بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت معلم

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد سلولی- تکوینی جانوری

بررسی نقش مایع مغزی نخاعی(CSF) جنینی در تمایز عصبی رده سلولی pheochromocytoma PC12

استاد راهنما

دکتر محمد نبییونی

اساتید مشاور

دکتر کاظم پریور

دکتر هما محسنی کوچصفهانی

نگارش

جواد رسولی

شهریور ماه ۱۳۸۹

چکیده

بررسی نقش مایع مغزی نخاعی(CSF) جنینی در تمایز عصبی رده سلولی pheochromocytoma (سلولهای PC12)

طی مراحل اولیه رشد و نمو سیستم عصبی مرکزی، سلولهای اپاندیمی مفروش کننده لوله عصبیCSF را ترشح می نمایند.CSF حاوی فاکتور های رشد ونوروتروفیک متعددی می باشد که آنـرا بـه عنـوان عامل تنظیم کننده نوروژنز ، تمایزسلولی و محیط خارج سلولی مطرح می سازد. سلولهای PC12 بطـور گسترده ای به عنوان مدل تمایز نورونی در شرایط *in vitro* استفاده می گردند، که این سلولها در پاسـخ به GDNF,TGF-α, EGF, bFGF, NGF به نورون های شبه سمپاتیک تمایز می یابنـد.CSF از ناحیـه Cisterna magna در جنینهای rat مدل Wistar (بین روزهای ۱۷ تا ۲۰) گرفته شد، نمونه ها در 4000 RPM به مدت۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی بلافاصله به دمایºC80- منتقل شـد. سـلولهای PC12 در محیطRPMI-1640 همراه با 10% FBS، پنی سیلین 100 unit/ml، استرپتو مایسین 100 mg/ml و 5% CO_2 در دمای 37ºC کشت شدند.CSF به محیط کشت به نسـبت هـای۷، ۱۰ و ۲۵ درصـد (v/v) اضافه شد. توانایی حیات و میزان تکثیر سلولی توسط تست MTT اندازه گیری شد. بیـان مـارکر هـای تمایز عصبی (MAP-2 و beta III tubulin)با روش ایمونوسیتوشیمی یک هفته بعد از کشت سلولها در محیط حاوی CSF بررسی شد. MAP-2 و beta III tubulin در سلولهای PC12 کشت شده در محیط حاوی CSF جنینی E17 و E19 بیان شدند در حالی که در سلولهای محیط کنترل بیان نشـدند. توانـایی حیات و تکثیر سلولی بطور معنی داری در سلولهای PC12 کشت شده در محیط حاوی CSF جنینـی E18 در مقایسه با سلولهای محیط کنترل افزایش یافـت. در مطالعـات قبلـی نشـان داده شـده بـود کـه

فاکتورهای نوروتروفیک CSF در نوروژنز، تمایز نورونی، رشدونمو کلی مغز نقش مهمی ایفا می کنند. همچنین در کشت سلوهای کورتکس مغز در CSF خالص، خود CSF باعث افـزایش توانـایی حیـات وتکثیر سلولی می گردد. نتایج این تحقیق بر سلول های PC12 در راستای مطالعات قبلی می باشد کـه نقش فاکتورهای نوروتروفیک CSF را در تمـایز نـورونی آشـکار مـی سـازد. بـه نظـر مـی رسـد کـه تمایزنورونی دودمان سلولهای PC12 ناشی از القای CSF توسط ترکیبات آن به ویژه فاکتورهـای رشـد موجود درآن می باشد.

کلمات کلیدی: مایع مغزی نخاعی، سلولهای PC12، تمایز نورونی.

