

استفاده از کایمر بلدرچین_جوجه برای مطالعه تکوین سلول‌های تاجی عصبی،

سلول‌های ایمنی و خونی

سرکار خانم دکتر عیدی

گردآوری: پریرسا دانا

مقدمه

اسلاید 1: سیستم مارکر کایمر بلدرچین-جوجه در سال 1969 ابداع شد، این سیستم انگیزه‌ی جدیدی برای تجزیه و تحلیل مهاجرت سلولی، تکوین سیستم عصبی، ایمنی و خونی بود. به عنوان یک ابزار مفید برای مطالعه مسائل زیست‌شناسی تکوینی بود. این روش بر اساس مطالعه‌ی هسته‌ی هتروکروماتین متراکم بلدرچین در دوران جنینی و بلوغ بود که DNA فشرده در مرکز هسته تجمع یافته بود. سهم نیکول لو دوارین در کشف و کاربرد این تکنیک در طی 40 سال گذشته بسیار تأثیر گذار بود.

اسلاید 2: کایمر (شیمِر) در واقع یک ارگانسیم واحد است که از سلول‌های دو یا چند فرد تشکیل شده است - یعنی شامل دو مجموعه DNA است که دارای کد برای ایجاد دو موجود جداگانه است. کایمر انواع مختلفی دارد.

1- کایمر ترکیبی از دو حیوان 2- کایمر ترکیبی از یک حیوان و یک انسان 3- کایمر ترکیبی از چندین حیوان. کایمر بلدرچین جوجه از نوع اول است.

بر طبق قوانین علمی ایجاد هیبریدهای انسان و حیوان را امکان پذیر است، اما اجازه نمی‌دهد که آنها پرورش یابند. دستورالعملها اجازه ورود سلولهای بنیادی جنینی انسان به پستانداران غیر انسانی را می‌دهند، "در شرایطی که هیچ آزمایش دیگری نمی‌تواند اطلاعات مورد نیاز را ارائه دهد". سلولهای بنیادی معمولاً پس از سه تا پنج روز از بلاستوسیست گرفته می‌شوند - توده‌ای سلولی حاوی 150 سلول در مرحله اولیه تکوین انسان قبل از کاشت در رحم ایجاد می‌شود. انتقال هسته‌ای، تکنیکی که در حال حاضر در کلون کردن حیوانات بالغ مورد استفاده قرار می‌گیرد، انتقال هسته از یک سلول به سلول دیگر و ایجاد سلول جدید با هسته متفاوت است. تمام آزمایشات کلونینگ پستانداران بالغ از تغییرات هسته‌ای استفاده می‌کنند. خوک‌های رشد یافته از سلول‌های بنیادی جنینی انسان که به آنها تزریق شده بود، دانشمندان از سلول‌هایی که DNA آنها از دو گونه در نزدیک ترین سطح شباهت ترکیب می‌شوند، شکفت زده شدند. این کشف می‌تواند پیامدهای جدی در مورد عمل پیوند و استفاده از بافت حیوانات و اندام ها در انسان و حتی منشأ بیماری‌هایی مانند HIV داشته باشد.

تکوین سلول‌های تاجی عصبی

اسلاید 3: سلول‌های تاج عصبی جمعیت سلولی جنینی چند توان و ناپایدار است. فقط در مهره داران یافت می‌شود و به دلیل اهمیت تمایزی به عنوان چهارمین لایه‌ی جنینی شناخته می‌شود. سلول‌های تاج عصبی به عنوان مرز بین اکتودرم غیر عصبی و عصبی شناخته شده‌اند. سه لایه‌ی جنینی شامل اکتودرم، اندودرم، مزودرم است. سیستم عصبی از مشتقات اکتودرم است. مدت کوتاهی پس از تشکیل صفحه‌ی عصبی، لبه‌های آن ضخیم شده و به سمت بالا حرکت می‌کنند تا چین‌های عصبی را تشکیل دهند. در این حین یک شیار عصبی II شکل در مرکز صفحه‌ی عصبی تشکیل می‌شود. چین‌های عصبی نهایتاً به یکدیگر متصل شده و لوله‌ی عصبی را در زیر اکتودرم تشکیل می‌دهند. سلول‌هایی که در پشتی‌ترین ناحیه‌ی لوله‌ی عصبی قرار دارند، تبدیل به سلول‌های تاج عصبی می‌شوند.

