شدید (SCID)، تراتوما ایجاد نمی‌کنند (۱۲،۱۱). همچنین این سلول‌ها آنتی‌ژن لکوسیتی غیرکلاسیک و بدون پلی‌مورفیسم HLA-G را بیان می‌کنند (۱۳)، و در عین حال فاقد آنتی‌ژنی پلی‌مورفیک HLA-A و HLA-B از مجموعه کلاس I و آنتی‌ژن HLA-DR از مجموعه آنتی‌ژنی لکوسیتی کلاس II، در سطوح خود هستند (۱۴). این یافته‌ها نشان می‌دهد سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی از نظر ایمونولوژیکی خنثی هستند و این موضوع ریسک رد پیوند یا واکنش‌های ایمونولوژیکی پس از پیوند را کاهش می‌دهد. این سلول‌ها بدون نیاز به سلول‌های ثانویه به‌صورت لایه مغذی (Feeder Layer) قدرت رشد، تکثیر و پرولیفراسیون دارند (۱۵،۹). بافت آمنیون پس از سزارین به‌عنوان یک بافت زائد و دورانداختنی تلقی می‌شود و استفاده از آن به‌عنوان منبع تهیه سلول نسبت به سلول‌های بنیادی جنینی انسانی، مشکلات اخلاقی بالقوه‌ای ندارد. این ویژگی‌ها باعث می‌شود تا از سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به‌عنوان یک منبع جایگزین برای سلول‌های بنیادی جنینی در درمان بر پایه جایگزینی سلول استفاده کرد؛ به شرطی که بتوان آنها را به سلول‌های مورد نیاز تمایز داد. یکی از پروتکل‌های تمایزی برای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به نورون‌های دوپامینرژیک، بر پایه تشکیل اجسام شبه‌جنینی (Embryoid Body) در حضور سرم و یا جایگزین سرم و ادامه پروتکل براساس تیمار با فاکتور رشد خارپشت صوتی Shh و FGF8 (Fibroblast Growth Factor-8) استوار گردیده است. Shh به‌عنوان یک مورفوژن در تکامل مغز و نخاع در دوران جنینی نقش اساسی را ایفا می‌کند. تمایز سلول‌ها به نورون‌های دوپامینرژیک در دوران جنینی وابسته به Shh می‌باشد که به‌صورت یک سیگنال طرح‌یابی (Patterning Signal) محور پشتی- شکمی (Dorsal-Ventral Axes) از Floor Plate ترشح می‌گردد. در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به نورون‌های دوپامینرژیک، از Shh به صورت Ex Vivo برای غنی کردن سلول‌های عصبی دوپامینرژیک استفاده می‌شود (۱۶). در دوران جنینی FGF8 به‌عنوان یک مورفوژن و سیگنال محور قدامی- خلفی (Anterior Posterior Axes)، باعث تمایز سلول‌های پیش‌ساز (Progenitor) مغز میانی به سمت نورون‌های دوپامینرژیک خواهد شد. در پروسه‌های تمایز از FGF8 به‌صورت Ex Vivo در القای سلول‌ها به سمت سلول‌های عصبی دوپامینرژیک استفاده می‌شود (۱۷،۱۶). عقیده بر این است در مسیر تکامل، در صورتی سلول‌های پیش‌ساز به نورون‌های دوپامینرژیک تمایز می‌یابند که ۲ سیگنالینگ مربوط به Shh و FGF8 به‌طور همزمان فعال گردند. براساس این یافته‌ها، در این مطالعه اثر Shh و FGF8 بر تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به نورون‌های دوپامینرژیک بررسی گردید.

روش بررسی

در این مطالعه ابتدا بافت‌های جفت (Placenta) از بیمارستان میرزا کوچک‌خان تهیه گردید. برای این منظور تنها از مواردی استفاده شد که بارداری طبیعی داشتند و سزارین در آنها به‌صورت انتخابی (Elective) انجام شده بود و هفته بارداری بین ۳۶-۳۲ هفتگی بود. تست‌های سرولوژیک برای ویروس‌های HIV، هپاتیت B و C و سفلیس برای تمام موارد قبل از سزارین انجام شد. هرچند جفت،