فصل اول

مقدمه ۱

۱-۱- تکوین سیستم عصبی ۲

۱-۲- شکل گیری لوله عصبی ۲

۱-۲-۱- نورولاسیون اولیه ۳

۱-۲-۲- نورولاسیون ثانویه ۳

۱-۲-۳- تمایز لوله عصبی ٤

۱-۲-٤- شکل گیری ساختار بافتی لوله عصبی ٥

۱-۲-٥- شکل گیری نورون ها ۷

۱-۳- مارکرهای تمایز عصبی ۱۲

۱-۳-۱- سلول های پیش ساز عصبی ۱۳

۱-۳-۲- نورون های نابالغ (Immature Neurons) ۱٤

۱-۳-۳- نورون های بالغ ۱٤

۱-۳-٤- مارکر تمایزی MAP2 (microtubule-associated protein 2) ۱٥

۱-۳-٥- مارکر تمایزی Beta Tubulin III ۱٦

۱-٤- رده سلولی PHEOCHROMOCYTOMA (سلولهای PC12) ۱۷

۱-٥- مایع میان بافتی در مغز (INTERSTESTITIAL FLUID = ISF) ۱۹

۱-٥-۱- شبکه کوروئید و مایع مغزی نخاعی ۲۰

۱-٥-۲- نقش CSF در رشد و تکثیر سلولی مغز در طی تکوین ۲۳

۱-٥-۳- تولید CSF ۲٤

۱-۵-٤- جریان مایع مغزی نخاعی ۲٦
۱-۵-۵- ترکیب مایع مغزی نخاعی ۲۷
۱-۵-٦- اهمیت نقش CSF و جریان طبیعی آن در رشد و نمو مغز ۲۹
۱-۵-۷- باز جذب CSF ۳۰
۱-۵-۸- فرضیات و اهدافاز انجام تحقیق ۳۲

فصل دوم

مواد و روش ها ۳٤
۲-۱- مواد و دستگاه های مورد استفاده ۳۵
۲-۲- نگهداری و آماده نمودن حیوانات آزمایشگاهی ۳٦
۲-۳- جمع آوری CSF از جنین های رت ۳۷
۲-٤- اندازه گیری غلظت پروتئینی تام (TOTAL PROTEIN CONCENTRATION) به روش بردفورد .. ۳۹
۲-۵- کشت سلول ٤۰
۲-۵-۱- شمارش سلولی ٤۱
۲-۵-۲- پاساژ سلول ها ٤۳
۲-۵-۳- ذخیره سلول ها برای مدت طولانی ٤٤
۲-۵-٤- نحوه بررسی تاثیر CSF جنینی بر سلول های PC12 ..... ٤٦
۲-۵-۵- بررسی مورفولوژیکی تمایز سلول هایPC12 ..... ٤۷
۲-٦- بررسی مارکرهای تمایزنورونی به روش ایمنوسیتوشیمی ٤۸
۲-٦-۱- محلول های مورد نیاز ٤۸

۲-٦-۲- مراحل انجام ایمنوسیتوشیمی ٤٨

۲-۷- ارزیابی میزان بقا سلول ها (VIABILITY ASSAY) به روش MTT..... ٥١

۲-۸-بررسی های آماری ٥٢

فصل سوم

نتایج ٥٣

۳-۱- نتایج به دست آمده از بررسی محتوای غلظت پروتئین تام موجود در CSF ٥٤

۳-۲- نتایج به دست آمده از بررسی میزان بقا و تکثیر سلولی در رده سلولی PC12 تحت تاثیر CSF جنینی توسط تست MTT..... ٥٦