بررسی تاریخچه

اسلاید 4: رنگ آمیزی Feulgen یک روش رنگ آمیزی است که توسط رابرت فولگن کشف شده و در بافت شناسی برای شناسایی مواد کروموزومی یا DNA در نمونه‌های سلولی استفاده می‌شود، تیره رنگ است. این رنگ آمیزی به هیدرولیز اسید DNA بستگی دارد. بار منفی DNA موجود در هسته توسط پلی آمین‌های کوچک و یون منیزیم تا حدودی خنثی گردیده است. رنگ آمیزی Feulgen توده بزرگی از DNA هتروکروماتین را در مرکز هسته نشان می‌دهد، ارگانل‌های سلولی بلدرچین با فولگن به عنوان نشانگر رنگ آمیزی شد.

هسته سلول‌های بلدرچین (سمت چپ) است. در سلول‌های جوجه، هتروکروماتین به طور مساوی توزیع می‌شود (سمت راست). رنگ آمیزی فولگن سلول‌های جوجه را از سلول‌های بلدرچین متمایز می‌کند. سلول‌های بلدرچین رنگ آمیزی شده در اینترفاز با هسته متراکم شده به صورت هتروکروماتین هستند ولی هسته‌های جوجه در اینترفاز نیستند.

اسلاید 5: بلدرچین و مرغ از نظر طبقه بندی نسبت به هم نزدیک هستند. بلدرچین ژاپنی عضو خانواده قرقاول (Phasianidae) است. مرغ یا ماکیان نیز از خانواده قرقاولان یا سیخک داران است، وزن بلدرچین 10 گرم و جوجه 30 گرم است. مدت جوجه کشی برای جوجه مرغ 21 روز و برای بلدرچین 17 و در بعضی گونه‌ها 21 روز است. برای ایجاد کایمر باید دو گونه سرعت رشد مشابه باشند. مراحل اولیه تکوین رشد جنین اهدا کننده و گیرنده با یک سرعت پیش برود. رنگدانه‌های پر بلدرچین به عنوان نشانگر اضافی است. در روز 3 الی 4 رگ‌های خونی بلدرچین و جوجه شروع به رشد می‌کند. تکوین بلدرچین ژاپنی نسبت به جوجه با سرعت بیشتری انجام می‌گیرد.

اسلاید 6: هسته‌های سلول بلدرچین. نقشه شماتیک سازمان فراساختاری هسته بلدرچین: الف) هسته نوع 1 کروماتین بزرگ و متراکم است، ساختارهای گرانولی، فیبری و ماتریکس آمورف در میان رشته‌های کروماتید قرار گرفته است. ب) هسته نوع 2 در سلول‌های کبدی بلدرچین دیده می‌شود. چندین DNA متراکم در ارتباط با RNA هسته‌ای است. ج) هسته نوع 3 سلول‌های بلدرچین در میان گرانول‌های RNA و فیبرها در داخل هسته‌ی مرکزی DNA بزرگ فشرده شده قرار گرفته است.

برای ایجاد کایمر باید شرایط زیر را در نظر داشت: تخم‌های بلدرچین و مرغ باید تازه باشد، نباید بیش از یک هفته گذشته باشد. در 15 درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شوند. توری و سیم برای نگهداری تخم به صورت افقی استفاده می‌شود. استریومیکروسکوپ امکان بزرگنمایی مداوم برای جداسازی لوله‌ی عصبی یا بطن‌های مغزی به وسیله سوزن‌های فلزی بسیار نازک و مقاوم را فراهم می‌کند. عملیات جراحی بروی بلاستودرم تخم در سطح فوقانی زرده ایجاد می‌شود. اگر تخم به صورت افقی باشد هنگام جدا کردن پوسته بلاستودرم آسیب می‌بیند. غشای ویتلینی جدا می‌شود، در آخر به وسیله یک قطعه نوار پوسته تخم بسته می‌شود. روزانه برای بقای جنین تقویت کننده‌هایی به صورت دستی اضافه می‌شود.