یک بافت دوران‌داختنی می‌باشد؛ ولی اطلاعات لازم در زمینه استفاده از این بافت در اختیار کلیه خانواده‌ها قرار گرفت. برای جداسازی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی از روشی استفاده شد که قبلاً توسط این گروه گزارش شده بود (۱۸). به‌طور خلاصه پرده آمنیون به چند تکه کوچکتر تقسیم گردید و برای هضم آنزیمی، در محلول ۰/۱۵٪ EDTA-Trypsin قرار گرفت. در مطالعات مختلف از محیط‌های کشت متفاوتی از جمله DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) و RMPI1640 برای کشت سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی استفاده شده است، اما از آنجا که بیشترین میزان چسبندگی در محیط کشت DMEM/F12 می‌باشد (۱۸)، بنابراین سلول‌های جداسازی شده در این محیط کشت به همراه ۱۰٪ FCS در فلاسک‌های CC ۲۵، به تعداد $۱۰^{۴}$×۱۰-۸ در شرایط ۹۵٪ هوا و ۵٪ CO2 در انکوباتور قرار داده شدند. در محیط کشت سلول‌ها علاوه بر سرم، ng /ml ۱۰ فاکتور رشد EGF و ۱۰۰ واحد در ml پنی‌سیلین و استرپتومایسین، mM ۲ ال- گالاتامین، ۱٪ اسید آمینه‌های غیرضروری، µM ۵۵ مرکاپتوتانول- ۲ و mM ۱ پیرووات سدیم اضافه شد. این محیط کشت به‌عنوان محیط کشت استاندارد در تمامی مراحل تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. شمارش سلول‌ها با لام نئوبار انجام گردید و برای حصول اطمینان از درصد سلول‌های زنده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو استفاده شد. با توجه به گزارش‌های موجود در مورد وجود سلول‌های حاوی دوپامین در میان سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی، درصد سلول‌های مثبت به نشانگرهای TH و DAT پس از جداسازی سلول‌ها و ۷ روز پس از کشت با روش ایمونوسیتوشیمی ارزیابی شدند. برای این منظور سلول‌ها پس از جداسازی به مدت ۴ ساعت بر روی دیش‌های پوشش داده شده با ژلاتین، کشت داده شدند و نشانگرهای TH و DAT بررسی گردید. در این مرحله نشانگر DβH نیز ارزیابی شد. محیط کشت مورد استفاده در این مرحله همان محیط کشت استاندارد و تنها فاکتور رشد، EGF بود. در مطالعه حاضر با توجه به پژوهش Sakuragawa و همکارانش که ال- تیروزین را به‌عنوان پیش‌ساز دوپامین و تترا هیدروبیوپترین (BH4) را به عنوان عامل دخیل در سنتز دوپامین، به محیط کشت اضافه کرده بودند، برای بررسی اثر این ۲ فاکتور بر میزان بیان نشانگرهای دوپامینی بعد از ۷ روز، به نیمی از محیط‌های کشت µM ۱۰ تترا هیدروبیوپترین (BH4) و µM ۲۵ ال- تیروزین اضافه گردید و سلول‌ها به مدت ۷ روز کشت داده شدند (۱۹). آنتی‌بادی اولیه برای TH (Sigma; 1:100)، (Sigma; 1:200) DAT، β-tubulin III (Sigma; 1:100) و DβH (Sigma; 1:200) به ترتیب از نوع Mouse Anti-TH، Rabbit Anti-DAT، Mouse Anti–β-tubulin III و Rabbit Anti-DβH و آنتی‌بادی ثانویه از نوع Goat Anti-Mouse IgG (Chemicon; 1:100) کونژوگه شده با Rhodamin و Goat Anti-Rabbit IgG (Chemicon; 1:50) کونژوگه شده با FITC استفاده گردید. در طول ۳ روز پس از شروع کشت، سلول‌ها به بیش از ۹۰٪ همجواری (Confluency) رسیدند. سپس با استفاده از HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) Free-Ca^{2+}-Mg^{2+} جداسازی شده و به دیش‌های باکتریولوژیکی غیرچسبان (Non-Adherent Bacteriological Dishes) منتقل شدند، سپس به مدت ۵ روز در محیط کشت استاندارد و در انکوباتور نگهداری شدند. در ادامه، بعد از ۵ روز سلول‌های موجود در تجمعات سلولی توسط پیپت پاستور کشیده شده (Fire-Drawn Pipette Pasteur) و جداسازی انجام گرفت. سپس در دیش‌های ۲۴ خانه پوشیده شده با ژلاتین ۲٪، به تعداد $۱۰^{۴}$×۲ کشت داده شدند (۲۰،۱۸). همان‌طورکه طرح شماتیک مربوطه در شکل شماره ۱ نشان می‌دهد، به محیط کشت استاندارد ۱٪ انسولین-ترانسفرین- سلنیم (ITS) و mM ۲ اسید اسکوربیک و ng /ml ۱۰ bFGF اضافه شد. میزان سرم (FCS) از ۱۰٪ به ۱٪ کاهش داده شد. سپس به همه محیط کشت‌ها ng /ml ۱۰۰ Noggin اضافه شد. پس از ۷ روز Noggin حذف و µM ۱ رتینوئیک اسید (RA) به محیط‌های کشت اضافه گردید و به مدت ۲۱ روز سلول‌ها کشت داده شدند (۲۰،۱۸). برای غنی‌سازی سلول‌های دوپامینی از فاکتورهای رشد FGF8 و Shh استفاده گردید. برای این منظور محیط‌های کشت به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول تحت تیمار با ng/ml ۲۵ FGF8، گروه دوم تحت تیمار با ng /ml ۱۰۰Shh، گروه سوم ترکیبی از FGF8 و Shh با غلظت‌های ذکر شده و گروه چهارم بدون تیمار به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. درصد نشانگرهای TH، DAT و DβH در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بررسی گردید. رقت‌های مورد استفاده در این مرحله برای آنتی‌بادی‌های اولیه و

ثانویه مشابه با رقت‌های استفاده شده در قسمت "بررسی نشانگرهای دوپامینی بدون القای تمایز" می‌باشد.



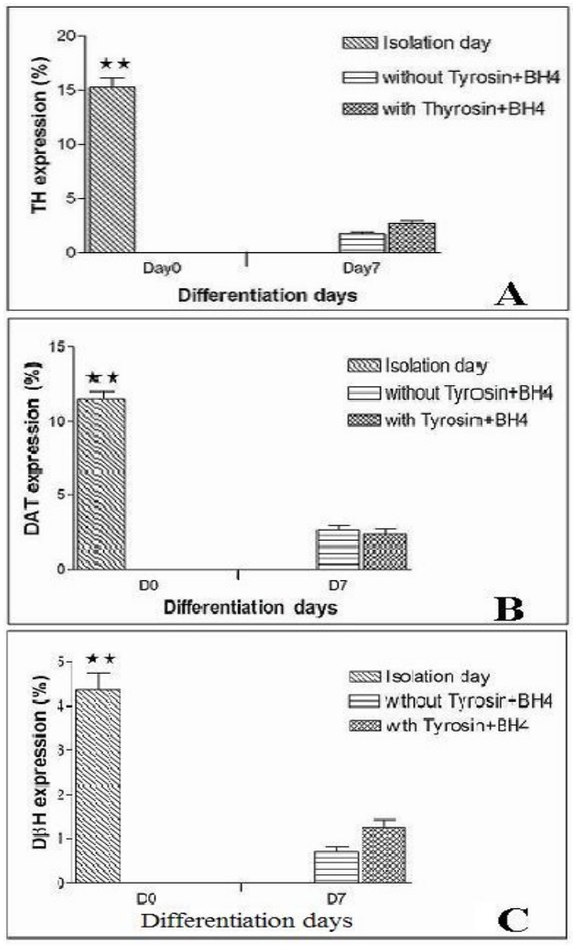
شکل شماره ۱: طرح شماتیک پروتکل تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی به سلول‌های عصبی دوپامینرژیک

بعد از تمایز سلول‌ها به سلول‌های دوپامینی توسط Shh و FGF8، برای بررسی اثر این ۲ فاکتور رشد بر بیان β-tubulin III میزان بیان این نشانگر در روز ۲۱ در دو گروه تیمار با Shh و FGF8 (گروه Shh+FGF8) و بدون تیمار با ۲ فاکتور رشد مذکور (گروه کنترل) با یکدیگر مقایسه شد. مراحل کامل ایمونوسیتوشیمی براساس مطالعه قبلی انجام گرفت (۱۸،۲۰). سپس آنتی‌بادی اولیه با رقت مناسب به نمونه‌ها اضافه گردید و یک شب (Overnight) در یخچال $4^{\circ}C$ نگهداری شد. پس از خارج کردن آنتی‌بادی اولیه، نمونه‌ها ۵-۳ بار با PBS شستشو و آنتی‌بادی ثانویه با رقت مناسب به نمونه‌ها اضافه گردید و در نهایت پس از شستشوی نهایی نمونه‌ها توسط میکروسکوپ معکوس فلورسنت بررسی شد. از محلول PBS بدون آنتی‌بادی به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