۳-۳- نتایج حاصل از بررسی مورفولوژیکی تاثیر CSF جنینی ٦٠

۳-٤- نتایج حاصل از بررسی میزان رشد آکسونی (NEURITE OUTGROWTH)..... ٦٧

۳-٥- نتایج به دست آمده از بررسی بیان مارکرهای ایمنوسیتوشیمیایی ٧٠

فصل چهارم

بحث و تفسیر ٧٧

٤-۱- تغییرات محتوی کل پروتئین CSF و نقش رشد ونموی CSF جنینی ٧٨

٤-۲- پروتئین های موجود در CSF جنینی و نقش آن در تکوین سیستم عصبی مرکزی..... ٨١

٤-۳- نقش CSF جنینی در تکثیر وتمایز سلول های عصبی ٨٣

٤-٤- نتیجه گیری ٨٨

فصل پنجم

منابع ٩٢

چکیده انگلیسی ۱۰٤

فصل اول

مقدمه

۱-۱- تکوین سیستم عصبی

مهم ترین سوالی که در علم زیست شناسی تکوینی طی سالیان اخیر مطرح شده است این می باشد که آیا مغز با تمام پیچیدگی که دارد پاسخ مناسبی را برای چگونگی شکل گیری خود پیدا می نماید. ساخت وشکل گیری اندامی که درک می کند، تفکر می نماید، یاد می گیرد، تغییر ایجاد می کند و اینکه تمام اعمال آگاهانه و ناخودآگاه فرد راکنترل می نماید مطمئنا مهم ترین مساله مطرح شده درمیان مسائل تکوینی می باشد.

سیستم عصبی در مهره داران از اکتودرم منشا می گیرد، به نحوی که سلول های بخش پشتی اکتودرم که مسئول شکل گیری و تکوین سیستم عصبی می باشند به واسطه شکل استوانه ای که پیدا می کنند کاملا از بخش های مجاور متمایز می گردد. این ناحیه از جنین صفحه عصبی نامیده می شود که با چین خوردگی لوله عصبی را ایجاد می نماید. این فرایند که طی آن لوله عصبی شکل می گیرد نورولاسیون و جنین در این مرحله نورولا نامیده می شود (Gilbert S.F., 2006).

۱-۲- شکل گیری لوله عصبی

شگل گیری لوله عصبی در مهره داران از دو الگوی اصلی تبعیت می نماید: نورولاسیون اولیه و نورولاسیون ثانویه

۱-۲-۱- نورولاسیون اولیه

طی این روش سلول هایی که صفحه عصبی را احاطه نموده اند سلول های لوله عصبی آینده را وادار به تکثیر، درون خزیدگی و نهایتا فرورفتن و جداشدن می نمایند. به این نحو که مدت کوتاهی پس از اینکه صفحه عصبی شکل گرفت لبه های آن ضخیم می گردد و به سمت بالا حرکت می نماید تا اینکه چین های عصبی را ایجاد نماید. ایجاد چین عصبی باعث شکل گیری ناودان عصبی U شکل در مرکز صفحه عصبی می گردد. چین های عصبی به سمت یکدیگر حرکت می نمایند تا اینکه در خط میانی پشتی جنین به هم می رسند و لوله عصبی توخالی را ایجاد می نمایند. فرایند نورولاسیون اولیه بنظر می رسد که در دوزیستان، خزندگان، پرندگان و پستانداران مشابه می باشد(Gilbert S.F., 2006) .

۱-۲-۲- نورولاسیون ثانویه

لوله عصبی از یک طناب توپر که در جنین فرو می رود، شکل می گیرد که این توده سلولی بعدا توخالی می گردد و لوله عصبی را ایجاد می نماید. تشکیل لوله عصبی در همه رده های مهره داران یکی از الگوهای نورولاسیون فوق را دنبال می نماید بطوریکه الگوی نورولاسیون درماهیان از نوع ثانویه می باشد. در پرندگان قسمت های جلویی لوله عصبی از نورولاسیون اولیه تبعیت می کنند در حالیکه بخش دمی لوله عصبی (از سومیت ۲۷ به بعد) الگوی نورولاسیون ثانویه را نشان می دهد (Catala et al., 1996)، در دوزیستانی همچون زنوپوس بیشتر قسمت های لوله عصبی لارو

دوزیست طی نورولاسیون اولیه شکل می گیرد در حالیکه قسمت دمی لوله عصبی الگوی نورولاسیون ثانویه را دنبال می نماید (Gont et al., 1993). در موش (واحتمالا در انسان) نورولاسیون ثانویه از مرحله ۳۵ سومیتی آغاز می گردد (Nievelstein et al., 1993).