اسلاید 7: کایمر بلدرچین-جوجه برای بررسی سرنوشت سلول‌های تاجی عصبی. 1) شماتیکی از تشکیل لوله‌ی عصبی کایمر بلدرچین-جوجه: adrenomedullary مشتق شده از مدولا و غده آدرنال. ناحیه‌ی محصور در سومیت‌های 18 تا 24 لوله‌ی عصبی از جوجه برداشته شده و پیش از مهاجرت سلول تاجی عصبی معادل همان ناحیه از بلدرچین جدا شده جایگزین آن می‌شود. وجود پره‌های رنگی بلدرچین در وسط بدن جوجه حاکی از مهاجرت ملانوسیت‌های مشتق شده از سلول‌های تاجی عصبی بلدرچین در بدن جوجه است.

اسلاید 8: نقشه سرنوشت مشتقات تاجی عصبی در جنین جوجه که توسط کایمر بلدرچین-جوجه تعیین می‌شود. الف) نقشه سرنوشت مشتقات عصبی و غیر عصبی در امتداد محور عصبی. تاج عصبی سفالینک سومیت 7. تاج عصبی تنه سومیت 28. سلول‌های ملانوسیت (میل‌های خاکستری)، منشاء مشتقات مزانشیمی (بافت‌های اسکلتی و پیوندی) تاج عصبی سفالینک (نوار سبز)، مشتقات سیستم عصبی محیطی تاجی عصبی، شامل گانگلیون حسی (میل‌های آبی)، پاراسمپاتیک گانگلیون مژگانی (نوار زرد)، سمپاتیک (نوار قرمز) و روده (میل‌های نارنجی) غدد درون ریز فوق کلیوی سلول‌ها از تاج عصبی تنه بین سومیت‌های 18 و 24 سرچشمه می‌گیرند (بنفش). ب) شماتیک جنین جوجه سومیت 28. سیستم پیچیده عصبی روده (نارنجی). گانگلیون سمپاتیک شامل گانگلیون گردنی (قرمز) SCG، پاراسمپاتیک گانگلیون مژگانی CG (زرد). مدولای فوق کلیه AD.GL (بنفش)

اسلاید 9: کایمر Germ line زمانی رخ می‌دهد که سلول‌های جنسی (مثلا اسپرم و تخمک) از ارکانیسم دیگری که از نظر ژنتیکی با خود حیوان یکسان نیست گرفته می‌شود. ابزاری مهم برای تحقیقات اساسی و کاربردی در پرندگان کایمر Germ line بلدرچین-جوجه است. Germ line کایمر می‌تواند از پیوند سلول‌های بلاستودرمال PGC یا سلول‌های بیضه تولید شود. PGC ها منبع اصلی کایمر germ line هستند. مراحل تکوین کایمر Germ line بلدرچین-جوجه: برای این کار جنین جوجه (میزبان) برداشته می‌شود، جنین اهدا کننده جایگزین آن می‌شود و بر روی زرده (محتویات نطفه ای) میزبان قرار داده شده است. A) تکوین جنین بلدرچین 5 روزه که در ارتباط با زرده جوجه ایجاد شده است. B, C) کایمر 10/5 روزه بلدرچین-جوجه D) کایمر 16/5 روزه بلدرچین-جوجه جدا شده از تخم مرغ.