یافته‌ها

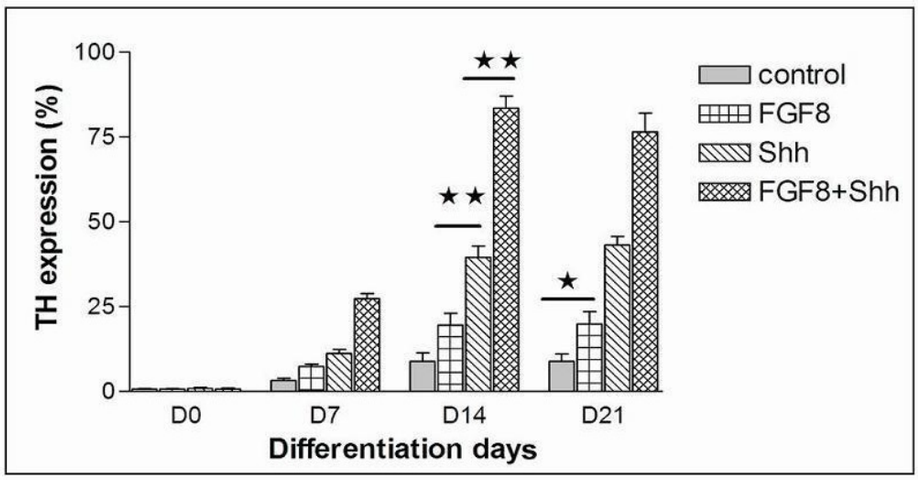
برای بررسی درصد سلول‌های مثبت به نشانگرهای دوپامینی، TH و DAT ارزیابی شدند. در روز جداسازی ۰/۹±۱۵/۳٪ از سلول‌ها نسبت به نشانگر TH مثبت بودند. همچنین پس از جداسازی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی، مشاهده گردید که ۰/۵±۱۱/۶٪ و ۰/۴±۴/۴٪ از سلول‌ها به ترتیب نسبت به DAT و DβH مثبت هستند.

کشت سلول‌ها به مدت ۷ روز باعث کاهش درصد سلول‌های مثبت به TH شد؛ به‌طوری‌که در روز هفتم فقط ۰/۲±۱/۸٪ از سلول‌ها نشانگر TH را بیان کردند که به‌صورت معنی‌داری با روز جداسازی سلول‌ها تفاوت داشت ($p<0/01$). این موضوع برای DAT و DβH هم قابل تعمیم بود. درصد سلول‌های مثبت نسبت به نشانگرهای DAT و DβH، ۷روز پس از کشت به ترتیب ۰/۳±۲/۶٪ و ۰/۲±۰/۷٪ بود که نسبت به روز جداسازی سلول‌ها کاهش معنی‌داری را نشان داد (برای هر دو، $p<0/01$). در این مرحله اثرات حضور یا عدم حضور تیروزین و تتراهیدروبیوپترین بر درصد مارکرهای ذکر شده، بررسی شد. اگرچه حضور تیروزین و تترا هیدروبیوپترین باعث شد که درصد نشانگر TH پس از ۷ روز نسبت به عدم حضور آنها بیشتر باشد (۰/۳±۲/۷)، ولی تفاوت اثر بین حضور و عدم حضور تیروزین و BH4 معنی‌دار نبود. همچنین کاهش درصد TH طی ۷ روز دیده شد (نمودار 1-A). همچنین در مورد نشانگرهای DAT و DβH نیز کاهش درصد مشاهده گردید (۰/۳±۲/۴٪ و ۰/۲±۱/۳٪ به ترتیب برای DAT و DβH). در این دو مورد نیز تفاوت بین حضور و عدم حضور تیروزین و BH4 معنی‌دار نبود. در مورد DβH حتی حضور تیروزین و BH4 باعث کاهش درصد این نشانگر در مقایسه با عدم حضور آنها طی ۷ روز شد (نمودار 1-B و نمودار 1-C).



نمودار شماره ۱: مقایسه بیان نشانگر TH (1-A)، DAT (1-B) و DβH (1-C) در روز جداسازی و پس از ۷ روز در حضور تیروزین و تترا هیدروبیوپترین و عدم حضور آنها ** (p<۰/۰۱)

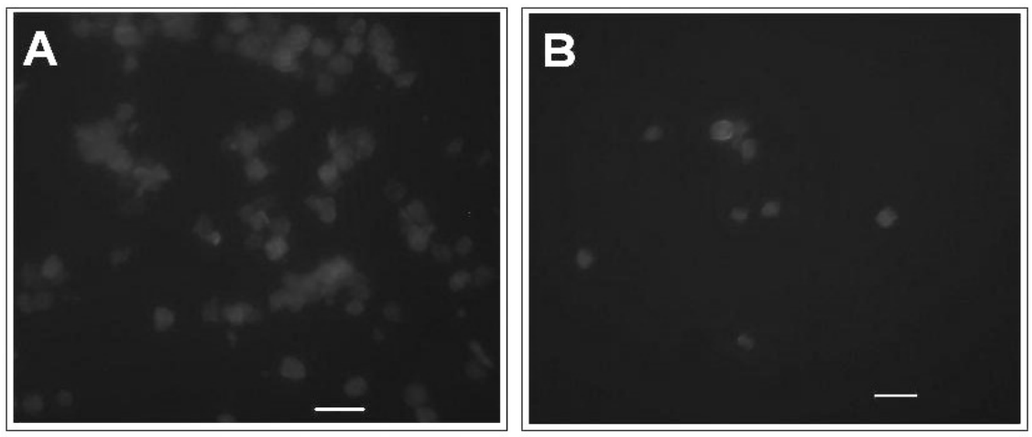
در گروه کنترل از فاکتورهای رشد FGF8 و Shh استفاده نشده بود. بعد از ۲۱ روز فقط ۸/۹±۲/۲٪ از سلول‌ها نسبت به نشانگر TH مثبت بودند. حداکثر میزان بیان TH مربوط به D21 بود که در مقایسه با D14 (۸/۹±۲/۶٪) تفاوت معنی‌داری نداشت (نمودار شماره ۲). این نتایج دلیل مناسبی بر استفاده از فاکتورهای رشد برای افزایش درصد سلول‌های دوپامینی بود. همان‌طورکه در نمودار شماره ۲ دیده می‌شود، در حضور FGF8 حداکثر میزان بیان TH متعلق به روز D21 با ۱۹/۹±۳/۷٪ بوده است که در مقایسه با گروه کنترل سطح بالاتری از این نشانگر را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵). اگرچه حداکثر بیان TH در حضور GF8 مربوط به روز D21 می‌باشد، ولی در مقایسه با D14 (۱۹/۶±۳/۶٪) تفاوت معنی‌دار وجود ندارد. در روز D21 محیط کشت‌هایی که تحت تیمار با Shh قرار گرفته‌اند، درصد بالاتری از سلول‌های حاوی نشانگر TH را در مقایسه با FGF8 و گروه کنترل نشان می‌دهند. حداکثر میزان بیان TH در حضور Shh متعلق به روز D21 (۴۳/۳±۲/۵٪) می‌باشد که در مقایسه با FGF8 دارای اختلاف معنی‌داری است (p<۰/۰۱). در مورد Shh نیز تفاوت بین روزهای D14 و D21 معنی‌دار نمی‌باشد (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: مقایسه تأثیر تیمار با Shh و FGF8 بر بیان TH طی روند تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی (p<۰/۰۱ ,p<۰/۰۵)**