۱-۲-۳- تمایز لوله عصبی

تمایز لوله عصبی به نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی را می توان در سه سطح مختلف بررسی نمود سطح آناتومی، سطح بافت شناسی وسطح سلولی. در سطح آناتومی، لوله عصبی و مجرای آن دچار فرورفتگی هایی در نواحی مختلف شده که منجر به شکل گیری حفرات مغز وایجاد نخاع می گردد. در سطح بافت شناسی سلول ها در دیواره لوله عصبی طی بازآرایی که انجام می دهند نواحی مختلف مغز ونخاع را ایجاد می نمایند. اما در سطح سلولی، سلول های نوروایی تلیال به انواع سلول های عصبی(نورون ها) و سلول های حمایت کننده (سلول های گلیال) تمایز می یابند (Gilbert S.F., 2006).

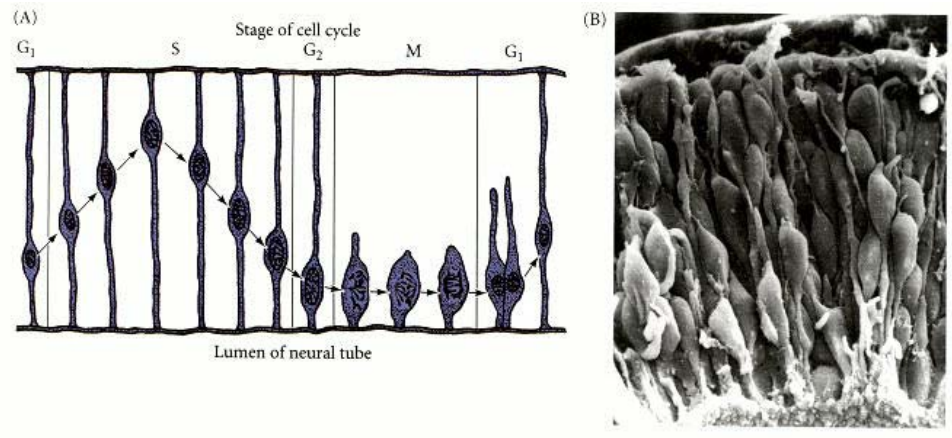
لوله عصبی اولیه دارای ساختاری خطی می باشد که در آن قبل از اینکه قسمت خلفی شکل بگیرد قسمت قدامی دچار تغییرات اساسی می گردد. در ناحیه قدامی لوله عصبی به سه حباب اولیه تقسیم می گردد که به ترتیب شامل مغز جلویی (prosencephalon)، مغز میانی (mesencephalon) و مغز عقبی (rhombencephalon) می باشد.

مغز جلویی به دو بخش قدامی تلن سفالن و بخش دمی دین سفالن تقسیم می گردد، که تلن سفالن بعدها نیمکره های مغز را تشکیل می دهد و دین سفالن نیز در آینده تالاموس،

هیپوتالاموس، بخش خلفی هیپوفیز و شبکیه چشم را ایجاد می نماید. مغز میانی در آن تقسیمی رخ نمی دهد و مجرای مرکزی آن به قنات aqueduct (قنات سیلویوس) مغزی تبدیل می گردد. مغز عقبی به دو بخش خلفی میلن سفالن و قدامی متن سفالن تقسیم می گردد، میلن سفالن بصل النخاع و متن سفالن مخچه را ایجاد می نمایند (Guthrie & Lumsden 1991).

۱-۲-٤- شکل گیری ساختار بافتی لوله عصبی

لوله عصبی اولیه در ابتدا فقط از یک لایه نورواپیتلیوم زاینده شکل می گیرد. که در آن سلول ها از سطح لومن به سمت سطح خارجی نورواپیتلیوم کشیده می شوند اما با توجه به اینکه هسته های این سلول ها در عرض لوله عصبی در جایگاه های متنوعی قرار می گیرند به نورواپیتلیوم ظاهری چند لایه می دهند.در این لایه سلول های بنیادی عصبی (neural stem cell) حضور دارند که سریعا شروع به تقسیم می نمایند اما برخی از این سلول ها سنتز DNA در آنها متوقف می گردد، این سلول های نورونی و گلیالی به سمت سطح خارجی لوله عصبی مهاجرت می نمایند و نهایتا در آنجا تمایز می یابند(شکل ۱-۱) (Gilbert S.F., 2006).