کایمر بطن مغزی بلدرچین-جوجه برای نشاندار کردن مناطق مغزی در مطالعات انجام می‌شود. مهاجرت سلولی در درون نوروایپ تلیوم صورت می‌گیرد. برای این اهداف کل سفالن یا بخشی از بطن مغزی بین جوجه و بلدرچین می‌تواند مبادله شود. این مطالعات به سه دلیل قابل اهمیت است. 1- بطن مغزی به وضوح با شیارها مشخص می‌شود. اما انحنای گسترده یا پوشاندن مغز توسط آمیون هنوز رخ نداده است. 2- بافت عصبی به شدت به نوتوگورد چسبیده نیست. 3- نوروایپ تلیوم هنوز وجود ندارد. عروق تازه تشکیل شده فاقد نشانه هستند باید اقدام جدیدی انجام شود که مشخص شود پیوند مغزی در کدام ناحیه پراکنده شده است. توضیح تصویر شناسایی سلول‌های بلدرچین در کایمر بلدرچین-جوجه که با مونوکلونال آنتی بادی ضد سلول‌های بلدرچین-جوجه در مقابل آنتی ژن مخصوص رنگ آمیزی شده است. 1- بخشی از سلول‌های تاج عصبی ناحیه‌ی سری بلدرچین برداشته شده و به جای سلول‌های تاجی عصبی جنین جوجه جایگزین می‌شود. سلول‌های تاجی عصبی در دو طرف مهاجرت می‌کند. 2- در جنین جوجه (میزبان) سلول‌های تاجی عصبی بلدرچین به ناحیه جلویی سر مهاجرت کردند و ملانوسیت مشتق شده از نورال کرست باعث شده در ناحیه‌ی سر جوجه پره‌ای رنگی بلدرچین ایجاد شود.

اسلاید 10: ساختار کایمر برای مطالعه سیستم ایمنی: این سیستم برای بررسی تکوین تیموس و بررسی جز به جز سلول به کار می‌رود و نشان می‌دهد که لنفوسیت‌ها مشتق شده از HSC سلول‌های بنیادی خون ساز است. HSC باعث ایجاد سلول‌های دندریت در مدولای تیموس می‌شود. سیستم نشانگر بلدرچین-جوجه برای مطالعه‌ی توسعه‌ی تیموس و بورسا فابریسوس از طریق پیوند بلدرچین به جوجه، می‌توان منشأ سلول‌های اولیه را شناسایی کنیم. بورسا فابریسوس جایگاهی است که برای خونسازی تخصصی شده که اولین بار توسط بروس کلیک شناخته شد. بورسا فابریسوس برای ساخت سلول B که بخشی از سیستم ایمنی است در تکوین پرندگان ضروری است. تیموس آویشنگ گلويا اندام تخصص یافته دستگاه ایمنی بدن است. وظیفه بالغ کردن لنفوسیت T را که سلول‌های حیاتی برای دستگاه

ایمنی بدن هستند. لنفوسیت‌های نابالغ از طریق خون به غده‌ای پشت جناغ سینه به نام تیموس منتقل شده و در آنجا بالغ می‌شوند. پس از پیوند روده اولیه بلدرچین سه روزه به جنین جوجه نشان داد که تیموس در جایگاهی نابجا ایجاد شده و تمام لنفوسیت‌های تولید شده متعلق به میزبان (جوجه) است نه بلدرچین. لنفوسیت‌های جوجه متفاوت از لنفوسیت بلدرچین است. این نشان می‌دهد لنفوسیت‌ها منشأ بیرونی دارند، ورود سلول‌های خونی به تیموس مقدم است. لنفوسیت‌ها از سلول‌های بنیادی خونساز مشتق شده است. سلول‌های دندریتیک در مدولای تیموس نیز از سلول‌های بنیادی خونساز ایجاد شده‌اند. کایمر بلدرچین – جوجه می‌تواند از تخم بیرون بیاید چند هفته زنده بماند یا بین دو هفته تا سه ماه بعد از تولد زنده بماند. بافت پیوند زنوژنیک ممکن است از نظر ایمنی پس زده شود. حمله‌ی ایمنی استروما در هفته‌های اول رخ می‌دهد.

اسلاید 11: کایمر بلدرچین_ جوجه برای مطالعه‌ی سلول‌های خونی: مهاجرت سلول‌های خونساز به تیموس در کایمر بلدرچین – جوجه تازه متولد شده رخ می‌دهد. مهاجرت سلول‌های خونساز گسترده‌تر از مهاجرت سلول‌های عصبی است. پیوند غشای کوریوآلانتیوئیک CAM و تزریق کوریوآلانتیوئیک هنگامی که بافت در ناحیه‌ای عاری از عروق بزرگ روی CAM جنین 6 تا 10 روزه قرار می‌گیرد، بافت‌ها دارای عروق می‌شوند. سلول‌های بنیادی بیرونی احاطه می‌شود و ایجاد عروق می‌کند.