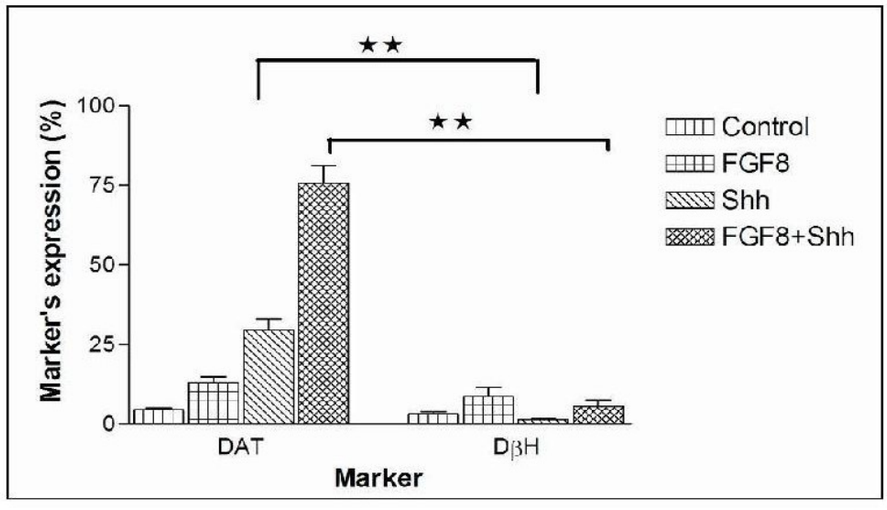
همچنین در گروه FGF8+Shh بیشترین میزان بیان نشانگر TH مشاهده گردید. حداکثر میزان بیان TH برابر با ۸۳±۳/۵٪، مربوط به روز D14 بود. در روز D21 میزان سلول‌های مثبت به نشانگر TH کاهش یافت (۷۶/۶±۵/۵٪)، ولی در مقایسه بین روزهای D14 و D21 اختلاف

معنی‌دار نبود. بین گروه‌های FGF8+Shh و سایر گروه‌ها اختلاف با ($p<۰/۰۱$) قابل مشاهده بود (نمودار شماره ۲ و شکل شماره ۲).

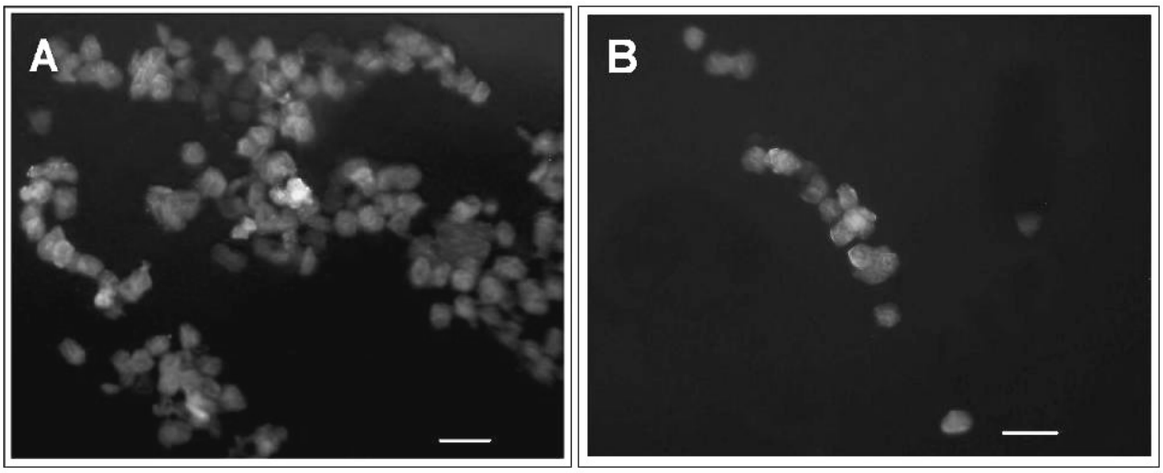


شکل شماره ۲: واکنش آنتی‌بادی کونژوگه شده با رودامین با آنتی‌بادی اولیه علیه TH پس از ۲۱ روز تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی در حضور Shh و FGF8 (A) و بدون حضور آنها (Scale Bar=50µm (B)