شکل ۱-۱: تصویر ساختار بافت شناسی مقطع عرضی لوله عصبی اولیه. A) شکل شماتیک از سلول های لوله عصبی در مراحل مختلف تقسیم سلولی. هسته سلول ها با نزدیک شدن به مرحله تقسیم سلولی(میتوز) به سمت لومن مجرای لوله عصبی نزدیک می شوند این تغییر جایگاه هسته سلول ها در عرض لوله عصبی به آن ظاهری چند لایه می بخشد B) تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از لوله عصبی اولیه (Gilbert S.F., 2006).

سلول های مجاور لومن به تکثیر خود ادامه می دهند، سلول های مهاجر دومین لایه سلولی را اطراف لوله عصبی تشکیل می دهند. هر چه سلول های بیشتری ازلایه زایای نورواپیتلیومی به این ناحیه اضافه گردد این لایه ضخیم تر می گردد. این لایه جدید را منطقه جبه ای /(mantle zone intermediate zone) می نامند ولایه زاینده اکنون منطقه بطنی (ventricular zone) نامیده می شود که بعدها لایه اپاندیمی را ایجاد می نماید. سلول های موجود در لایه جبه ای به نورون ها و سلول های گلیال تمایز می یابند. این نورون ها با یکدیگر ارتباط ایجاد می نمایند و آکسون هایشان را به سمت لومن گسترش می دهند که در نتیجه ناحیه ای به نام منطقه حاشیه ای(marginal zone) شکل می گیرد که محتوای سلولی آن کم می باشد.در نهایت سلول های گلیال سطح بیشتر آکسون های موجود در ناحیه حاشیه ای را می پوشانند و به این ناحیه ظاهری سفید رنگ می دهند. از این

رو ناحیه جبه ای که حاوی جسم سلولی نورون ها می باشد به عنوان ماده خاکستری سیستم عصبی شناخته می شود و ناحیه حاشیه ای ماده سفید سیستم عصبی را تشکیل می دهد (Gilbert S.F., 2006).

۱-۲-۵- شکل گیری نورون ها

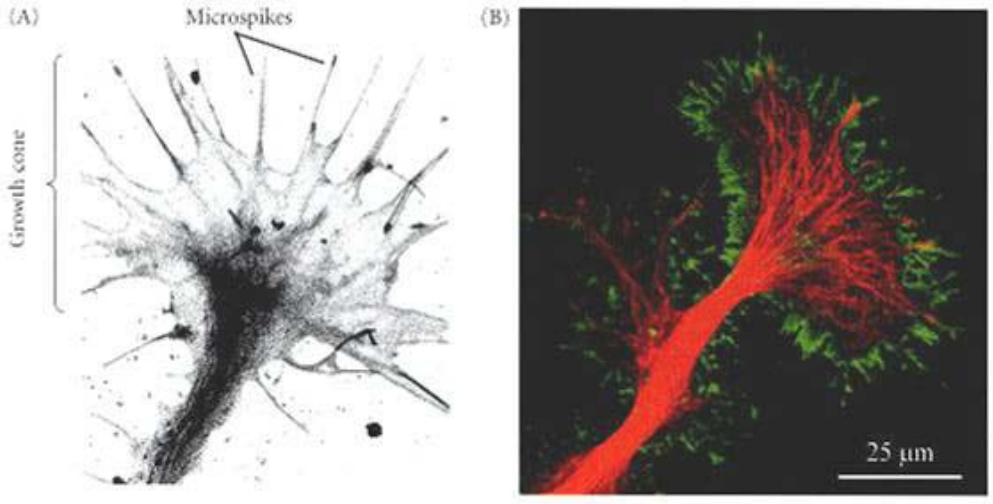
مغز انسان حاوی بیش از 10^{11} نورون می باشد که با 10^{12} سلول گلیال در ارتباط هستند. سلول هایی که با ساختارهای درونی لوله عصبی در ارتباط هستند و لوله عصبی را آستر می نمایند به سلول های اپاندیمی تبدیل می گردند، این سلول ها می توانند به سلول های پیش ساز نورون یا گلیال نیز تبدیل گردند، سرنوشت تمایزی این سلول های پیش ساز عصبی بطور گسترده ای توسط محیطی که به آن وارد می شوند تعیین می گردد (Rakic & Goldman-Rakic 1982).