MHC (Major Histocompatibility Complex) کمپلکس سازگاری بین بافت ایزاری است که اگر بین دو حیوان MHC برقرار باشد پیوند بین دو گونه میسر است. جنین‌های که MHC ناسازگار دارند نه تنها پیوند را تحمل نمی‌کنند، بلکه باعث از بین رفتن پوست نیز می‌شوند. درون گونه‌های مرغ پیوند جوانه‌های اندام انجام می‌شود. سیستم ایمنی بلدرچین به طور مداوم تحمل بافت پیوندی را دارند. گونه‌هایی که بسیار نزدیک به جوجه هستند. ظرفیتی که در جوجه وجود دارد را ندارند.

اثر آنتی بادی مونوکلونال MB1/QH1 که یک آنتی ژن را تشخیص می‌دهد. تعیین کننده سلول‌های خونی اندوتلیال و گلبول‌های سفید خون بلدرچین به استثنای هر انواع سلول‌های مرغ است. روابط نزدیکی بین اندوتلیال و سلول‌های خونی در جزایر خونی کیسه زرده است. با استفاده از MB1-Mab، تولید شده امکان پذیر شد، آنتی بادی‌ها را در کایمر مورد تجزیه و تحلیل و آنالیز قرار دادند. رنگ آمیزی جنین بلدرچین اولیه با MBI / QHI-Mab نشان داد: سلول‌های اندوتلیال در روز دوم دوره جوجه‌کشی قبل از شروع زنبق قلب و ظهور رگ‌های اصلی در مزودرم سفالیک مرغی از وجود دارند. بنابراین کایمر بلدرچین – جوجه اثبات کرد مزودرم سفالیک توانایی رگ‌زایی دارد. شبکه‌ی اندوتلیال به دو مجموعه سلول اندوتلیال نیاز دارد. 1 – مزودرم پستی که فقط سلول‌های اندوتلیال را ایجاد می‌کند. 2 – مزودرم شکمی که سلول‌های اندوتلیال و خون را ایجاد می‌کند.

پیوند عصبی جوجه (اهدای کننده) بلدرچین (میزبان)، رنگ آمیزی ایمنی؛ 24 ساعت پس از پیوند. سیستم ایمنی شبکه عروقی تکتوم (بخش پشتی مغز میانی) بدن میزبان (A ستاره). یک شاخه عمودی (پیکان B) به بطن نفوذ کرده و در آینده به پیوند می‌رسد. c اهدای کننده (ستاره)، میزبان (*) کایمر (فلش)، پیوند عصبی D-F (اهدای کننده بلدرچین) جوجه (میزبان). MB 1

رنگ آمیزی ایمنی، D رگ کوچک میزبان (ستاره) سلول عروقی در بافت اهدای کننده (فلش) رگ کوچک دهنده در تکتوم به هم نزدیک می‌شود (*). عروق خونی کوچک محل پیوند بافت اطراف را احاطه می‌کنند (*). F رگ کوچک به سمت تکتوم میزبان در جوجه رشد کرده و عروق خونی کایمر تشکیل می‌شود (فلش). سلول‌های شبه ماکروفاژ از سلول‌های ایمنی دهنده مشتق شده (فلش تیره).

نتیجه گیری:

کایمر جنینی حیوانی است که دارای دو یا چند جمعیت از سلول‌های ژنتیکی متمایز که از جنین‌های مختلف منشأ گرفته‌اند. به دنبال مشاهده هسته در فاز interphase سلول‌های بلدرچین ژاپنی به آسانی از سلول‌های جوجه‌ای که هتروکروماتین سازنده آن به طور مساوی پراکنده شده است قابل تشخیص هستند. از این تفاوت‌های ساختاری برای نشان دادن سلول‌ها استفاده شده است. تکنیکی که طی آن مهاجرت سلولی و تعامل سلول‌ها را با ایجاد کایمر و پیوند بلدرچین به جوجه و برعکس می‌توان بررسی کرد.

استفاده از کایمر در کشف بسیاری از بیماری‌ها، نحوی عملکرد ویروس‌ها و مهندسی بافت و پیوند بافت کاربرد بسیار زیاد و مفیدی دارد.