از آنجایی‌که حداکثر تمایز به سلول‌های حاوی نشانگر TH در روز D14 مشاهده گردید و تفاوت معنی‌داری با روز D21 نداشت، بنابراین روز D14 برای حصول اطمینان از دوپامینرژیک بودن سلول‌ها در نظر گرفته شد. در این راستا DAT به‌عنوان نشانگر اختصاصی دوپامینی و DβH به‌عنوان نشانگر کاتکول آمین‌هایی که در ادامه روند تمایز ایجاد می‌شوند (مانند نور اپی‌نفرین) ارزیابی شد. همان‌طورکه در نمودار شماره ۳ مشاهده می‌شود، در گروه کنترل تمایز اختصاصی به سمت سلول‌های مثبت به نشانگر خاصی دیده نمی‌شود (۰/۵±۴/۶٪ و ۰/۶±۳/۳٪ به ترتیب برای نشانگرهای DAT و DβH). در مورد گروه حاوی FGF8 اگرچه افزایش درصد هر دو نشانگر یاد شده در مقایسه با گروه کنترل قابل مشاهده است (۱/۹±۱۳/۱٪ و ۲/۸±۸/۸٪ به ترتیب برای DAT و DβH)، ولی اختصاصی شدن به سمت نشانگر خاصی دیده نمی‌شود. در گروه تیمار شده با Shh، ۳/۵±۲۹/۶٪ از سلول‌ها حاوی DAT و فقط ۰/۵±۱/۴٪ از سلول‌ها حاوی DβH می‌باشند که نسبت به گروه کنترل و یا FGF8 برای نشانگر DAT اختصاصی‌تر است. این موضوع در مورد گروه FGF8+Shh نیز نشان داده شده است، در این گروه ۵/۶±۷۵/۸٪ از سلول‌ها نسبت به نشانگر DAT مثبت و فقط ۲±۵/۶٪ از سلول‌ها حاوی نشانگر DβH می‌باشند (شکل شماره ۳).

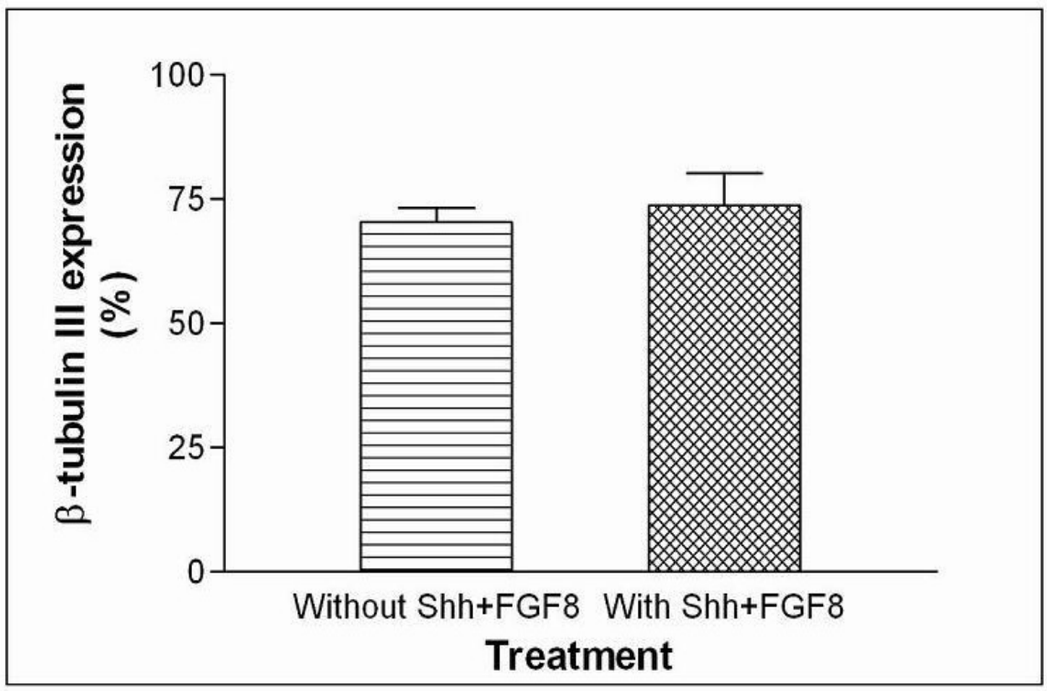


نمودار شماره ۳: بررسی تأثیر درمان با Shh و FGF8 بر بیان نشانگرهای DAT و DβH، ۱۴ روز پس از تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی در حضور Shh و FGF8 **($p<۰/۰۱$).



شکل شماره ۳: واکنش آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با FITC، با آنتی‌بادی اولیه علیه DAT (A) و DβH (B)، ۱٤ روز پس از تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی در حضور Shh و FGF8 (Scale bar=50µm).

در مطالعه قبلی نشان داده شد بیشترین میزان بیان نشانگر β-tubulin III بدون حضور Shh و FGF8 مربوط به روز ۲۱ می‌باشد (۱۸)، بنابراین برای بررسی اثر Shh و FGF8 بر درصد بیان نشانگر β-tubulin III در روز ۲۱، میزان بیان این نشانگر در حضور Shh و FGF8 و عدم حضور آنها (گروه کنترل) با یکدیگر مقایسه گردید. همان‌طورکه در نمودار شماره ۴ دیده می‌شود، بعد از القای تمایز توسط Shh و FGF8، ۶/۵±۷۳/۸٪ از سلول‌ها حاوی β-tubulin III می‌باشند که نسبت به مسیر تمایز بدون Shh و FGF8 کمی افزایش نشان می‌دهد (۲/۹±۷۰/۴٪)، ولی از نظر آماری این تفاوت معنی‌دار نیست.



نمودار شماره ٤: بررسی نشانگر β-tubulin III، ۲۱ روز پس از تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی در حضور Shh و FGF8 و عدم حضور آنها