مغز حاوی انواعی از سلول های نورونی وگلیال می باشد، از ویژگی هایی که نورون ها را از سایر سلول ها متمایز می سازد می توان به زوائدی در سطح جسم سلولی که دندریت نام دارد اشاره نمود. دندریتها که محل اصلی برای ثبت ایمپالس های عصبی در نورون ها می باشند بر حسب نوع نورون تعداد آنها بر روی سلول متفاوت می باشد، به عنوان مثال نورون های پورکنژ دارای درخت دندریتی وسیعی می باشند. در انسان هنگام تولد دندریت های کمی در نورون های قشری مغز یافت می شود با این وجود در سال اول پس از تولد مشاهده می شود که هر نورون قشری می تواند سطح دندریتی خود را تا حدی وسیع نماید که بیش از ۱۰۰۰۰۰ سیناپس را با نورون های

دیگر ایجاد نماید. همین نحوه ایجاد سیناپس است که کورتکس را به عنوان مرکز یاد گیری، حافظه و منطق مطرح می سازد (Gilbert S.F., 2006).

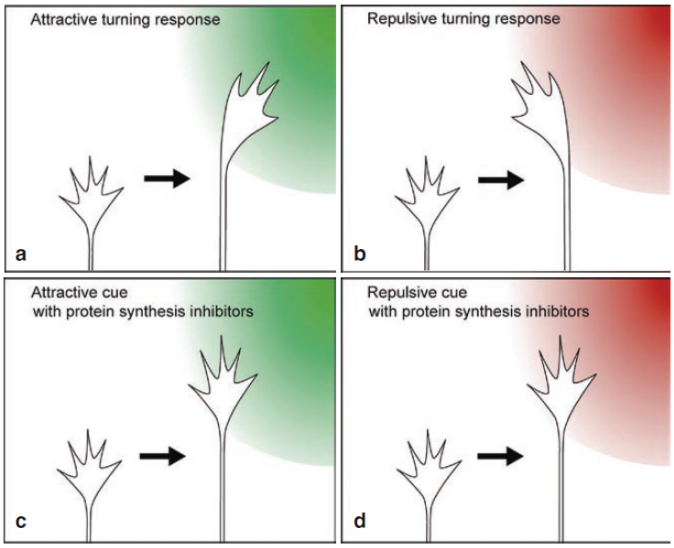
جزء دیگر نورون در حال تکوین آکسون می باشد (که به عنوان neurite نیز شناخته می شود) در حالی که دندریت ها طویل نمی گردند اما طول آکسون ممکن است به بیش از یک مترهم برسد. در قرن بیستم چندین تئوری برای شکل گیری و طویل شدن آکسون ارائه گردید که از آن جمله می توان به تئوری سلولی توسط Theodor Schawn اشاره نمود، وی عنوان نمود که سلول های عصبی متعددی با همدیگر به صورت زنجیروار ارتباط ایجاد می نمایند تا اینکه یک آکسون شکل گیرد. Victor Hensen کاشف گره هنسن نیز آکسون را به عنوان رشته های سیتوپلاسمی می دانست که بین سلول های عصبی شکل می گیرد. در سال ۱۸۹۰، Santiago Ramon Cajal فرضیه ای را مطرح نمود که اکسون در نتیجه رشد به بیرون از سطح جسم سلولی نورون ها ایجاد می گردد. Rass Harrison در سال ۱۹۰۷ درست بودن تئوری رشد به بیرون (outgrowth) رااثبات نمود، به این شکل که او یک قطعه از لوله عصبی لارو دوزیست3mm را جدا نمود (در این مرحله که مدت کوتاهی بعد ازبسته شدن لوله عصبی می باشد هیچ گونه تمایز آکسونی دیده نمی شود). بافت جدا شده حاوی نوروبلاست ها در یک قطره لنف قورباغه برروی لامل قرار داده شد، سپس لامل به صورت وارونه برروی یک لام گود قرار داده شد. چیزی که Harrison دراین قطره معلق (hanging drop) مشاهده نمود این بود که اکسون ها دارای سرعت رشد به بیرون حدود 56 µm/hr از سطح نوروبلاست ها بودند(Gilbert S.F., 2006).