بحث

یکی از نتایجی که در این مطالعه از اهمیت خاصی برخوردار است، وجود نشانگرهای کاتکول آمینی در سلول‌های جداسازی شده، می‌باشد. برطبق یافته‌های تحقیق حاضر سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی بعد از جداسازی دارای نشانگرهای دوپامینرژیک می‌باشند. این مسئله چندان دور از انتظار نیست؛ زیرا این موضوع در سال ۱۹۹۸ توسط Elwan و همکارانش گزارش شد (۲۱). برطبق این گزارش سلول‌های اپی‌تلیالی جداسازی شده از پرده آمنیون میمون دارای نشانگرهای TH، DβH و DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylacetic Acid) بودند. این مطلب که این سلول‌ها حاوی دوپامین می‌باشند تا حدی قابل توجیه است؛ زیرا دوپامین به‌عنوان یک سیگنال الگودهنده (Patterning Signal) در دوران جنینی مطرح بوده و بنابراین ترشح آن در تکامل سیستم عصبی جنین دارای اهمیت می‌باشد. Sakuragawa و همکارانش در سال ۲۰۰۰ (۱۹)، براساس اطلاعات ذکر شده و با توجه به توانایی این سلول‌ها در سنتز دوپامین، اقدام به پیوند این سلول‌ها در یک مدل حیوانی پارکینسونی کردند. در این راستا برای القای سنتز دوپامین، سلول‌ها در محیط کشت حاوی تیروزین و BH4 قرار گرفتند. بعد از پیوند نیز اثراتی از بهبود در حیوانات مورد بررسی دیده شد. براساس نتایج تحقیق حاضر، پیوند مستقیم سلول‌ها در یک مدل پارکینسونی با چند چالش اساسی همراه است. ابتدا اینکه براساس یافته‌ها، همه سلول‌های جداسازی شده حاوی دوپامین نمی‌باشند، بنابراین سلول‌های دیگر امکان تمایز به سلول‌های غیردوپامینی از جمله سلول‌های حاوی نروترانسمیترهای تحریکی را دارا هستند. پیوند سلول‌های حاوی نروترانسمیترهای تحریکی نظیر گلوتامات می‌تواند اثر سایتوتوکسیک خود را در ناحیه مغز میانی بر جا بگذارد. ضمناً سلول‌های جداسازی شده، خود مخلوطی از سلول‌های حاوی دوپامین، اپی‌نفرین یا نور اپی‌نفرین می‌باشند. بنابراین پیوند سلول‌های حاوی اپی‌نفرین در یک مدل پارکینسونی نیز خالی از نقص نمی‌باشد. نکته مهم‌تر اینکه، بعد از ۷ روز درصد سلول‌های مثبت به نشانگرهای دوپامینرژیک به شدت کاهش می‌یابد و این کاهش به حضور تیروزین و BH4 بستگی ندارد؛ بلکه کاهش درصد می‌تواند به دو علت انجام گرفته باشد. کاهش زنده ماندن (Viability) سلول‌های حاوی نشانگرهای دوپامینی می‌تواند عامل اول در نظر گرفته شود. این مطلب که سلول‌های بنیادی درصدی از تمایز را می‌گذرانند و نسبت به سلول‌های بنیادی اولیه به عوامل استرس‌زا از جمله استرس متابولیک حساس‌تر هستند، قابل پذیرش است و این مسئله باعث کاهش زنده ماندن آنها می‌شود (۲۲). اما با توجه به اینکه در مراحل مختلف کشت سلولی، میزان کل سلول‌های زنده کاهش چشمگیری را ندارد، لذا باید به دنبال علت دیگری بود. عامل دوم که به‌نظر مهم‌تر است، مسئله برگشت سلول‌های تمایزیافته به وضعیت اولیه (Revert) می‌باشد (۲۳). این موضوع که در تمامی پروسه‌های تمایزی دیده می‌شود، بدین صورت است که پس از تمایز سلول‌های بنیادی به یک سلول خاص، فاکتورهای رشد به کار رفته در مسیر تمایز قطع شده و سلول‌ها به مدت ۱۰-۷ روز به‌صورت برون‌تن کشت داده می‌شوند، و نشانگرهای اختصاصی سلول تمایزیافته از بین می‌رود و دوباره نشانگرهای سلول‌های بنیادی توسط این سلول‌ها بیان می‌گردد. به‌نظر می‌رسد عامل دوم (Revert) در مورد سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی صادق‌تر است، هرچند برای اثبات فعال شدن سیستم Revert در سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی نیاز به مطالعه بیشتری می‌باشد. به هر صورت، پیوند مستقیم این سلول‌ها با موانع اساسی ذکر شده، همراه خواهد بود. تحقیق دیگری که در سال ۲۰۰۱ توسط Kakishita و همکارانش (۲۴) انجام گرفت تا حدی در تناقض با نتایج Sakuragawa بود. براساس این تحقیق عامل اصلی در بهبود حیوانات در مدل پارکینسونی، سلول‌های تمایزیافته اپی‌تلیال آمنیونی و رهایش دوپامین نیست؛ بلکه ترشح فاکتورهای رشد توسط سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی بعد از پیوند می‌باشد. طبق این مطالعه، اثرات مثبت فاکتورهای رشد ترشحی توسط سلول‌های اپی‌تلیالی آمنیونی بر بقای نورون‌های دوپامینرژیک باقیمانده باعث بهبود در مدل حیوانی پارکینسون می‌شود. بنابراین در این پژوهش در نظر گرفته شد؛ تا سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی در محیط برون‌تن به سمت سلول‌های عصبی دوپامینرژیک تمایز یابند و سلول‌های کاملاً تمایزیافته برای پیوند آماده شوند. برطبق نتایج حاصل از این مطالعه، مصرف همزمان FGF8 و Shh باعث افزایش درصد سلول‌های دوپامینرژیک می‌شوند، حتی مصرف

FGF8 یا Shh به تنهایی از گروه بدون فاکتور رشد (گروه کنترل) اثر بیشتری در تمایز سلول‌ها دارد (هرچند، میزان اثر هرکدام به تنهایی به اندازه مصرف همزمان ۲ فاکتور رشد با هم نمی‌باشد). همان‌طورکه قبلاً هم ذکر شد تمایز سلول‌ها به نورون‌های دوپامینرژیک در دوران جنینی وابسته به Shh است که به‌عنوان یک سیگنال طرح‌یابی محور پشتی- شکمی از Floor Plate ترشح می‌گردد. همچنین در مطالعات مختلف، در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به نورون‌های دوپامینرژیک، از Shh به‌صورت Ex Vivo برای غنی کردن سلول‌های عصبی دوپامینرژیک استفاده شده است (۲۵،۱۶). از طرف دیگر، در دوران جنینی FGF8 به‌عنوان یک مورفوژن و سیگنال محور قدامی- خلفی، باعث تمایز سلول‌های پیش‌ساز مغز میانی به سمت نورون‌های دوپامینرژیک می‌شود (۲۵،۱۷،۱۶). از این رو در پروسه‌های تمایز به‌صورت Ex Vivo از FGF8 به‌عنوان یک فاکتور رشد در القای سلول‌ها به سمت سلول‌های عصبی دوپامینرژیک استفاده می‌گردد. مطالعات دیگری نیز وجود دارد که اثربخشی این ۲ فاکتور رشد را زیر سؤال می‌برد. در این راستا Stull و همکارانش گزارش کرده‌اند فعال شدن سیگنال‌های داخل سلولی Shh و FGF8 برای تمایز سلول‌های بنیادی به نورون‌های دوپامینرژیک کافی نیست (۲۶). طبق این گزارش حتی نورون‌های جداسازی شده از استریاتوم موش نیز در حضور ۲ فاکتور رشد مذکور توانایی بیان نشانگرهای دوپامینی را نخواهند داشت. مهم‌ترین علت برای تضاد ذکر شده در این مقاله تفاوت سلول‌های به کار برده شده با سلول‌های بنیادی جنینی و در نتیجه تفاوت در سیگنالینگ داخل سلولی عنوان شده است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد پاسخ‌دهی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به Shh و FGF8 شبیه به سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشد (به‌خصوص در مورد Shh). بنابراین از این ۲ فاکتور رشد می‌توان برای تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به نورون‌های دوپامینرژیک بهره برد، اما تفاوت در مدت زمان لازم برای بیان نشانگرهای دوپامینی باید مورد توجه قرار گیرد. در پروتکل‌هایی که تمایز سلول‌های بنیادی به نورون‌های دوپامینرژیک مدنظر است، افزایش درصد نشانگرهای دوپامینی همزمان با افزایش درصد نشانگر عصبی (β-tubulin III) انجام می‌گیرد (۲۸،۲۷)، ولی در این تحقیق حداکثر بیان نشانگر عصبی در روز ۲۱ و حداکثر بیان نشانگر دوپامینی در روز ۱۴ بود. همچنین میزان بیان نشانگر دوپامینی در نهایت از میزان بیان نشانگر عصبی بیشتر مشاهده شد (۸۳٪ حاوی TH و ۷۰٪ حاوی β-tubulin III). این تفاوت‌ها را می‌توان به تفاوت در نوع سلول‌ها و در نهایت تفاوت در سیگنالینگ داخلی دانست. به هر صورت باید به این نکته توجه داشت که (با وجود شباهت بسیار) سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی درصدی از تمایز را گذرانده‌اند و نباید آنها را دقیقاً برابر با سلول‌های بنیادی جنینی دانست. نکته دیگری که از نتایج این تحقیق برمی‌آید این است که Shh موجب توقف تمایز سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی در مرحله دوپامینرژیک می‌شود. همان‌طورکه قبلاً هم ذکر شد بعد از تولید دوپامین بیان آنزیم دوپامین بتا- هیدروکسیلاز در سلول باعث می‌گردد تا نور اپی‌نفرین از دوپامین تولید شود. تقریباً در تمامی پروسه‌های تمایزی که تا به حال گزارش شده است، مخلوطی از نورون‌ها (حاوی نروترانسمیترهای مختلف) به دست آمده است (۲۹-۲۷). بنابراین امروزه تلاش در جهت اختصاصی کردن مسیر تمایز در بسیاری از تحقیقات دیده می‌شود. به هر صورت طبق اطلاعات به دست آمده در این مطالعه، Shh را باید به‌عنوان یک فاکتور اختصاصی برای دوپامینرژیک شدن نورون‌ها در نظر گرفت که باعث مهار بیان آنزیم DβH می‌شود. در این راستا توجه به دو نکته ضروری است. اولاً در این تحقیق، اختصاصی شدن برای دوپامین مدنظر بوده و با نروترانسمیترهای نور اپی‌نفرین و اپی‌نفرین مقایسه صورت گرفته است، درصورتی‌که در مسیرهای تمایزی مشابه، تمایز سلول‌ها به نورون‌های حاوی سروتونین، گلوتامات و GABA نیز (هرچند کم) گزارش شده است. بنابراین لازم است که (علاوه بر DβH) نشانگرهای نروترانسمیترهای دیگر نیز ارزیابی شود. ثانیاً در راستای اختصاصی شدن مسیرهای تمایزی تلاش‌هایی صورت گرفته است؛ تا سلول مورد نظر از مخلوطی از سلول‌ها انتخاب و جداسازی (Sort) گردد. استفاده از فلوسایتومتری یکی از گزینه‌های اصلی در این زمینه است. مطلب دیگری که می‌توان از یافته‌های این تحقیق نتیجه گرفت، این است که کاهش درصد سرم باعث حذف نشانگر DAT به‌عنوان مارکر اختصاصی سلول‌های عصبی دوپامینرژیک نشده است. در مورد سلول‌های بنیادی جنینی نشان داده شد حذف سرم باعث عدم بیان

DAT می‌گردد (۳۰). اگرچه این تفاوت را می‌توان مرتبط با ۱٪ سرم افزوده شده به محیط‌های کشت در این تحقیق دانست، اما از آنجایی‌که طی مراحل مختلف، تمایز سرم از ۱۰٪ (در مرحله انجام شده برای تشکیل اجسام شبه‌جنینی) به ۱٪ کاهش یافته است؛ در نتیجه کاهش درصد بیان DAT، بیش از این مورد انتظار بود. از این رو تفاوت بین سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به‌عنوان یک عامل اثرگذار بر بیان DAT در شرایط کاهش سرم مورد قبول‌تر است، زیرا سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی در روز جداسازی نیز نشانگر DAT را بیان کردند. به هر صورت این تفاوت را باید یک مزیت دیگر برای سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی در برابر سلول‌های بنیادی جنینی به حساب آورد. در مجموع می‌توان گفت، سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی می‌توانند به‌عنوان یک جایگزین برای سلول‌های بنیادی جنینی در درمان بر پایه جایگزینی سلول به کار گرفته شوند. این سلول‌ها توانایی تمایز به سلول‌های حاوی نشانگرهای عصبی دوپامینرژیک را دارند و برای رسیدن به این هدف استفاده از فاکتورهای رشد ذکر شده در این تحقیق ضروری است. در این راستا تحقیقات گسترده‌تر در زمینه بررسی نشانگرهای عصبی دیگر، بررسی کارآمد بودن (Functional) این سلول‌ها توسط اندازه‌گیری دوپامین ترشح شده در اثر تحریک با KCL و بررسی پیوند این سلول‌ها در یک مدل حیوانی، ضروری به‌نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

این نتایج بیانگر آن است که سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی توانایی تمایز به سلول‌های عصبی دوپامینی را دارند و این توانایی تحت تأثیر فاکتورهای رشد Shh و FGF8 قرار می‌گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به‌صورت مشترک بین مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسیده است. بدین وسیله از سرکار خانم دکتر نیرومنش و سرکار خانم احیایی و جناب آقای نوشین تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References:

1. Brunton LL, Lazo JS, Parker K. In: Goodman & Gilman.s, the Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. New York: McGraw-Hill; 2006. p. 527-538.