رشد به بیرون آکسون توسط راس آن که مخروط رشد (growth cone) نام دارد هدایت می گردد (شکل ۱-۲). مسیری که مخروط رشد طی می کند مسیر مستقیمی نمی باشد و حرکت آن به واسطه حرکات انقباضی فیلوپودهای خود که در سطح آنها microspike قرار دارد انجام می گیرد. این میکرواسپایک ها حاوی میکروفیلامنت ها می باشند که موازی با محور آکسون جهت یابی می شوند، آکسونی که مخروط رشد آن به هر دلیلی نتواند پیش روی نماید رشد آن متوقف می گردد. میکروتوبول های تشکیل دهنده آکسون مسئولیت حفظ ساختار آکسونی را به عهده دارند این موضوع را می توان با قرار دادن آکسون نورون در کلشی سین اثبات نمود به نحوی که آکسون به یک دفعه روبه سمت سومای نورون جمع می گردد (Lamoureux et al., 1989).



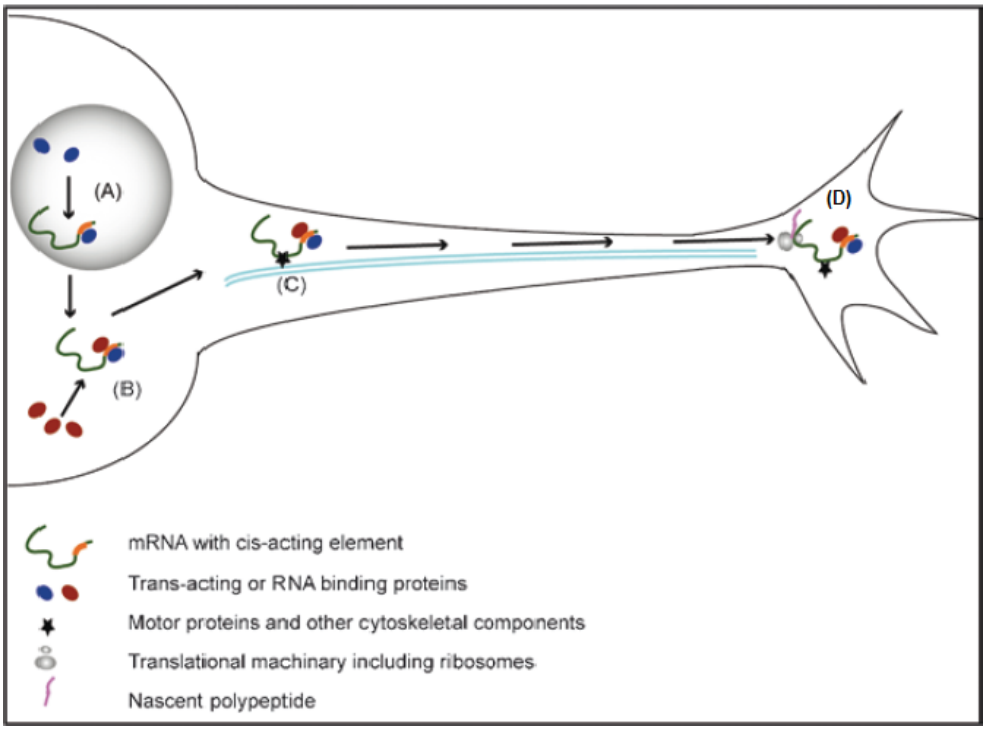
شکل ۱-۲: تصویر میکروسکوپ نوری (A) و میکروسکوپ فلورسنت (B) از مخروط رشد در آکسون در حال رشد که میکرواسپایک ها را به وضوح می توان مشاهده نمود (Gilbert S.F., 2006).