2. Chai C, Leong KW. Biomaterials Approach to Expand and Direct Differentiation of Stem Cells. Mol Ther 2007;15(3):467-80.

3. Mallon BS, Park KY, Chen KG, Hamilton RS, McKay RD. Toward Xeno-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells. Int J Biochem Cell Biol 2006;38(7):1063-75.

4. Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human Embryonic Stem Cells Express an Immunogenic Nonhuman Sialic Acid. Nat Med 2005;11(2):228-32.

5. Heng BC, Liu H, Cao T. Feeder Cell Density-A Key Parameter in Human Embryonic Stem Cell Culture. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2004;40(8-9):255-7.

6. Mitjavila-Garcia MT, Simonin C, Peschanski M. Embryonic Stem Cells: Meeting the Needs for Cell Therapy. Adv Drug Deliv Rev 2005;57(13):1935-43.

7. Bobbert M. Ethical Questions Concerning Research on Human Embryos, Embryonic Stem Cells and Chimeras. Biotechnol J 2006;1(12):1352-69.

8. Lei T, Jacob S, Ajil-Zaraa I, Dubuisson JB, Irion O, Jaconi M, Feki A. Xenofree Derivation and Culture of Human Embryonic Stem Cells: Current Status, Problems and Challenges. Cell Res 2007;17(8):682-8.

9. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. Stem Cells 2005;23(10):1549-59.

10. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of Stem Cell Marker-Positive Cells by Immunofluorescence in Term Human Amnion. J Reprod Immunol 2007;75(2):91-6.

11. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem Cells Derived from Human Fetal Membranes Display Multilineage Differentiation Potential. Biol Reprod 2007;77(3):577-88.

12. Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T, Ichihara S, Yamada T, Kano Y, Yamabe T, Ito Y. Human Placenta Feeder Layers Support Undifferentiated Growth of Primate Embryonic Stem Cells. Stem Cells 2004;22(4):433-40.

13. Lefebvre S, Adrian F, Moreau P, Gourand L, Dausset J, Berrih-Aknin S, Carosella ED, Paul P. Modulation of HLA-G Expression in Human Thymic and Amniotic Epithelial Cells. Hum Immunol 2000;61(11):1095-101.

14. Sakuragawa N, Tohyama J, Yamamoto H. Immunostaining of Human Amniotic Epithelial Cells: Possible Use as a Transgene Carrier in Gene Therapy for Inborn Errors of Metabolism. Cell Transplant 1995;4(3):343-6.

15. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the Amniotic Membrane for Potential Use in Tissue Engineering. Eur Cell Mater 2008;15:88-99.

16. Burbach JP, Smidt MP. Molecular Programming of Stem Cells Into Mesodiencephalic Dopaminergic Neurons. Trends Neurosci 2006;29(11):601-3.

17. Maxwell SL, Li M. Midbrain Dopaminergic Development in Vivo and in Vitro from Embryonic Stem Cells. J Anat 2005;207(3):209-18.

18. Niknejad H, Peirovi H, Jambar Nooshin B, Ahmadiani A, Ghanavi J, Jorjani M. Induced in Vitro Differentiation of β-Tubulin III Expressed Cells from Human Amniotic Epithelial Cells. Qom Univer of Med Scien J 2009;3(2):31-40. [Full Text in Persian]

19. Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N. Human Amniotic Epithelial Cells Produce Dopamine and Survive after Implantation Into the Striatum of a Rat Model of Parkinson's Disease: A Potential Source of Donor for Transplantation Therapy. Exp Neurol 2000;165(1):27-34.

20. Niknejad H, Peirovi H, Ahmadiani A, Ghanavi J, Jorjani M. Differentiation Factors that Influence Neuronal Markers Expression in Vitro from Human Amniotic Epithelial Cells. Eur Cell Mater 2010;19: 22-29.

21. Elwan MA, Thangavel R, Ono F, Sakuragawa N. Synthesis and Release of Catecholamines by Cultured Monkey Amniotic Epithelial Cells. J Neurosci Res 1998;53(1):107-13.

22. John Gearhart, Brigid Hogan, Douglas Melton, Roger Pedersen, E. Donnall Thomas, James Thomson, Michael West. Essential of Stem Cell Biology 2006;492-493.

23. Enver T, Soneji S, Joshi C, Brown J, Iborra F, Orntoft T, Thykjaer T, Maltby E, Smith K, Dawud RA, Jones M, Matin M, Gokhale P, Draper J, Andrews PW. Cellular Differentiation Hierarchies in Normal and Culture-Adapted Human Embryonic Stem Cells. Hum Mol Genet 2005;14(21):3129-40.

24. Kakishita K, Nakao N, Sakuragawa N, Itakura T. Implantation of Human Amniotic Epithelial Cells Prevents the Degeneration of Nigral Dopamine Neurons in Rats with 6-Hydroxydopamine Lesions. Brain Res 2003;980(1):48-56.

25. Abeliovich A, Hammond R. Midbrain Dopamine Neuron Differentiation: Factors and Fates. Dev Biol 2007;304(2):447-54.

26. Stull ND, Iacovitti L. Sonic Hedgehog and FGF8: Inadequate Signals for the Differentiation of a Dopamine Phenotype in Mouse and Human Neurons in Culture. Exp Neurol 2001;169 (1):36-43.

27. Park S, Lee KS, Lee YJ, Shin HA, Cho HY, Wang KC, Kim YS, Lee HT, Chung KS, Kim EY, Lim J. Generation of Dopaminergic Neurons in Vitro from Human Embryonic Stem Cells Treated with Neurotrophic Factors. Neurosci Lett 2004;359(1-2):99-103.

28. Ko JY, Park CH, Koh HC, Cho YH, Kyhm JH, Kim YS, Lee I, Lee YS, Lee SH. Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursors as a Continuous, Stable, and on-Demand Source for Human Dopamine Neurons. J Neurochem 2007;103(4):1417-29.

29. Park CH, Minn YK, Lee JY, Choi DH, Chang MY, Shim JW, Ko JY, Koh HC, Kang MJ, Kang JS, Rhie DJ, Lee YS, Son H, Moon SY, Kim KS, Lee SH. In Vitro and in Vivo Analyses of Human Embryonic Stem Cell-Derived Dopamine Neurons. J Neurochem 2005;92(5):1265-76.

30. Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL, Studer L. Derivation of Midbrain Dopamine Neurons from Human Embryonic Stem Cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(34):12543-8.

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.