طی تکوین سیستم عصبی آکسون ها باید فواصل معینی را تا رسیدن به محل ایجاد سیناپس طی نمایند، این عمل اغلب به کمک یکسری سیگنال های مولکولی انجام می شود. از جمله این مولکول ها می توان به nerit ، slit، semaphorin و ephrin ها اشاره نمود که در هدایت مخروط رشد آکسونی نقش ایفا می نمایند. مخروط رشد در انتهای آکسون این سیگنال ها را دریافت و حس می نماید و برحسب نوع محرک به سمت آنها می لغزد یا اینکه دور می شود (شکل۱-۳) (Dickson B.J., 2002).



شکل ۱-۳: تصویر شماتیک از نحوه پاسخ دهی مخروط رشد آکسونی به محرک های محیطی. a) مخروط رشد طبیعی به سمت شیب غلظت محرک های رشد تغییر جهت می دهد b) مخروط رشد از شیب غلظت مواد دفع کننده دور می گردد c) با مهار سنتز پروتئین موضعی در انتهای مخروط رشد پاسخ مثبت به محرک های رشد متوقف می گردد d) با مهار سنتز موضعی پروتئین ها در مخروط رشد پاسخ منفی به مواد دفع کننده نیز متوقف می گردد (Koeing E., 2009).

در ابتدا تصور می شد که پروتئین های لازم برای حرکت آکسون در جسم سلولی نورون ساخته می شود وسپس به مخروط رشد منتقل می گردند تا آکسون بتواند به محرک های محیطی پاسخ مناسب بدهد (Koenig & Giuitta 1999). مطالعات بعدی در این زمینه توانست این نوع نگرش درباره آکسون را زیرسوال ببرد، به عنوان مثال در مطالعه ای که بر روی مخروط های رشد جدا شده از سلول های شبکیه Xenopus laevis انجام شد، این مخروط های رشد در محیط *in vitro* و *in vivo* بیش از ۳ ساعت زنده نمی ماندند اما در همین مدت کوتاه این زوائد عصبی اغلب توانایی مهاجرت و پاسخ به محرک های محیطی را از خود نشان می دادند (Campbell & Holt 2001, Harris et al., 1987). حال سوالی که مطرح می گردد این است که مخروط های رشد جدا شده از سلول چگونه توانایی پاسخ دهی به محرک های محیطی را حفظ می نمایند در حالی که ارتباط آنها با جسم سلولی قطع شده است. مطالعات اخیر پیشنهاد می نمایند که این استقلال درمخروط های رشد حاصل سنتز پروتئین موضعی در محل مخروط می باشد. بر همین اساس مقادیر بالایی از mRNA به آکسون ها و مخروط های رشد منتقل می گردند، جایی که آنها به طور موضعی و مجزا از جسم سلولی ترجمه می گردند (Palacios & Johanson 2001; Olink-Coux & Hollenbeck 1996) (شکل ۱-٤).



شکل ۱-٤: نمایی از سنتز پروتئین های مخروط رشد در آکسون a) و b) شناسایی mRNA سنتز شده در هسته توسط RNA بایندینگ پروتئین های هسته ای و سیتوپلاسمیc) انتقال RNP مورد نظر به انتهای آکسون (مخروط رشد) توسط موتورپروتئین های سیتواسکلتون d) در نهایت سنتز پروتئین توسط سیستم ترجمه مستقر در مخروط رشد اکسونی (Koeing E., 2009).

۱-۳- مارکرهای تمایز عصبی

سلول های عصبی بر حسب اینکه در کدام مرحله تمایزی قرار دارند و اینکه سرنوشت عصبی آنها مشخص شده باشد، مارکر های اختصاصی مربوط به هر مرحله را بیان می نمایند بر همین اساس این مارکرها را در سه مرحله تکوین سلول های عصبی بررسی می نماییم: